



Búsqueda de regiones homólogas a péptidos antimicrobianos en el genoma de *Solanum lycopersicum* con acción frente a *Ralstonia solanacearum*

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología
trabajo de grado
Bogotá, 2.019**



Búsqueda de regiones homólogas a péptidos antimicrobianos en el genoma de *Solanum lycopersicum* con acción frente a *Ralstonia solanacearum*

Alexandra Cortés Hernández

**Asesor interno:
Martha Lucía Posada Buitrago
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología
trabajo de grado
Bogotá, 2.019**

DEDICATORIA

Han pasado cinco años desde que inicie esta etapa de mi vida, durante este periodo pude ampliar mi conocimiento y crecer como persona, por ello, este trabajo representa una satisfacción personal, pues, es el punto culmen de esta parte de mi vida, por eso, quiero dedicar mi proyecto de grado a mis padres, mi mayor apoyo, los que me han hecho la persona de la que hoy en día estoy tan orgullosa, y a mis hermanas, quienes siempre están rodeándome de su cariño incondicional, gracias.

"Los recuerdos y el pasado son solitarios. Mira, yo no creo en Dios, no hay prueba alguna de que exista. En un mundo en el que el futuro no está definido, el pasado existe. Las personas creen en él a pesar de estar teñido de malentendidos y desilusiones, el pasado es su única verdad, y si basas tu vida en él, en cierto modo eres tu propio Dios. "

Ryohgo Narita

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi familia, por el apoyo emocional que me han manifestado, por escucharme y darme un consejo o un abrazo cuando lo necesite, a las docentes Ligia Consuelo Sánchez y Martha Lucía Posada, por brindarme su asesoría y permitir la realización de este trabajo, pues, desde un inicio estuvieron allí enriqueciendo mi conocimientos y aceptando esta pequeña idea. Quiero resaltar a la docente Janette Navarrete, ya que fueron sus clases de inmunología las bases de la construcción de este trabajo de investigación; a mis amigos, particularmente a Marylin Sterling por ser mi contaste recordatorio de que un trabajo no se hace solo. Finalmente, daré un reconocimiento especial a Orlando Pineda, quien ha sido mi guía, mi amigo y un gran apoyo, sinceramente muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen.....	10
1. Introducción.....	13
2. Objetivos.....	15
3. Objetivo general.....	15
3.1. Objetivos específicos.....	15
4. Antecedentes.....	16
5. Marco referencial.....	18
5.1. Inmunología de las plantas.	18
5.1.1. Receptores y respuesta inmunológica.....	20
5.2. Péptidos antimicrobianos.....	22
5.2.1. Tipos de Péptidos antimicrobianos.....	23
5.2.2. Rol de los péptidos antimicrobianos (AMP) en la respuesta inmunológica de las plantas.....	25
5.3. Marchitez bacteriana.....	26
5.3.1. <i>Ralstonia solanacearum</i>	27
5.3.2. Péptidos antimicrobianos como potencial control de la marchitez bacteriana.....	27
6. Diseño metodológico.....	29
7. Resultados.....	31
8. Discusión.....	40
9. Conclusiones.....	44
10. Referencias bibliográficas.....	45
11. Anexos.....	50

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Morfología y división de grupos de fitopatógenos.....	18
Fig. 2: Estructura tridimensional de diferentes familias de péptidos antimicrobianos.....	23
Fig. 3: Distribución de la diferentes familias de péptidos antimicrobianos.....	24
Fig. 4: Alineamiento péptido D1 con el péptido ADK36631 de <i>Solanum lycopersicum</i>	35
Fig.5: Alineamiento péptido D1 con el péptido CAB42006.1 de <i>Solanum lycopersicum</i>	35
Fig. 6: A Alineamiento péptido D1 con el péptido NP_001297247.1 de <i>Solanum lycopersicum</i>	35
Fig. 7: Esquema del proceso de transcripción y traducción del péptido D1	36
Fig. 8: Estructura tridimensional del péptido D1.....	37
Fig. 9: sitios de unión de ligando en el péptido D1.....	38
Fig. 10: Análisis de los cambios de aminoácidos en el péptido D1	39

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Universo, población, muestra y variable.....	29
Tabla 2: Péptidos antimicrobianos que presentan acción frente a <i>Ralstonia solanacearum</i>	31
Tabla 3: Traducción inversa de los péptidos antimicrobianos seleccionados.....	33
Tabla 4: Alineamientos de las regiones homologas a péptidos antimicrobianos con acción frente a <i>Ralstonia solanacearum</i>	34
Tabla 5: Comparación de las propiedades de los aminoácidos presentes en el péptido y los péptidos homologas.....	39

ABREVIACIONES

AMP:	Péptidos antimicrobianos
Avr:	proteínas de avirulencia del patógeno
BLAST:	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CNGB:	<i>China National GeneBank</i>
CWDE:	Enzimas que degradan la pared celular
DAMP:	patrones moleculares asociados al daño
ETI:	Inmunidad desencadenada por efectores
ETS:	susceptibilidad desencadenada por efectores
HR:	respuesta de hipersensibilidad
LPS:	Lipopolisacáridos
MUSCLE:	<i>Multiple Sequence Alignment</i>
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAMP:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PR:	proteínas relacionadas a la patogénesis
PRR:	Receptores de reconocimiento de patrones
PTI:	Inmunidad desencadenada por PAMP
R:	genes de resistencia
RIP:	proteínas que inhiben síntesis ribosomal
RRL:	repetidos ricos en Leucina
S:	proteínas de susceptibilidad
SMS:	<i>Sequence Manipulation Suite</i>



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA**

***Búsqueda de regiones homologas a péptidos antimicrobianos en el
genoma de *Solanum lycopersicum* con acción frente a *Ralstonia
solanacearum****

RESUMEN

La marchitez bacteriana en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*), ocasionada por *Ralstonia solanacearum*, causante de grandes pérdidas en los cultivos. Las plantas poseen un elaborado sistema inmune, no obstante, los fitopatógenos buscan estrategias para evadir sus mecanismos de defensa y lograr invadirlas, causando que los agricultores realicen una alta inversión económica para su control.

El objetivo de este trabajo es la búsqueda de regiones homólogas a péptidos antimicrobianos en el genoma de *Solanum lycopersicum*, que presenten un potencial efecto contra *Ralstonia solanacearum*. Por medio de bases de datos de Péptidos antimicrobianos (AMP) se eligieron tres péptidos tipo Defensinas encontrados en *Spinacia oleracea* (D1, D2, D5), luego se realizó un alineamiento de la secuencia de estos con 256 genes de *Solanum lycopersicum*, de los cuales tres presentaron homología con D1, se compararon los alineamientos para hallar las posiciones que presentaran cambios de aminoácidos. Por medio de I-TASSER se generó el modelo de la estructura 3D de D1 y se graficaron siete zonas con variaciones; las funciones de las posiciones afectadas fueron estudiadas, considerando las propiedades de los aminoácidos y se analizó la

secuencia de los péptidos homólogos en APD3, los resultados revelaron que los péptidos corresponden a AMP tipo Defensinas, coincidiendo con D1, además, los aminoácidos modificados compartieron características, por ende, se concluyó que estas variaciones no afectarían la acción antimicrobiana de los péptidos homólogos y presentarían un alto potencial para brindar una nueva estrategia de control contra la marchitez bacteriana.

Palabras claves: Péptidos antimicrobianos, Defensinas, marchitez bacteriana, homología, bioinformática.

Estudiante: Alexandra Cortés Hernández

Docente: Martha Lucía Posada Buitrago

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

2019

Búsqueda de regiones homologas a péptidos antimicrobianos en el genoma de Solanum lycopersicum con acción frente a Ralstonia solanacearum

Search of regions homologous to antimicrobial peptides with action against *Ralstonia solanacearum* in the genome of *Solanum lycopersicum*

ABSTRACT

This project proposes a control strategy on bacterial wilt in tomato crops (*Solanum lycopersicum*), caused by *Ralstonia solanacearum*, and generates large losses in crops. Plants have an elaborate immune system, however, phytopathogens seek strategies to evade their defense mechanisms and achieve invasion; causing farmers to make a high economic investment for their control.

The aim of this work is to search for regions homologous to antimicrobial peptides in the genome of *Solanum lycopersicum*, which have a potential effect against *Ralstonia solanacearum*. By means of AMP databases, three Defensin type peptides found in *Spinacia oleracea* (D1, D2, D5) were chosen, followed by an alignment of the sequence of these with 256 genes of *S. lycopersicum*, of which three (ADK36631, CAB42006.1, NP_001297247.1) presented homology with D1, the alignments were compared to find the positions presenting amino acid changes. Using I-TASSER, the model of the 3D structure of D1 was generated and seven zones with variations were plotted; the functions of the affected positions were studied, considering the properties of the amino acids and the sequence of the homologous peptides was analyzed in APD3, the results revealed that the peptides correspond to Defensins type AMP, coinciding with D1, in addition, the modified amino acids shared characteristics, therefore, it was concluded that these variations would not affect the antimicrobial action of ADK36631, CAB42006.1, NP_001297247.1 and would present a high potential to provide a new control strategy against bacterial wilt.

Key words: antimicrobial peptides, Defensin, bacterial wilt, homology, bioinformatics

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los desafíos actuales que se tienen en el campo de la agricultura es la obtención de cultivos resistentes a diversas enfermedades de importancia fitopatológica ⁽¹⁾, por tal motivo, el presente proyecto está enfocado en una estrategia alternativa para el control de la marchitez bacteriana centrada en la búsqueda de regiones codificantes que presenten homología a péptidos antimicrobianos con acción frente a *Ralstonia solanacearum* en el genoma de *Solanum lycopersicum*.

Solanum lycopersicum es uno de los cultivos de hortalizas con gran relevancia en el país, puesto que, según el Boletín técnico nacional agropecuario arrojado por el DANE para el año 2016, Colombia presentó una producción de 382.609t de tomate en 26 departamentos del país. La producción para el primer y segundo semestre del año fue de 211,234t y 171,375t respectivamente ⁽²⁾

Los datos anteriores demuestran que el cultivo de tomate es de gran importancia en el país, además, los datos históricos presentan al tomate como la segunda hortaliza más consumida en Colombia. Teniendo en cuenta dicha información, el desarrollo de una infección en el cultivo de tomate representa una pérdida económica entre diez y doce millones de pesos considerando los costos de producción por hectárea de este cultivo⁽²⁾⁽³⁾.

Recientemente se han presentado casos de marchitez bacteriana en el tomate, patología causada por *Ralstonia solanacearum*. Esta bacteria es extremadamente destructiva y se ha reportado en más de 30 países, en casi todos los continentes, causando pudrición parda (o marchitez bacteriana) de la papa, marchitez bacteriana del geranio, y marchitez bacteriana del tomate y otros hospederos⁽⁴⁾.

En Colombia se han reportado hallazgos de esta bacteria principalmente en los municipios de Cereté, Montería, San Bernardo y Sutamerchán en el departamento de Córdoba. Sin embargo, las mayores pérdidas se producen en los cultivos de plátano y banano donde las pérdidas han llegado a ser del 100%⁽⁵⁾.

Considerando que el tomate es un hospedero susceptible, algunos estudios planteaban mantener un buen control en los cultivos para evitar el desarrollo de esta enfermedad⁽⁶⁾. No obstante, en los llanos del país ha ocurrido un brote de marchitez bacteriana, lo cual puede generar grandes pérdidas económicas, teniendo en cuenta los datos de otros cultivos afectados por esta bacteria y el mecanismo de acción de la misma.

La severidad de la enfermedad depende del tipo, temperatura y humedad del suelo (lo cual influye en la humedad y en el desarrollo del microorganismo), los hospederos susceptibles y la virulencia de las cepas. Las altas temperaturas (30-35°C) y humedad son los principales factores asociados con la alta incidencia y severidad de la marchitez bacteriana.⁽⁷⁾

A la fecha no se conocen péptidos que posea el tomate contra *Ralstonia*, los cuales le proveerían un mayor nivel de inmunidad y así mismo se evitarían pérdidas económicas por este fitopatógeno. Por lo tanto, la búsqueda de estos péptidos, podría aportar un avance en la agricultura puesto que realizar la síntesis de un péptido antimicrobiano proveniente del tomate, que desarrolle un control sobre *Ralstonia solanacearum*, genera la posibilidad de incrementar la respuesta inmunológica de estos cultivos, además contribuye a la reducción del uso de agroquímicos generando un alimento más saludable y disminuyendo la contaminación ambiental.

Se emplearon diversas bases de datos y herramientas bioinformáticas para la realización de este estudio, dando como resultado la lineación de tres secuencias homologas a péptidos antimicrobianos tipo Defensinas, que presentan un alto potencial para generar nueva estrategia de control frente a *Ralstonia solanacearum*, que sustituiría los agroquímicos convencionales.

2. OBJETIVOS.

2.1. General

- Buscar regiones homólogas a péptidos antimicrobianos en el genoma de *Solanum lycopersicum* que sean potenciales generadores de una respuesta inmunológica eficaz ante *Ralstonia solanacearum*.

2.2. Específicos

- Buscar péptidos antimicrobianos que sean efectores de una respuesta inmunológica ante *Ralstonia solanacearum* en las bases de datos biológicos y bibliográficos.
- Analizar regiones codificantes de *Solanum lycopersicum* de potenciales péptidos antimicrobianos con acción ante *Ralstonia solanacearum*.

3. ANTECEDENTES

Las plantas a lo largo de su vida tienen que enfrentarse a complejas situaciones en las que intervienen diversas características ambientales. La exposición a factores bióticos y abióticos tiene un gran impacto en su metabolismo y para minimizar los daños causados por los mismos, las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos de resistencia que les permiten adaptarse y sobrevivir a dichas condiciones adversas⁽⁸⁾.

Los términos empleados en la defensa de las plantas han sufrido cambios significativos, pues antes de 2002 no se hablaba propiamente con términos inmunológicos porque no se conocían los mecanismos de defensa utilizados por estos organismos vivos. Castro y García⁽⁹⁾ mencionaban que a través de la interacción planta-patógeno, la evolución ha permitido que algunos cultivares desarrollaran proteínas de resistencia que se activan al reconocimiento del patógeno y de esta manera desencadenen una serie de reacciones moleculares que permiten generar una respuesta inmune favorable.

Es por ello que se han realizado diversos estudios que permiten mejorar la resistencia de diversas especies de plantas, principalmente aquellas que puedan representar pérdidas económicas, y algunas de las metodologías propuestas se basan en la obtención de péptidos antimicrobianos.

Entre los avances que se han presentado, Rojas⁽¹⁰⁾ realizó un estudio donde utilizó un cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) proveniente de Ecuador y Perú, en el cual se aislaron e identificaron genes que codificaban péptidos con un uso potencial en el control biológico de *Phytophthora infestans*.

Maróti et al⁽¹¹⁾, realizaron un estudio donde se dio a conocer los diversos roles de los Péptidos antimicrobianos (AMP). Actualmente, se sabe que son sintetizados por el ribosoma y son antibióticos naturales, se encuentran en todas las formas de vida y su rol principal está en la respuesta inmune innata ya que son muy buenos efectores.

Estudios recientes plantean el uso terapéutico de los péptidos antimicrobianos, ya que, a diferencia de los antibióticos que se utilizan actualmente, estos no tienen solo una zona específica para actuar. No obstante, como plantea Maróti

et al⁽¹¹⁾, es necesario evaluar si el hecho de que se genere una resistencia contra AMP sintéticos puede afectar a los naturales.

Posteriormente, Holaskova⁽¹²⁾ et al presentaron algunas metodologías para la expresión de péptidos antimicrobianos, entre ellas generar plantas transplastómicas que presenten una mayor expresión funcional de los péptidos antimicrobianos. Otra estrategia para la expresión de AMP es la acumulación de éstos en las semillas de granos, lo cual podría convertirlos en biofármacos comestibles.

Lipsky et al⁽¹³⁾ presentaron una metodología eficaz para la observación de los efectos de los péptidos antimicrobianos implementados en modelos vegetales; en su estudio lograron demostrar que la introducción del péptido Tachypleisin a las especies *Ornithogalum dubium* y *O. thyrsoides* ocasionaba una reducción en la proliferación bacteriana, su colonización y los síntomas que produce la enfermedad de la pudrición blanda.

4. MARCO REFERENCIAL.

4.1. Inmunología de las plantas.

Las plantas están constantemente expuestas a múltiples fitopatógenos en los que se incluyen virus, bacterias, hongos y oomicetos (Figura 1), los cuales son de preocupación en la industria agrícola; además, las enfermedades causadas en las plantas por estos microorganismos representan una amenaza importante y persistente para las reservas de alimentos a nivel mundial⁽¹⁴⁾.

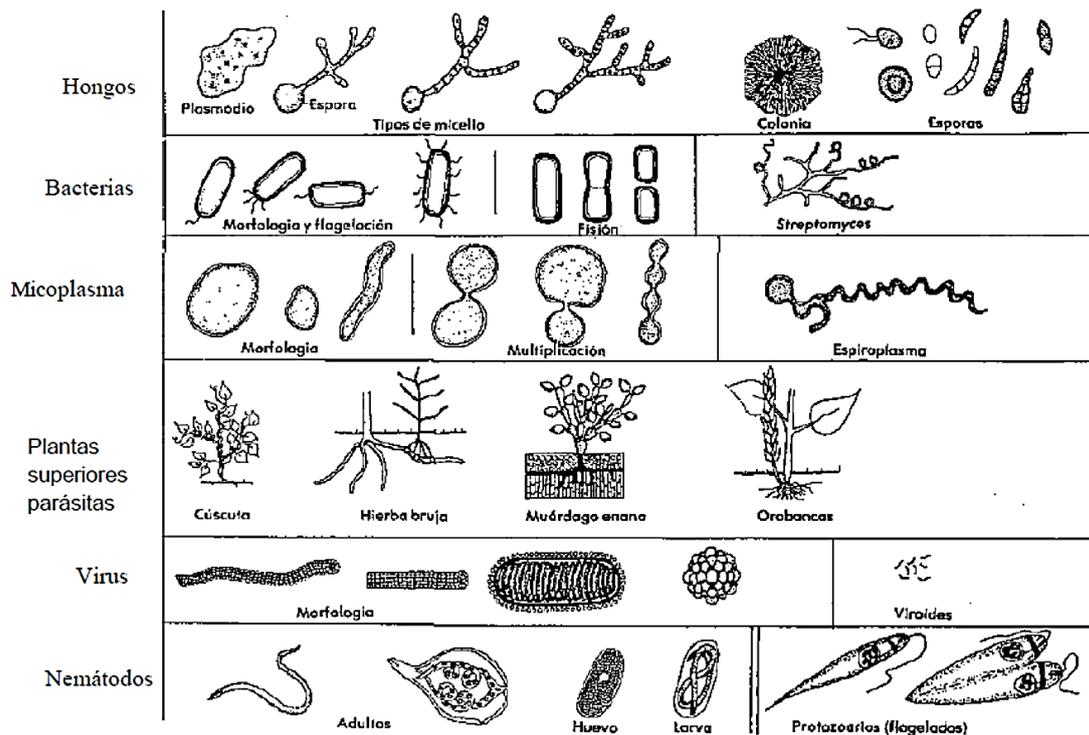


Figura 1: Morfología y división de grupos de fitopatógenos ((15): p. 8)

La inmunidad es una característica desarrollada principalmente por organismos multicelulares, la cual busca combatir infecciones que comprometan la calidad de vida del individuo afectado por medio de diversos mecanismos que varían de acuerdo a la especie; en las plantas la repuesta ante una infección se desencadena cuando los receptores celulares reconocen las proteínas microbianas (efectores)⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾.

Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de defensa; entre ellos, las barreras físicas como la formación de capas de corcho que se caracterizan por inhibir el avance y las sustancias que libera el patógeno e igualmente el paso de

nutrientes a la zona afectada, por lo tanto, esta capa de células ocasiona lesiones necróticas que posteriormente se desprenden⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾.

Las capas de abscisión son una estructura histológica de defensa que se forma sobre las hojas más jóvenes, esta capa genera una abertura entre dos capas de células foliares, lo cual separa la zona afectada por el patógeno de la parte sana de la hoja, luego la lámina central ubicada entre las capas de células foliares se disuelve y ocasiona que la zona central se separe del resto de la hoja, llevándose de esta manera el patógeno.⁽¹⁵⁾

La formación de tálides se presenta en los vasos xilemáticos, Agrios explica que son un crecimiento excesivo del protoplasto de las células parenquimatosas adyacentes, por lo cual se genera una obstrucción en la zona, evitando el paso del patógeno, por otro lado, los depósitos de sustancias gomosas son producidos en las áreas lesionadas de las plantas infectadas, dando lugar a una barrera impenetrable para el patógeno, el cual queda aislado y privado de nutrientes⁽¹⁵⁾.

Igualmente, las plantas poseen defensas bioquímicas que pueden ser preexistentes, estas se pueden equiparar a la primera línea de defensa de los humanos, es decir, las barreras físicas como piel y mucosas; en el caso de las plantas, estas barreras físicas están determinadas por la cera que se encuentra sobre sus hojas, el grosor de la cutícula, la forma de sus estomas y la estructura de su pared celular⁽¹⁵⁾

Dentro de las defensas bioquímicas que son inducidas por patógenos se encuentra la síntesis de metabolitos secundarios como lo son fenoles, derivados sustituidos con oxígeno, terpenoides, quininas, taninos, y péptidos antimicrobianos⁽¹⁾.

Las plantas solo poseen inmunidad innata y se han caracterizado dos ramas claves en su sistema inmune; la primera, conformada por la inmunidad disparada por el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) y susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS, del inglés *Effector Triggered Susceptibility*), y la segunda, inmunidad desencadenada por efectores (ETI, del inglés *Effector Triggered Immunity*)⁽¹⁴⁾.

La inmunidad desencadena por PAMP (PTI, del inglés *Pattern-Triggered Immunity*) se caracteriza por presentar una interacción con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR); además, es considerado el responsable de la resistencia no específica del huésped. Cuando los patógenos logran suprimir esta primera barrera la planta activa lo que se conoce como ETS, que en pocas palabras se puede considerar una respuesta de hipersensibilidad por parte de la planta⁽⁸⁾.

4.1.1. Receptores y respuesta inmunológica.

A través de la interacción planta-patógeno, la evolución ha permitido que algunos cultivos desarrollaran proteínas de resistencia que se activan al reconocimiento del patógeno y, de esta manera, desencadenan una serie de reacciones moleculares que permiten generar una respuesta inmune favorable⁽⁹⁾⁽¹⁸⁾.

Las interacciones planta-patógeno involucran dos procesos de comunicación, las plantas pueden reconocer e inducir estrategias de defensas contra patógenos, mientras estos pueden amenazar las funciones fisiológicas y contraatacar los mecanismos de defensa de las plantas⁽¹⁴⁾.

Es importante resaltar que la respuesta inmune de las plantas involucra reacciones específicas dependiendo de las características del patógeno, (i) los virus se introducen directamente por daño mecánico o inducidos por un vector en el citosol de la célula donde liberan su genoma, proteínas estructurales y lípidos (en el caso de ser virus envueltos); (ii) las biomoléculas de las bacterias relacionadas a su virulencia son expulsadas por los sistemas de secreción tipo II,III,IV para interactuar con las células de la planta hospedera; (iii) patógenos filamentosos (Eumycota hongos verdaderos y Oomycetes crecimiento similar al de los hongos, también conocidos como *water molds*) liberan una serie de biomoléculas en el apoplasto de la planta y su citosol. En oposición a la primera barrera de las plantas, los patógenos filamentosos secretan enzimas que degradan la pared celular (CWDE), y las plantas en respuesta al daño en su pared celular, fortalecen/reprograman la pared celular secretando inhibidores de CWDE⁽¹⁴⁾.

La invasión de la mayoría de fitopatógenos es percibida por proteínas transmembranales llamadas PRR, las cuales detectan moléculas derivadas de

los microorganismos conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), la PTI no solo se activa por el reconocimiento de PAMP, también se desencadena por señales endógenas de la planta que se liberan durante la invasión de los patógenos, lo cual se denomina patrones moleculares asociados al daño (DAMP, del inglés *Damage Associated Molecular Patterns*)⁽¹⁴⁾⁽¹⁹⁾.

Recientemente, se han descrito cerca de 235 receptores con dominios de proteína cinasa y RRL (repetidos ricos en Leucina), los cuales junto con otros componentes, permiten a la planta iniciar una cadena de señalización activada por los PAMP⁽⁹⁾.

La primera línea de defensa de las plantas se desencadena a través del reconocimiento de los PAMP por medio de los PRR. Algunos patógenos liberan una plétora de efectores (Moléculas secretadas por los patógenos que modulan los mecanismos celulares del hospedero y su fisiología) que suprime PTI a través de proteínas de susceptibilidad (S) (efectores diana), permitiendo la invasión de las células del hospedero y activando la inmunidad desencadenada por efectores (ETI)⁽¹⁴⁾.

En respuesta a los efectores las plantas desarrollan una segunda línea de receptores, codificados por genes de resistencia (R), que son activados por la vía específica de reconocimiento del efector afín o las proteínas de avirulencia del patógeno (Avr) activando ETI; PTI involucra PAMP que están evolutivamente conservados en los microorganismos, ETI por el contrario es altamente específico a patógenos que secretan un único efector o un producto Avr. ETI ocasiona la programación de muerte celular localizada, esto es conocido como la respuesta de hipersensibilidad (HR) que restringe el paso del patógeno. Para detener la infección PTI y ETI inducen la expresión de un rango de péptidos antimicrobianos (AMP), proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), proteínas que inhiben síntesis ribosomal (RIP) y metabolitos secundarios de defensa⁽¹⁴⁾⁽²⁰⁾.

4.2. Péptidos antimicrobianos.

Estos compuestos están agrupados en familias dependiendo su composición estructural, además, pueden ser clasificados como proteínas promiscuas debido a su habilidad de interactuar con diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos, levaduras, virus y protozoos⁽¹⁾⁽²¹⁾.

Los AMP poseen una actividad antimicrobiana que provee una fuente de estudio importante, ya que pueden ser utilizados como inmunomoduladores o neutralizando compuestos tóxicos como los lipopolisacáridos (LPS); por tanto, el uso de estos péptidos para aplicaciones clínicas y mejoras en la agricultura es un gran avance para la biotecnología⁽¹⁾⁽²²⁾.

La actividad de los AMP contra organismos patógenos es de amplio espectro, lo cual se atribuye a la presencia de extremos tanto hidrófobos como hidrófilos que facilitan su solubilidad en un ambiente acuoso y al mismo tiempo les permite interactuar con la bicapa lipídica de la membrana bacteriana⁽²³⁾⁽²⁴⁾.

La mayoría de AMP conocidos actúan por la formación de poros en la membrana su carga positiva les permite interactuar con la carga negativa de la membrana fosfolipídica de la célula microbiana, esto ocasiona una disrupción que termina en la muerte de la célula microbiana⁽²³⁾.

Se proponen tres modelos principales que explican este fenómeno, el modelo de *barrel-stave*, el modelo *wormhole* (o toroidal) y el modelo *carpet*, en el mecanismo *barrel-stave*, el extremo hidrofílico de los amp queda en la superficie de la membrana celular y genera el poro. En el mecanismo de *wormhole*, a través de las interacciones electrostáticas entre los principales grupos de fosfolípidos y de los residuos hidrófilos de los AMP, la membrana es “doblada” y esto ocasiona el poro. En el mecanismo *carpet*, los péptidos actúan como detergentes, cubriendo la membrana, esta “alfombra” de moléculas causa un desplazamiento de los fosfolípidos, cambian las propiedades de la membrana y finalmente la rompen⁽²⁵⁾.

Los péptidos antimicrobianos de las plantas son ubicuos en la naturaleza, presentan un amplio espectro y rápida acción frente a los microorganismos, baja citotoxicidad en los animales, igualmente su potencial antimicrobiano no afecta negativamente al medio ambiente⁽²⁶⁾.

La mayoría de los péptidos antimicrobianos presentan una estructura helicoidal (Figura 2), son pequeños de aproximadamente 10kDa, ricos en cisteína, catiónicos y parcialmente hidrofóbicos. Las principales familias que han sido estudiadas son las defensinas, tioninas, las proteínas de transferencia de lípidos (LTP), los ciclótidos, los péptidos parecidos a la Heveina (*Hevein-like peptides*), las proteínas anudadas (*Knotting-like peptides*), los *Snakins*, los *Shepherdins*, péptidos 2S parecidos a la albumina (*2S albumin-like peptides*), Ib-AMP1 y pequeños inhibidores de proteinasa (Figura 3) ⁽²⁶⁾ ⁽²⁴⁾

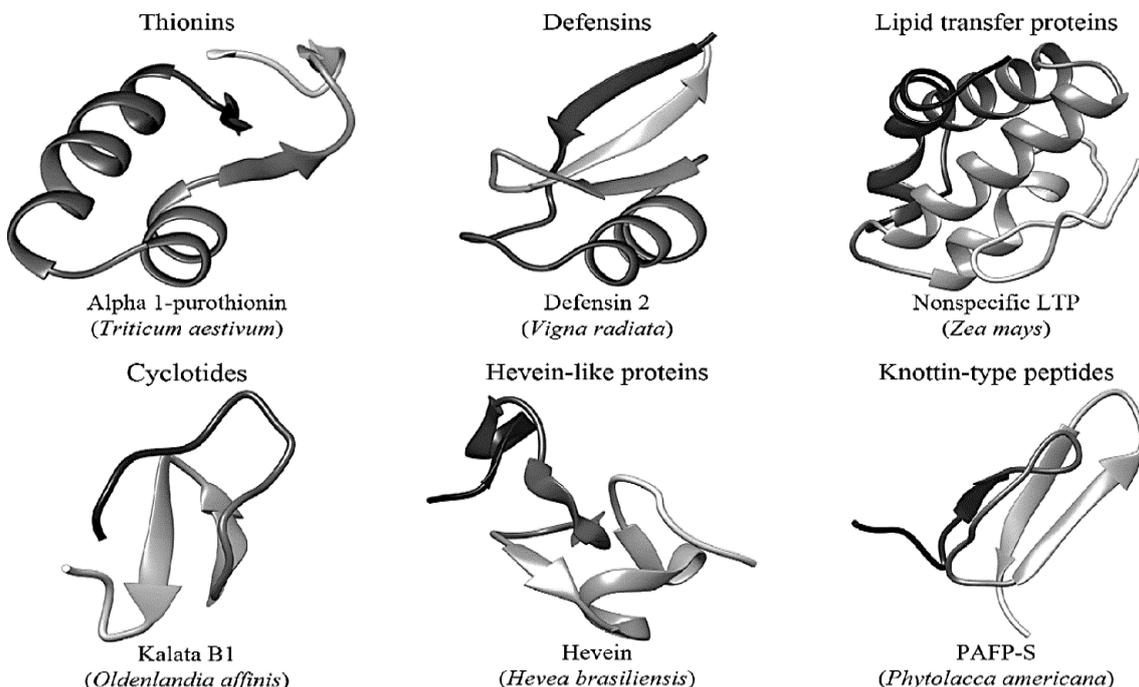


Figura 2: Estructura tridimensional de diferentes familias de péptidos antimicrobianos. Se observa la estructura helicoidal característica de alguna de la familia de péptido antimicrobiano como las defensinas, tioninas, las proteínas de transferencia de lípidos (LTP), los ciclótidos, los péptidos parecidos a la Heveina, entre otros ((25): p. 182)

4.2.1. Tipos de Péptidos antimicrobianos.

Tioninas: Es una familia de péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular (5kDa), ricos en residuos de arginina, lisina y cisteína, tienen carga positiva y pH neutro. Actúan frente a bacterias, hongos y levaduras. Su mecanismo de acción frente a las bacterias aún se desconoce, pero se cree que realizan una lisis en la membrana; en cuanto a su actividad contra los hongos, realizan una relación entre las proteínas de la membrana que por medio de interacciones electrostáticas entre las tioninas con carga positiva y los fosfolípidos cargados

negativamente de la membrana de los hongos, esto genera poros en la superficie de la membrana ocasionando la lisis celular⁽²⁵⁾.

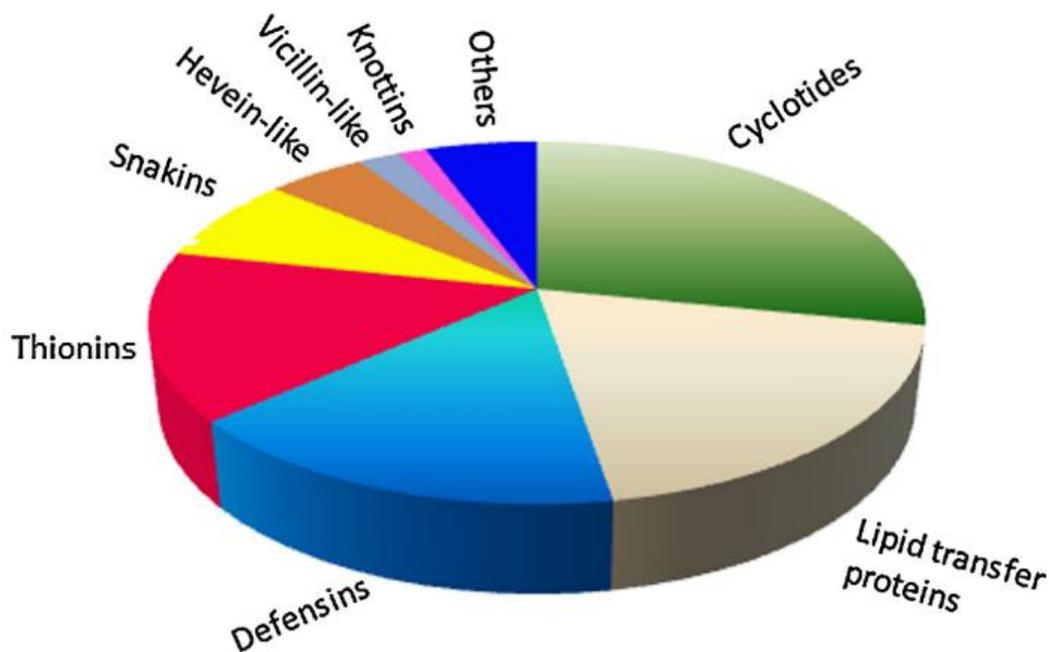


Figura 3: Distribución de la diferentes familias de péptidos antimicrobianos, de acuerdo a las principales clases encontradas. ((23): p. 3)

Defensinas: tienen un peso molecular de aproximadamente 5kDa, ricos en cisteína, con un rango de 45 a 54 aminoácidos, poseen carga positiva. Las actividades biológicas de las defensinas incluyen antifúngica, antibacteriana, proteínasa y son inhibidoras de la amilasa de los insectos. Se cree que las defensinas usan glucosilceramidas como receptores para interactuar con la membrana de los hongos e ingresar en ella, una vez esto ocurre se desestabiliza la membrana⁽²⁵⁾⁽²⁷⁾

LPS: Las proteínas de transferencia de lípidos se han encontrado en una amplia variedad de plantas monocotiledoneas y dicotiledoneas, su peso molecular oscila entre 7 y 9 kDa, participan en la biogénesis de membrana, presentan actividad frente a fitopatógenos, ayudan a las plantas a adaptarse a las condiciones ambientales, entre otros, los LPS probablemente se insertan en la membrana ocasionando poros que la desestabilizan originando su lisis⁽²⁵⁾⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾.

Snakins: estos péptidos han sido aislados de la papa, estos péptidos antimicrobianos constan de residuos 63 aminoácidos, todos tienen 12 residuos conservados de cisteína y seis puentes disulfuro, aunque se sabe que participan en las vías de señalización hormonal de las plantas, su rol es poco conocido e igualmente se desconoce su mecanismo de acción frente a los fitopatógenos⁽²⁵⁾⁽³⁰⁾⁽³¹⁾.

Ciclótidos: Son proteínas circulares encontradas en plantas, animales y bacterias, son antimicrobianos, insecticidas, antihelmínticos y molusquicidas, además se ha encontrado que un ciclótido aislado de *Viola tricolor* posee efectos citotóxicos frente a células de linfoma y mieloma humano⁽²⁵⁾⁽³²⁾.

Péptidos parecidos a la Heveina: son péptidos antimicrobianos de un peso molecular de 4.7kDa, ricos en cisteína, este péptido inhibe el crecimiento de las hifas de los hongos porque es capaz de unirse a la quitina⁽²⁵⁾.

Los péptidos parecidos a la Heveina están siendo estudiados para aplicaciones biotecnológicas incluida la agronomía y la veterinaria. Expresiones heterólogas de los péptidos parecidos a la Heveina incrementan la resistencia de plantas como el tomate, tabaco y arabis a infecciones fúngicas. Las plantas pueden ser enriquecidas con los péptidos parecidos a la Heveina, pueden ser usados como pesticida natural o para producir semillas con genotipos resistentes a patógenos específicos⁽²⁶⁾.

4.2.2. Rol de los péptidos antimicrobianos (AMP) en la respuesta inmunológica de las plantas.

Los AMP pueden actuar contra hongos, bacterias y virus envueltos, inhiben hidrolasas de insectos, además actúan como antiviral, antitumoral, antiinflamatorio e inmunomodulador⁽²⁶⁾⁽³³⁾

Los AMP son sintetizados por el ribosoma y son antibióticos naturales. Se encuentran en todas las formas de vida y su rol principal está en la respuesta inmune innata, ya que son muy buenos efectores. En algunos casos funcionan

en el mantenimiento de la homeostasis o la simbiosis entre los organismos con su microbiota, principalmente en la intestinal. Estudios recientes plantean el uso terapéutico de los péptidos antimicrobianos ya que estos a diferencia de los antibióticos que se utilizan actualmente no tienen solo una zona específica para actuar. No obstante es necesario evaluar si el hecho de que se genere una resistencia contra AMP sintéticos puede afectar a los naturales⁽¹¹⁾⁽³⁴⁾.

4.3. Marchitez bacteriana.

La marchitez bacteriana es una enfermedad causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, representa una de las enfermedades tropicales que ocasionan mayores pérdidas en la agricultura debido a que tiene un amplio rango de variedades que afectan alrededor de 200 especies de plantas⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾.

Los primeros síntomas que se presentan durante la infección de *R. solanacearum*, es la marchitez o pudrición de las hojas más jóvenes del cultivo; durante las horas del día con mayor temperatura, la infección se propaga rápidamente a otras estructuras de la planta generando lesiones cloróticas en las hojas; otro síntoma característico de esta patología es el retraso en el crecimiento de la planta afectada y algunos tallos o estolones pueden presentar rayas marrón oscuro, es decir, un oscurecimiento vascular a lo largo del tallo que puede ocasionar que esta estructura se quiebre. Los síntomas pueden ocurrir en cualquier estadio de crecimiento de la planta; a veces, en los cultivos de *Solanum lycopersicum* se presenta luego de que la planta ha dado frutos y luego colapsa rápidamente⁽³⁵⁾.

Después de la entrada de *R. solanacearum* al cultivo susceptible, se desarrolla la infección en la planta; primero, la bacteria coloniza la corteza y, posteriormente, los vasos xilemáticos propagándose por toda la planta. Las masas bacterianas interrumpen el flujo de agua desde las raíces a las hojas, resultando en la marchitez de la planta. La severidad de la enfermedad depende del tipo, temperatura y humedad del suelo (lo cual influye en el desarrollo del microorganismo), los hospederos susceptibles y la virulencia de las cepas. Las altas temperaturas (30-35°C) y humedad son los principales factores asociados con la alta incidencia y severidad de la marchitez bacteriana⁽⁷⁾.

4.3.1. *Ralstonia solanacearum*

La marchitez bacteriana es de difícil control por las características que presenta *R. solanacearum*, bacilo Gram negativo que se encuentra distribuido en los cinco continentes geográficos; en el suelo puede durar cuatro años con capacidad de producir marchitez bacteriana, incluso si ha estado con escasez de nutrientes y/o a bajas temperaturas en ambientes acuáticos⁽³⁷⁾.

La bacteria se puede diseminar por medio de semillas contaminadas, escorrentía, proximidad entre las raíces de las plantas susceptibles, insectos, herramientas contaminadas y suelo contaminado. *R. solanacearum* se clasifica en cinco razas y cinco biovars, y los cultivos de *Solanum lycopersicum* se ven afectados por la raza 3⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾.

4.3.2. Péptidos antimicrobianos como potencial control de la marchitez bacteriana.

En la agricultura se buscan estrategias adecuadas para realizar el control de plagas y enfermedades con el fin de obtener alimentos que presenten los estándares de calidad del país, además, es importante que las técnicas empleadas para dicho control cumplan con las normas del cuidado ambiental⁽²⁶⁾

Debido al incremento de microorganismos resistentes a los mecanismos convencionales de control de fitopatógenos, se han realizado nuevas investigaciones enfocadas en áreas poco exploradas como lo son los péptidos antimicrobianos⁽²⁶⁾.

El uso de AMP como agentes terapéuticos está siendo altamente estudiado debido a su amplio espectro, rápida actividad, baja citotoxicidad en células animales y la dificultad para los patógenos de generar resistencia contra éstos; dichas características abren una gran posibilidad para su uso en medicina y agricultura⁽¹²⁾.

La producción y aislamiento correcto de los péptidos antimicrobianos para su uso en avances científicos se dificulta debido a su pequeño tamaño; las herramientas

proteómicas han sido capaces de aislar efectivamente péptidos antimicrobianos de bajas concentraciones presentes en los tejidos de diversos organismos, otros avances en biotecnología proponen el uso de biorreactores vegetales, es decir, plantas como plataformas para la producción de péptidos, proteínas y fármacos⁽¹²⁾.

Las plantas transplastómicas presentan una mayor expresión funcional de los péptidos antimicrobianos. Otra estrategia para la expresión de AMP es la acumulación de éstos en las semillas de granos, lo cual podría convertirlos en biofármacos comestibles⁽¹²⁾⁽²⁶⁾.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

El presente trabajo es de tipo cuantitativo, exploratorio y correlacional. Tiene como propósito el uso de herramientas bioinformáticas, que permitan la búsqueda de regiones homologas a péptidos antimicrobianos en el genoma de *Solanum lycopersicum* con acción frente a *Ralstonia solanacearum*.

Tabla 1: Universo, población, muestra y variable.

Universo	Población	Muestra	Variable
Genoma de <i>Solanum lycopersicum</i>	Genes de <i>Solanum lycopersicum</i> relacionados con resistencia	Genes de <i>Solanum lycopersicum</i> homólogos a Defensinas	Regiones homólogas a péptidos antimicrobianos con acción frente a <i>Ralstonia solanacearum</i> provenientes de <i>Solanum lycopersicum</i>

5.1. Hipótesis:

La búsqueda de regiones homólogas a péptidos antimicrobianos a través de herramientas bioinformáticas, permite el diseño de un péptido con potencial acción frente a *Ralstonia solanacearum*.

5.2. Técnicas y procedimientos:

Se emplearon diversas bases de datos y herramientas bioinformáticas para la realización de este estudio.

5.2.1. Búsqueda de péptidos antimicrobianos con acción frente a *Ralstonia solanacearum*.

Las bases de datos utilizadas fueron DAMPD, DBAASP, CAMPR3 y CAMP (<https://labworm.com/category/protein-peptide/antimicrobial-peptide>), las cuales cuentan con una amplia colección de péptidos antimicrobianos provenientes de diferentes organismos. Para esta investigación, se emplearon únicamente péptidos antimicrobianos procedentes de plantas y que estuvieran validados experimentalmente.

5.2.2. Traducción de los péptidos antimicrobianos a nucleótidos.

Para la traducción inversa de los péptidos se utilizó la herramienta *Reverse translate*, encontrado en SMS (Sequence Manipulation Suite) (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html) este programa permite introducir la secuencia de un péptido o una proteína, luego utiliza una tabla de codones para generar la secuencia más probable de ADN que represente la región codificante no degenerada.

5.2.3. Selección de genes de *Solanum lycopersicum*

Se usaron 256 genes de *Solanum lycopersicum* registrados en la NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y en la CNGB (China National GeneBank) (<https://www.cnbg.org/home.html>).

5.2.4. Lectura de secuencias.

El análisis de las secuencias nucleotídicas fue realizado utilizando la herramienta bioinformática de alineamientos *Multiple Sequence Alignment* (MUSCLE) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) además, se empleó *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para el alineamiento de secuencias de péptidos, debido a que el programa es capaz de comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.

5.2.5. Predicción de estructura de los péptidos.

La estructura tridimensional del péptido D1 se realizó a través de I-TASSER (<https://zhanqlab.ccmb.med.umich.edu/>)

5.2.6. Análisis de la secuencias homologas

La base de datos *The Antimicrobial Peptide Database* (APD) (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) por medio de su herramienta APD3 predice y calcula si una secuencia de aminoácidos corresponde a un péptido antimicrobiano

6. RESULTADOS

Se hallaron tres AMP tipo Defensinas (D1, D2, D5) con acción frente a *Ralstonia solanacearum* de *Spinacia oleracea* (espinaca), los cuales tienen como característica común su acción frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas; sin embargo, el objetivo cambia de acuerdo al péptido, además D2 también posee acción antifúngica. (Tabla 2)

Tabla 2: Péptidos antimicrobianos de *Spinacia oleracea* que presentan acción frente a *Ralstonia solanacearum*

Título:	Antimicrobial peptide D1			
Identificador GenInfo:	26393026			
Fuente:	Spinacia oleracea [Spinach]			
Taxonomía:	Viridiplantae			
NCBI taxonomía:	3562			
UniProt:	P81572			
PubMed:	9762899			
Longitud:	22			
Actividad:	Antibacterial			
Gram Nature:	Gram+ve, Gram-ve			
Objetivo:	<i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i>			
Validado:	Experimentally Validated			
Pfam:	PF00304 : (Gamma-thionin family)			
InterPro:	IPR008176 : Gamma-thionin. IPR003614 : Scorpion_toxin-like.			
AMP Familia:	Defensin			
Firma:	--0--			
Ontología del Gen:	GO ID	Ontology	Definition	Evidence
	GO:0042742	Biological Process	Defense response to bacterium	IEA
	GO:0050832	Biological Process	Defense response to fungus	IEA
	GO:0031640	Biological Process	Killing of cells of other organism	IEA
Secuencia:	XTCESPSHKFKGPCATNRNCES			
Título:	Defensin D5			
Identificador GenInfo:	----0----			
Fuente:	Spinacia oleracea [Spinach]			
Taxonomía:	Viridiplantae			

NCBI taxonomía:	3562			
UniProt:	P81568			
PubMed:	9762899			
Longitud:	24			
Actividad:	Antibacterial, Antifungal			
Gram Nature:	Gram+ve, Gram-ve			
Objetivo:	<i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Bipolaris maydis</i> , <i>Colletotrichum lagenarium</i>			
Validado:	Experimentally Validated			
Pfam:	--0--			
InterPro:				
AMP Familia:	Defensin			
Firma:	ID	Type	Pattern / HMM	T. Length
	CAMPDefH24	HMM		24
Ontología del Gen:	GO ID	Ontology	Definition	Evidence
	GO:0005618	Cellular Component	Cell wall	IEA
	GO:0005576	Cellular Component	Extracellular region	IEA
	GO:0042742	Biological Process	Defense response to bacterium	IEA
	GO:0050832	Biological Process	Defense response to fungus	IEA
	GO:0031640	Biological Process	Killing of cells of other organism	IEA
Secuencia:	MFFSSKKCKTVSKTFRGPCVRNAN			
Título:	Antimicrobial peptide D2			
Identificador GenInfo:	26393023			
Fuente:	Spinacia oleracea [Spinach]			
Taxonomía:	Viridiplantae			
NCBI taxonomía:	3562			
UniProt:	P81571			
PubMed:	9762899			
Longitud:	52			
Actividad:	Antibacterial, Antifungal			
Gram Nature:	Gram+ve, Gram-ve			
Objetivo:	<i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>F.culmorum</i>			
Validado:	Experimentally Validated			
Pfam:	PF00304 : (Gamma-thionin family)			
InterPro:	IPR008177 : G_Purothionin. IPR008176 : Gamma-thionin. IPR003614 : Scorpion_toxin-like.			
AMP Familia:	Defensin			

Firma:	ID	Type	Pattern / HMM	T. Length
	CAMPDefH24	HMM		24
Ontología del Gen:	GO ID	Ontology	Definition	Evidence
	GO:0005618	Cellular Component	Cell wall	IEA
	GO:0005576	Cellular Component	Extracellular region	IEA
	GO:0042742	Biological Process	Defense response to bacterium	IEA
	GO:0050832	Biological Process	Defense response to fungus	IEA
	GO:0031640	Biological Process	Killing of cells of other organism	IEA
Secuencia:	GIFSSRKCKTPSKTFKGICTRDSNCDTSCRYEGYPAGDCKGIRRRRCMC SKPC			

Fuente: CAMP (Collection of Anti-Microbial Peptides)

Se realizó la traducción inversa de la secuencia de cada péptido brindada por la base de datos CAMP para hacer el posterior alineamiento con diversos genes del tomate. (Tabla 3).

Tabla 3: Traducción inversa de los péptidos antimicrobianos seleccionados

Péptido	Secuencia nucleotídica
Antimicrobial peptide D1	acctgcgaaagcccagccataaattaaaggcccgtgcgacgaaccgcaactgcgaa agc
Antimicrobial peptide D2	ggcatttttagcagccgcaaatgcaaaaccccagcaaaaccttaaggcatttcacc cgcgatagcaactgcgataccagctgccgctatgaaggctatccggcgggcgattgcaa ggcattcggccgctgcatgtgcagcaaacctgc
Defensin D5	atgttttttagcagcaaaaaatgcaaaaccgtgnnnaaaccttcgcgcccgctgcgtg cgcaacgcgaac*

*la letra n significa que al realizar la traducción no fue posible hallar la identidad de la base nitrogenada que corresponde a esa posición de la secuencia.

Entre los doscientos cincuenta y seis genes de *Solanum lycopersicum* analizados (MUSCLE y BLAST) solo se hallaron tres que presentaban alta

homología (> 66%) con D1, uno de los péptidos encontrados en las bases de datos (Tabla 4); con respecto a los péptidos D2 y D5 no se encontraron regiones homologas en el genoma de *Solanum lycopersicum*.

Tabla 4: Alineamientos de las regiones homologas a péptidos antimicrobianos con acción frente a *Ralstonia solanacearum*.

Péptido	Péptido homologo	Alineación
D1	ADK36631 (defensin-like protein, partial)	<pre> ADK36631 7 D1 GCGCGCACCTGCGAAAGCCAGAGCCATCGCTTTAAAGGCCCGTGCCTGAGCGAAAAAAC -----ACCTGCGAAAGCCCGAGCCATAAATTTAAAGGCCCGTGCAGCAACCGCAAC ***** 69 TCGCGGAGCGTGTGCGAAACCGAAGGCTTTAGCGGCGGCGATTGCCCGGCTTTCCCGCG TCGAAAGC----- **** CGCTGCTTTTGCACCCGCCCGTGC ----- </pre>
D1	CAB42006.1 (gamma-thionin [Solanum lycopersicum])	<pre> CAB42006.1 79 D1 ATGCGCCTGTTTTCGACCATGCTGCTGCTGGCGATGCTGGTGAIGGCGACCGCCCGATG ----- CGCATTTGTGGAAGCGCGCACCTGCGAAAGCCAGAGCCATCGCTTTAAAGGCCCGTGCCTG -----ACCTGCGAAAGCCCGAGCCATAAATTTAAAGGCCCGTGCAGCG ***** 141 AGCGAAAAAACTGCGCGAGCGTGTGCGAAACCGAAGGCTTTAGCGGCGGCGATTGCCGC ACCAACCGCAACTGCGAAAGC----- * * * ***** GGCTTTCGCGCGCGCTGCTTTTGCACCCGCCCGTGC ----- </pre>
D1	NP_001234872.2 (gamma-thionin precursor)	<pre> NP_001234872 D1 ATGGCGAACAGCATGCGCCTGTTTTCGACCAATGCTGCTGCTGGCGAIGCTGGTGAIGGCG ----- ACCGGCCCGATGCGCATTTGTGGAAGCGCGCACCTGCGAAAGCCAGAGCCATCGCTTTAAA -----ACCTGCGAAAGCCCGAGCCATAAATTTAA ***** 153 GGCCCGTGCCTGAGCGAAAAAACTGCGCGAGCGTGTGCGAAACCGAAGGCTTTAGCGGC GGCCCGTGCAGCAACCGCAACTGCGAAAGC----- ***** * * * ***** GCGAATGCCCGCGCTTTCCCGCGCGTGTGCTTTTGCACCCGCCCGTGC ----- </pre>

*Lo asteriscos indican las bases nitrogenadas que son idénticas entre D1 y los péptidos de *Solanum lycopersicum*. Los números corresponden a las posiciones de los nucleótidos de los péptidos homólogos donde inicia y termina la homología con D1.

A continuación se presentan los resultados de los alineamientos realizados en BLAST, Query representa al péptido D1 y sbjct corresponde a lo péptidos homólogos.

Figura 4: Alineamiento péptido D1 con el péptido ADK36631 de *Solanum lycopersicum*

Download ▾ GenPept Graphics					
defensin-like protein, partial [Solanum lycopersicum var. cerasiforme]					
Sequence ID: ADK36631.1 Length: 48 Number of Matches: 1					
Range 1: 3 to 23 GenPept Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match					
Score	Expect	Identities	Positives	Gaps	
46.0 bits(101)	7e-08	14/21(67%)	14/21(66%)	0/21(0%)	
Query 2	TCESPSHKFKGPCATNRNCES	22			
	TCES SH FKGPC NC S				
Sbjct 3	TCESQSHRFKGPCVSEKNCAS	23			

Figura 5: Alineamiento péptido D1 con el péptido CAB42006.1 de *Solanum lycopersicum*

Download ▾ GenPept Graphics					
gamma-thionin [Solanum lycopersicum]					
Sequence ID: CAB42006.1 Length: 72 Number of Matches: 1					
Range 1: 27 to 47 GenPept Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match					
Score	Expect	Identities	Positives	Gaps	
46.0 bits(101)	1e-07	14/21(67%)	14/21(66%)	0/21(0%)	
Query 2	TCESPSHKFKGPCATNRNCES	22			
	TCES SH FKGPC NC S				
Sbjct 27	TCESQSHRFKGPCVSEKNCAS	47			

Figura 6: A Alineamiento péptido D1 con el péptido NP_001297247.1 de *Solanum lycopersicum*

Download ▾ GenPept Graphics					
gamma-thionin precursor [Solanum lycopersicum]					
Sequence ID: NP_001234872.2 Length: 76 Number of Matches: 1					
▶ See 1 more title(s)					
Range 1: 31 to 51 GenPept Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match					
Score	Expect	Identities	Positives	Gaps	
46.0 bits(101)	1e-07	14/21(67%)	14/21(66%)	0/21(0%)	
Query 2	TCESPSHKFKGPCATNRNCES	22			
	TCES SH FKGPC NC S				
Sbjct 31	TCESQSHRFKGPCVSEKNCAS	51			

Luego de obtener los alineamientos, se realizó un esquema de la transcripción y traducción del péptido D1 (Figura 7).

Figura 7: Esquema del proceso de transcripción y traducción del péptido D1.

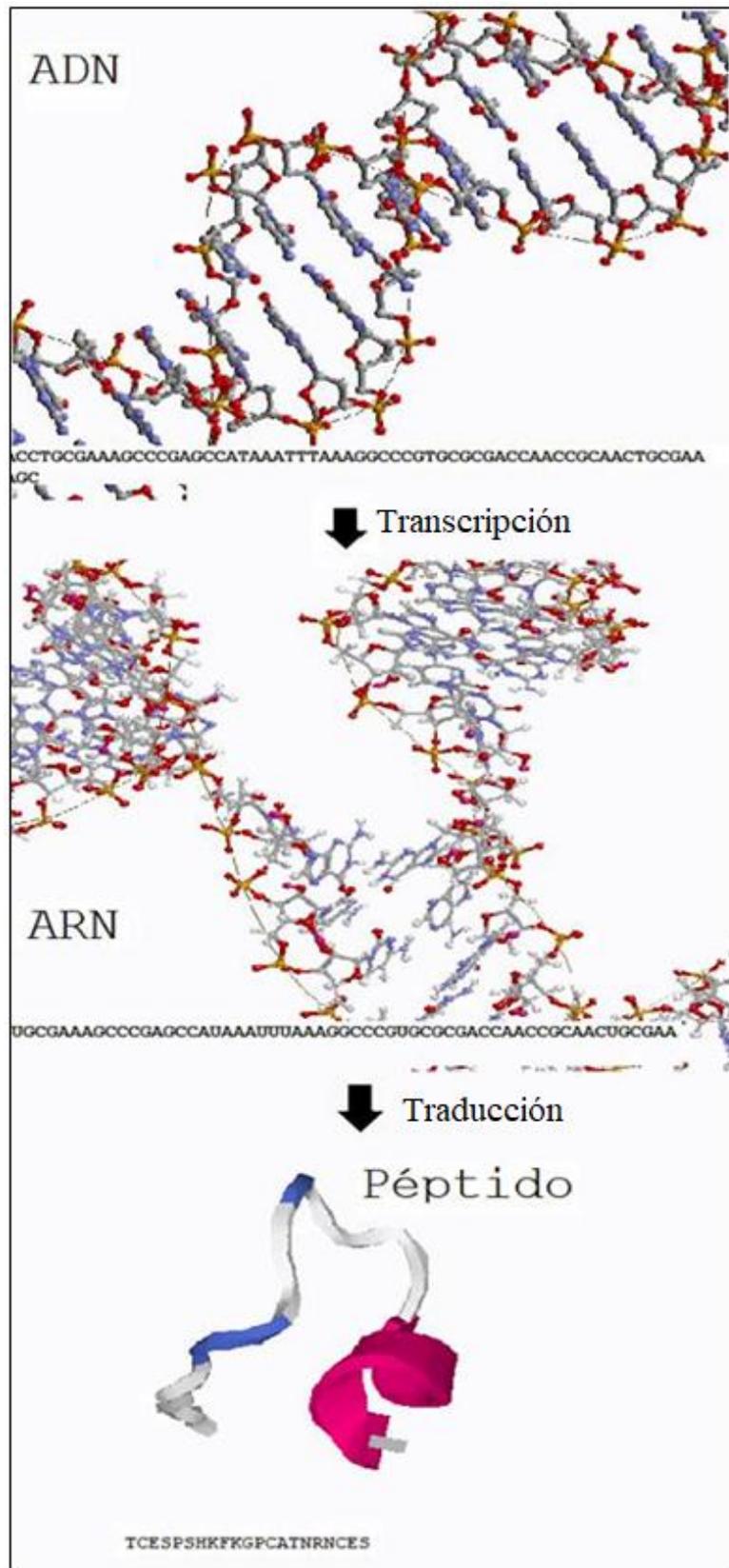


Ilustración realizada por Alexandra Cortés

I-TASSER predijo cinco posibles estructuras, de estas fue elegido el primer modelo ya que presentaba un mejor C.score (Figura 8), además, el programa nos mostraba los posibles sitios de unión de ligando del péptido (Figura 9), posteriormente se analizaron las posiciones donde se presentan cambios de aminoácidos en el péptido D1 en comparación con ADK36631, CAB42006.1, NP_001297247.1 (Figura 10).

Figura 8: Estructura tridimensional del péptido D1

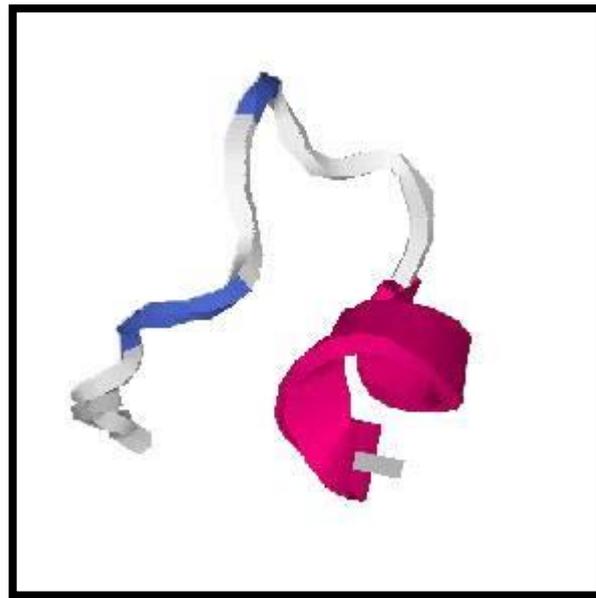
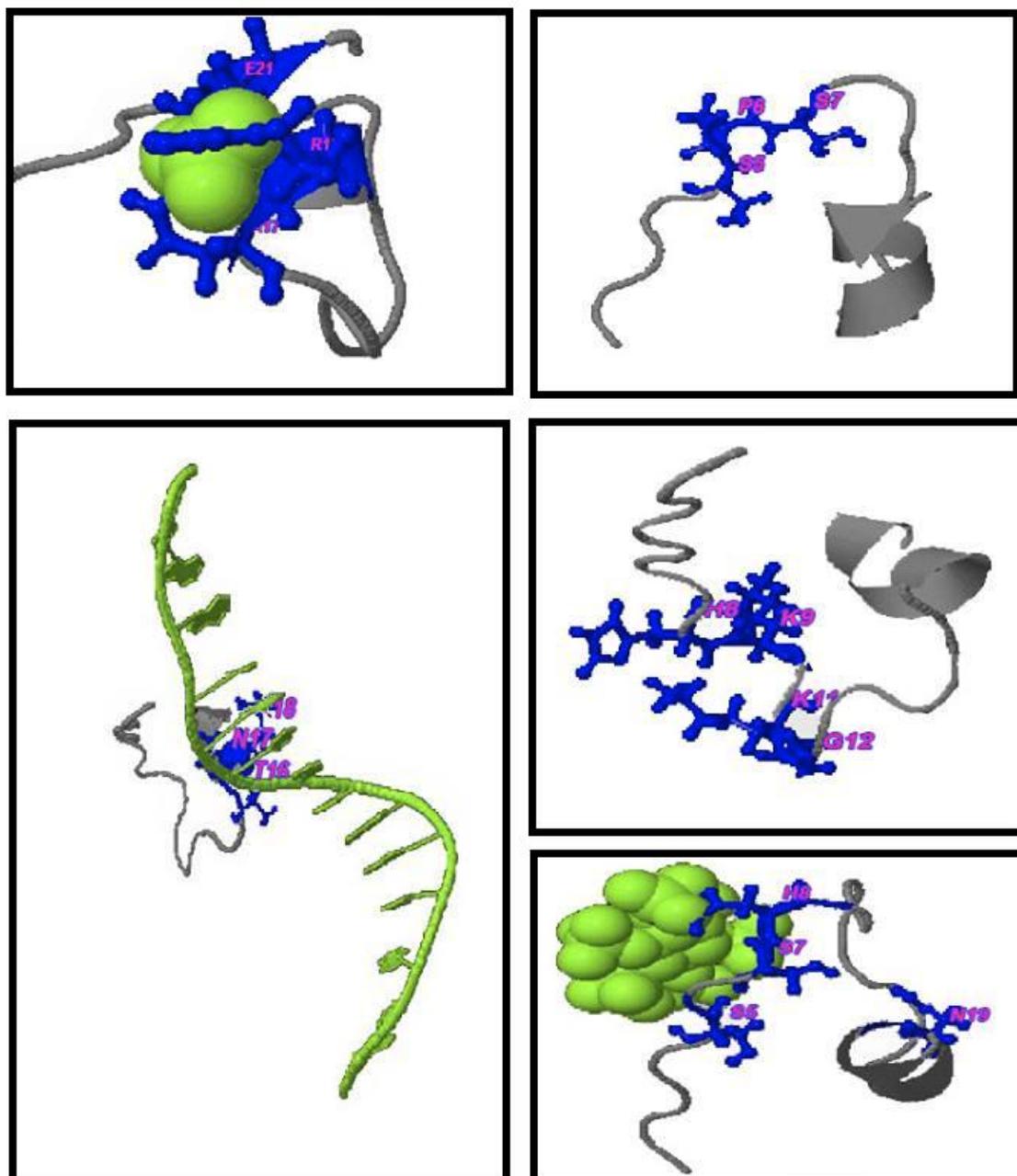


Ilustración realizada por Alexandra Cortés

Figura 9: sitios de unión de ligando en el péptido D1. Ilustración realizada por Alexandra Cortés



Click to view	Rank	C-score	Cluster size	PDB Hit	Lig Name	Download Complex	Ligand Binding Site Residues
<input checked="" type="radio"/>	1	0.14	47	4ev9A	URE	Rep. Mult	17,18,21
<input type="radio"/>	2	0.13	44	1o3tA	Nuc.Acid	Rep. Mult	16,17,18
<input type="radio"/>	3	0.05	20	3d5dP	MG	N/A	5,6,7
<input type="radio"/>	4	0.03	11	1e08D	ZN	N/A	8,9,11,12
<input type="radio"/>	5	0.03	13	4y94C	IHP	Rep. Mult	5,7,8,19

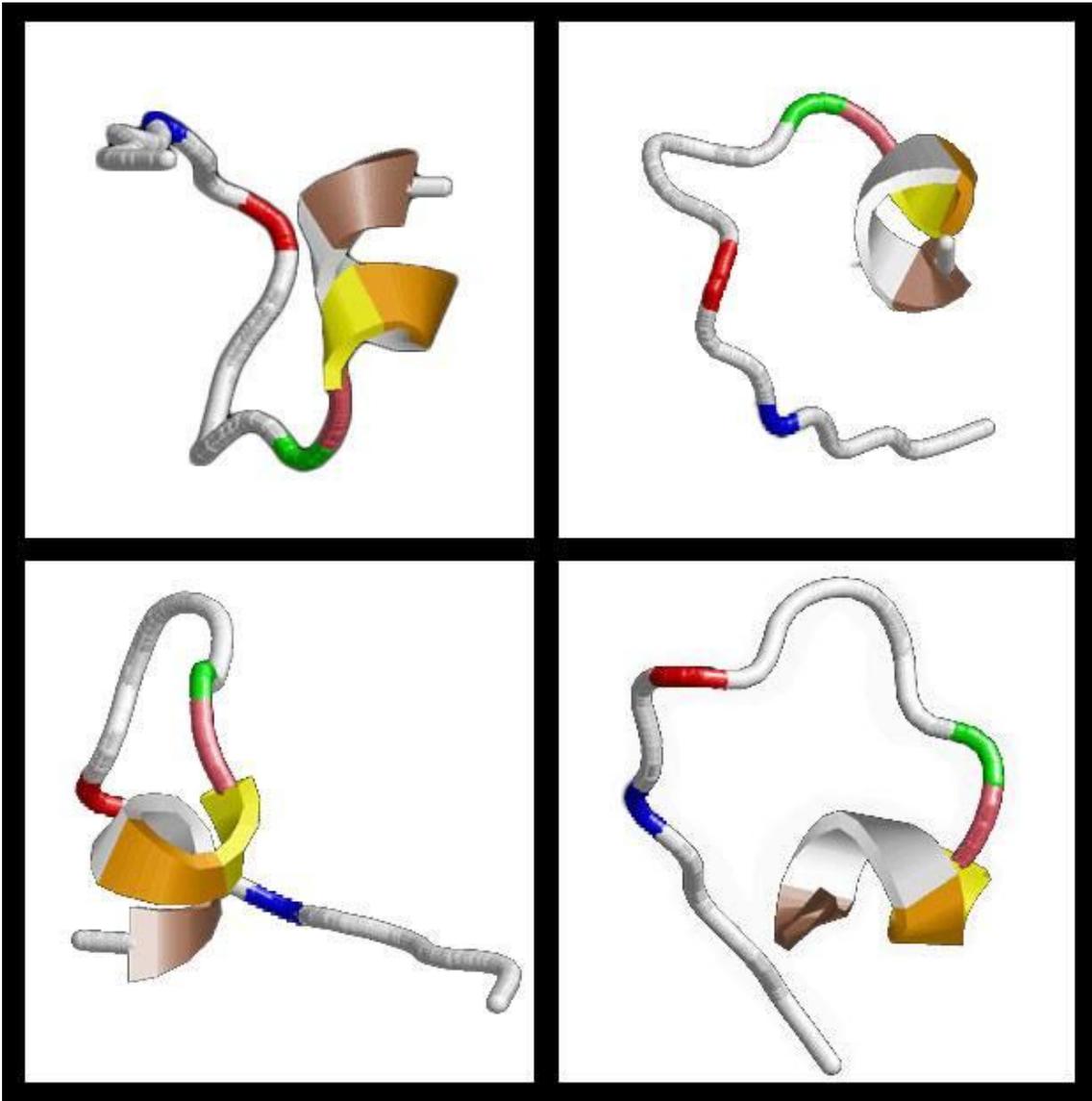


Figura 10: Análisis de los cambios de aminoácidos en el péptido D1.

Ilustración realizada por Alexandra Cortés

Se observaron siete cambios de aminoácidos en las posiciones seis, nueve, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho y veintiuno (figura 8).

Tabla 5: Comparación de las propiedades de los aminoácidos presentes en el péptido D1 y los péptidos homólogos.

Aminoácidos D1	Aminoácidos péptidos homólogos	Propiedades	
Prolina (p)	Glutamina (Q)	Apolar	Polar sin carga
Alanina (A)	Valina (V)	Apolar	Apolar
Lisina (K)	Arginina (R)	Polar ionizable	Polar ionizable
Glutamina (E)	Alanina (A)	Polar Sin carga	Apolar
Treonina (T)	Serina (s)	Polar sin carga	Polar sin carga
Asparagina (N)	Glutamina (E)	Polar sin carga	Polar Sin carga
Arginina (R)	Lisina (K)	Polar ionizable	Polar ionizable

En negrita se observan los aminoácidos que no poseen propiedades iguales.

7. DISCUSIÓN

Por medio de bases de datos de péptidos antimicrobianos se eligieron tres péptidos tipo Defensinas encontrados en *Spinacia oleracea* que han sido validados experimentalmente; según el estudio de Segura et al, este grupo de Defensinas (D1, D2, D5) presentó acción antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre ellas *Ralstonia solanacearum*, motivo por el cual se eligieron estos péptidos para el desarrollo del proyecto, si bien las bases de datos nos arrojaron otras proteínas a las que se les ha identificado acción contra esta bacteria, por ejemplo, RRs1 de *Arabidopsis thaliana*, no cumplían con las características de ser un péptido antimicrobiano.(40)(41)

Posteriormente, se realizó la traducción inversa de los AMP a nucleótidos, para facilitar el alineamiento con los genes escogidos de *Solanum lycopersicum*; por medio del NCBI y el CNGB se escogieron doscientos cincuenta y seis genes relacionados a los procesos de defensa y resistencia del tomate, entre los cuales, noventa y seis están validados y ciento sesenta y cuatro son modelos en proceso de validación o que presentan homologías con algunos genes validados; finalmente, solo se encontró homología con el péptido D1 (67%) en tres secuencias pertenecientes a regiones que codifican para péptidos antimicrobianos (con número de acceso al GeneBank del NCBI ADK36631.1, CAB42006.1 y NP_001234872.2).

En el estudio realizado por Liu G y colaboradores encontraron un péptido antimicrobiano proveniente del veneno de *Mesobuthus martensii*; por medio del análisis de regiones homólogas, descubrieron que el péptido marcin-18 presentaba una alta similitud a los péptidos antimicrobianos meucin-18 y megicin-18, estos ya tenían descritas sus funciones antimicrobianas; posteriormente analizaron la actividad inhibitoria contra bacterias Gram positivas y Gram negativas de marcin-18 y notaron que realizaba una reducción del crecimiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Esto sugiere que las regiones homólogas encontradas en el genoma del tomate, podrían presentar un comportamiento similar al péptido D1 y por tanto, una acción inhibitoria contra *Ralstonia solanacearum*. (42)

Otros estudios, han demostrado la efectividad de los péptidos antimicrobianos en comparación a los medicamentos utilizados actualmente, Cavanagh et al,(43) realizaron un análisis de la acción de la vancomicina versus un péptido antimicrobiano sintético en el tratamiento contra *Staphylococcus epidermidis*, que mostró un efecto más rápido y una mayor reducción de la bacteria por parte del péptido en comparación con la vancomicina; por otro lado, Gao B et al, (44) realizaron un estudio del péptido meucin-25 como potencial antimalárico, al analizar la estructura del péptido se sugiere que podría eliminar intracelularmente al *Plasmodium falciparum*, es decir, no se ven afectadas las células, esto hace que su mecanismo de acción sea mejor que la que presentan los antimaláricos actuales.

Las tres secuencias que alinearon correctamente con el péptido D1 (ADK36631, CAB42006.1, NP_001297247.1) fueron analizadas con la herramienta I-TASSER que predijo cinco posibles estructuras, de estas fue elegido el primer modelo, ya que presentaba un mejor C.score. Se observaron siete cambios de aminoácidos en las posiciones seis, nueve, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho y veintiuno del péptido D1 en comparación con ADK36631, CAB42006.1, NP_001297247.1 (figuras 4, 5, 6).

De acuerdo a la información encontrada en UniProt, el péptido D1 presenta homología con la súper familia *scorpion toxin-like* que pertenecen a un subgrupo de Defensinas, que se caracterizan por presentar péptidos *knottin-like* ricos en cisteína, aminoácido en el cual no se presentaron cambios. (45)(46)

Se analizaron las funciones que presenta el péptido D1 y si los cambios en los aminoácidos podrían afectar su funcionalidad, teniendo en cuenta que la función de los péptidos antimicrobianos está ligada a su carga y solubilidad.(47) Se revisó si los aminoácidos de los péptidos homólogos presentaban propiedades diferentes a los encontrados en las posiciones seis, nueve, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho y veintiuno de D1; solo dos aminoácidos (posiciones seis y veintiuno), mostraron discordancia, sin embargo, al estudiar la secuencia de los péptidos homólogos en APD3, reveló que la estructura de ADK36631,

CAB42006.1 y NP_001297247.1 corresponde a un AMP tipo Defensinas, por tanto, concuerda con el origen del péptido D1.

Khamis et al, estudiaron la estructura de catorce familias de péptidos antimicrobianos, mencionan que las Defensinas son ricas en cisteína y presentan una característica altamente conservada que es la presencia de un puente disulfuro; al realizar la predicción de la estructura en los péptidos homólogos encontrados, se observó que presentan este tipo puente, por tanto, coincide con el péptido D1 y los datos registrados en la literatura.(48)

Varios estudios han demostrado la actividad antibacteriana de esta familia de AMP; el mecanismo de acción de las Defensinas se da por interacciones electrostáticas entre los aminoácidos cargados positivamente con los componentes negativos de la membrana bacteriana. Cuando se analizaron los aminoácidos de los péptidos ADK36631, CAB42006.1, NP_001297247.1, se observó que los cambios no son relevantes, ya que no se presentan modificaciones en la propiedades de los aminoácidos diferentes a la secuencia del péptido D1, por tanto, la interacción de los péptidos homólogos con la membrana bacteriana no debería verse afectada(49)(50)

Kim y colaboradores realizaron análisis bioinformáticos para identificar nuevos péptidos antimicrobianos en *Python bivittatus*, luego de obtener las secuencias hicieron la predicción de la estructura molecular y realizaron una síntesis química del péptido para probar si efectivamente tenían acciones antimicrobianas como lo sugería el análisis bioinformático; los resultados manifestaron que las secuencias homólogas a péptidos antimicrobianos, tienen actividad biológica contra bacterias Gram negativas y en menor proporción contra bacterias Gram positivas; esto sugiere que los péptidos homólogos analizados en este proyecto tienen altas probabilidades de presentar actividad antimicrobiana si se realizara el estudio *in vitro*, por lo tanto, serían candidatos en el desarrollo de alternativas para el control de la marchitez bacteriana de *Solanum lycopersicum* por *Ralstonia solanacearum*.⁽⁵¹⁾

8. CONCLUSIONES

La búsqueda de péptidos antimicrobianos contra *Ralstonia solanacearum* en las bases de datos CAMP, DAMP arrojó tres péptidos antimicrobianos (D1, D2 y D5) de *Spinacia oleracea*.

El genoma de *Solanum lycopersicum* presentó tres regiones homólogas al péptido antimicrobiano D1 de *Spinacia oleracea* (ADK36631.1, CAB42006.1 y NP_001234872.2).

ADK36631.1, CAB42006.1 y NP_001234872.2 de *Solanum lycopersicum* tienen una estructura conservada que correspondió a AMP tipo Defensinas con un alto potencial para desarrollar una respuesta inmune ante *Ralstonia solanacearum*.

El uso de herramientas bioinformáticas permite deducir el potencial comportamiento que presentarían estos péptidos en un experimento *in vitro*, por tanto, facilita el proceso de investigación.

ADK36631.1, CAB42006.1 y NP_001234872.2 de *Solanum lycopersicum* son potenciales candidatos para futuros estudios que evalúen su acción antibacteriana *in vitro*.

Perspectivas

Se sugiere que las regiones homólogas a péptidos antimicrobianos en *Solanum lycopersicum* presentan acción frente a *Ralstonia solanacearum*, Por consiguiente, se recomienda realizar estudios in vitro de los péptidos ADK36631.1, CAB42006.1 y NP_001234872.2 para determinar su acción contra *Ralstonia solanacearum*, en caso de presentar actividad antimicrobiana, el paso a seguir sería, realizar ensayos en plantas de tomate y otras solanáceas de importancia económica, posteriormente se podrían desarrollar semillas genéticamente modificadas que contengan estos AMP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Meneguetti BT, Machado L dos S, Oshiro KGN, Nogueira ML, Carvalho CME, Franco OL. Antimicrobial peptides from fruits and their potential use as biotechnological Tools-A review and outlook. *Front Microbiol.* 2017;7(JAN):1–13.
2. DANE. Encuesta Nacional Agropecuaria -ENA ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS. 2016; Available from: http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2016/presentacion_ena_2016.pdf
3. CCB C de C de B. Manual Tomate. Programa Apoyo Agrícola Y Agroindustrial Vicepresidencia Fortalec Empres Cámara Comer Bogotá. 2015;1–56.
4. MINSA. Boletín informativo. *J Phys Conf Ser.* 2009;194:022014.
5. Eliana Mendoza Mendoza. Potencial biológico de cepas autóctonas de *Streptomyces* Spp. Como Antagonista frente a *Ralstonia solanacearum*. Vol. 91. 2017.
6. Bernal AJ. Problemas fitopatológicos en especies de la familia Solanaceae causados por los géneros *Phytophthora*, *Alternaria* y *Ralstonia* en Colombia. Una revisión Biotic constraints of the Solanaceae caused by *Phytophthora*. *Agron Colomb.* 2007;25(2):320–9.
7. González I, Arias Y. INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIAS FITOPATÓGENAS : CASO DE ESTUDIO *Ralstonia solanacearum* - PLANTAS HOSPEDANTES PLANT-PHYTOPATHOGEN BACTERIA INTERACTION : CASE STUDY *Ralstonia*. 2009;24(2):69–80.
8. Miller RNG, Alves GSC, Van Sluys MA. Plant immunity: Unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Ann Bot.* 2017;119(5):681–7.
9. Castro E, García E. La inmunidad innata en las plantas : una batalla molecular entre receptores y estimuladores. *Rev Biológicas.* 2009;11(11):43–7.
10. Carolina A, Arias R, Bogotá DC. IDENTIFICACIÓN DE GENES TIPO PÉPTIDO ANTIMICROBIANO PROVENIENTES DE *Solanum lycopersicum* var . cerasiforme TESIS PRESENTADA POR : Como requisito parcial para optar por el título de Maestría en Ciencias – Bioquímica DIRECTOR : HUMBERTO MIGUEL ZAMORA ESPITI. 2010;
11. Maróti Gergely G, Kereszt A, Kondorosi É, Mergaert P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res Microbiol.* 2011;162(4):363–74.
12. Holaskova E, Galuszka P, Frebort I, Oz MT. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnol Adv [Internet].* 2014;33(6):1005–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.007>
13. Lipsky A, Joshi JR, Carmi N, Yedidia I. Expression levels of antimicrobial

- peptide tachyplesin I in transgenic *Ornithogalum* lines affect the resistance to *Pectobacterium* infection. *J Biotechnol* [Internet]. 2016;238:22–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.09.008>
14. Silva MS, Arraes FBM, Campos M de A, Grossi-de-Sa M, Fernandez D, Cândido E de S, et al. Review: Potential biotechnological assets related to plant immunity modulation applicable in engineering disease-resistant crops. *Plant Sci* [Internet]. 2018;270(February):72–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.013>
 15. George N Arios. *Fitopatología*. Vol. 25. 2010. 30-41 p.
 16. PLANT IMMUNOLOGY An infant giant. *Nature*. 2012;1:3–4.
 17. Benavides Mendoza A, Robledo Olivo A, García Enciso EL, Solís Gaona S, González Morales S. Efecto de elicitores de origen natural sobre plantas de tomate sometidas a estrés biótico. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*. 2018;(20):4211–21.
 18. Cheng C, Gao X, Feng B, Sheen J, Shan L, He P. Plant immune response to pathogens differs with changing temperatures. *Nat Commun* [Internet]. 2013;4(May):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3530>
 19. Couto D, Zipfel C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):537–52.
 20. Pacheco JM. Proteínas R Y Percepción De Efectores R-Proteins and Perception of Pathogenic Effectors in. 2017;32(1):1–9. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v32n1/rpv01117.pdf>
 21. Gasca-tuz C, Chel-guerrero L, Betancur-ancona D. Capacidad antibacteriana de fracciones peptídicas de frijol lima (*Phaseolus lunatus* L .) obtenidas por hidrólisis enzimática . obtained by enzymatic hydrolysis . Aportación a la literatura científica : Introducción : Métodos : 2017;2(1):8–16.
 22. Tang SS, Prodhan ZH, Biswas SK, Le CF, Sekaran SD. Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification. *Phytochemistry*. 2018;154(May):94–105.
 23. Goyal RK, Mattoo AK. Multitasking antimicrobial peptides in plant development and host defense against biotic/abiotic stress. *Plant Sci* [Internet]. 2014;228:135–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.05.012>
 24. Stotz HU, Thomson JG, Wang Y. Plant defensins: defense, development and application. *Plant Signal Behav*. 2009;4(11):1010–2.
 25. Goyal RK, Mattoo AK. Plant antimicrobial peptides. *Host Def Pept Their Potential as Ther Agents*. 2016;111–36.
 26. Games PD, daSilva EQG, Barbosa M de O, Almeida-Souza HO, Fontes PP, deMagalhães-Jr MJ, et al. Computer aided identification of a Hevein-like antimicrobial peptide of bell pepper leaves for biotechnological use.

- BMC Genomics [Internet]. 2016;17(Suppl 12):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-3332-8>
27. Lacerda AF, Vasconcelos ÉAR, Pelegrini PB, Grossi de Sa MF. Antifungal defensins and their role in plant defense. *Front Microbiol.* 2014;5(APR):1–10.
 28. Segura A, Moreno M, García-Olmedo F. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS Lett.* 1993;332(3):243–6.
 29. Carvalho A de O, Gomes VM. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-A concise review. *Peptides.* 2007;28(5):1144–53.
 30. Kovalskaya N, Hammond RW. Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snak-in-1 and defensin recombinant proteins. *Protein Expr Purif [Internet].* 2009;63(1):12–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2008.08.013>
 31. Segura A, Moreno M, Madueño F, Molina A, García-Olmedo F. Snakin-1, a Peptide from Potato That Is Active Against Plant Pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2007;12(1):16–23.
 32. Escarleth I, Puentes C, Caballero IAD. Ciclótidos , proteínas circulares producidas por plantas con potencial farmacológico Cyclotides , circular proteins produced by plants with pharmacological potential. 2015;49(2):384–93.
 33. Cools TL, Struyfs C, Cammue BP, Thevissen K. Antifungal plant defensins: Increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. *Future Microbiol.* 2017;12(5):441–54.
 34. Campos ML, Lião LM, Alves ESF, Migliolo L, Dias SC, Franco OL. A structural perspective of plant antimicrobial peptides. *Biochem J [Internet].* 2018;475(21):3359–75. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BCJ20180213>
 35. Champoiseau PG, Jones JB, Allen C. *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 Causes Tropical Losses and Temperate Anxieties. *Plant Heal Prog [Internet].* 2009;2(January). Available from: <http://www.plantmanagementnetwork.org/php/elements/sum.aspx?id=7785&photo=4419>
 36. Flores-Cruz Z, Allen C. *Ralstonia solanacearum* Encounters an Oxidative Environment During Tomato Infection. *Mpmi [Internet].* 2009;22(7):773–782. Available from: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI-22-7-0773>
 37. Naranjo Feliciano E, Martínez Zubiaur Y. Avances en el diagnóstico de la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*): situación actual y perspectivas en Cuba. *Rev Protección Veg [Internet].* 2013;28(3):160–70. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000300001&lang=es

38. Valle T. Identificación y caracterización preliminar del agente causal de la mancha necrótica de las hojas agente causal de la mancha necrótica de las hojas. *Cienc y Tecnol Agropecu.* 2007;8(January 2008):22–5.
39. Meng F. *Ralstonia Solanacearum* Species Complex and Bacterial Wilt Disease. *J Bacteriol Parasitol* [Internet]. 2013;04(02):2–5. Available from: <https://www.omicsonline.org/ralstonia-solanacearum-species-complex-and-bacterial-wilt-disease-2155-9597.1000e119.php?aid=12400>
40. Segura A, Moreno M, Molina A, García-Olmedo F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Lett.* 1998;435(2–3):159–62.
41. Lahaye T. Illuminating the molecular basis of gene-for-gene resistance; *Arabidopsis thaliana* RRS1-R and its interaction with *Ralstonia solanacearum* popP2. *Trends Plant Sci.* 2004;9(1):1–4.
42. Liu G, Yang F, Li F, Li Z, Lang Y, Shen B, et al. Therapeutic potential of a scorpion venom-derived antimicrobial peptide and its homologs against antibiotic-resistant Gram-positive bacteria. *Front Microbiol.* 2018;9(MAY):1–14.
43. Cavanagh JP, Granslo HN, Fredheim EA, Christophersen L, Jensen PØ, Thomsen K, et al. Efficacy of a synthetic antimicrobial peptidomimetic versus vancomycin in a staphylococcus epidermidis device-related murine peritonitis model. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(9):2106–10.
44. Gao B, Xu J, del Carmen Rodriguez M, Lanz-Mendoza H, Hernández-Rivas R, Du W, et al. Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus*. *Biochimie.* 2010;92(4):350–9.
45. Gracy J, Le-Nguyen D, Gelly JC, Kaas Q, Heitz A, Chiche L. KNOTTIN: The knottin or inhibitor cystine knot scaffold in 2007. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(SUPPL. 1):314–9.
46. Bruix M, Jiménez MA, Santoro J, González C, Colilla FJ, Méndez E, et al. Solution Structure of γ 1-H and γ 1-P Thionins from Barley and Wheat Endosperm Determined by 1H-NMR: A Structural Motif Common to Toxic Arthropod Proteins. *Biochemistry.* 1993;32(2):715–24.
47. Antimicrobianos S, Nacional I, Malbran DEIC, Aires B, De L, Molecular M, et al. Diseño y Evaluación de Nuevos Péptidos Antibacterianos : Actividad Comparativa Frente a Omiganan ® Pentahydrochloride. (2):27853.
48. Khamis AM, Essack M, Gao X, Bajic VB. Distinct profiling of antimicrobial peptide families. *Bioinformatics.* 2015;31(6):849–56.
49. Odintsova TI, Slezina MP, Istomina EA, Korostyleva T V., Kasianov AS, Kovtun AS, et al. Defensin-like peptides in wheat analyzed by whole-transcriptome sequencing: a focus on structural diversity and role in induced resistance. *PeerJ* [Internet]. 2019;7:e6125. Available from: <https://peerj.com/articles/6125>
50. Sathoff AE, Samac D. Antibacterial Activity of Plant Defensins. *Mol Plant-*

Microbe Interact. 2018;1–35.

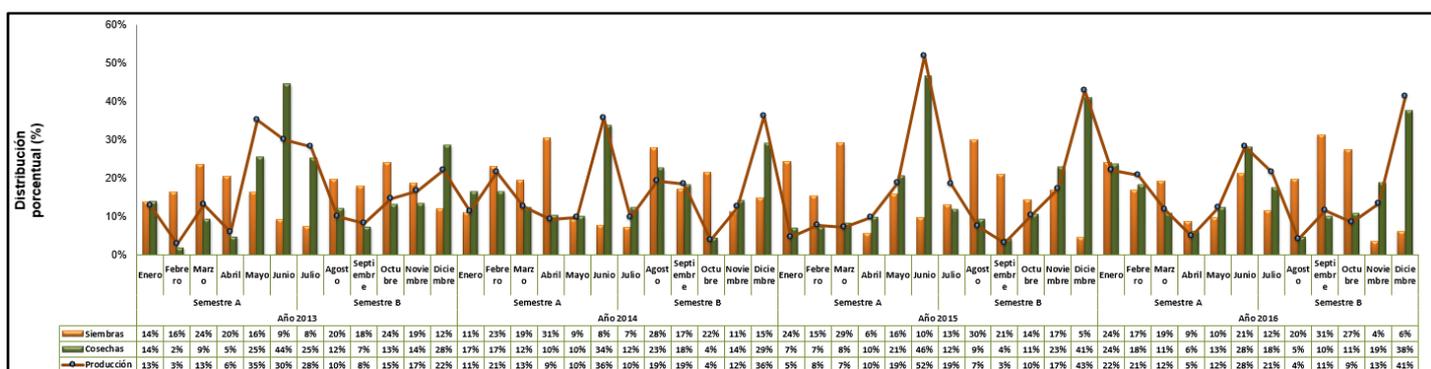
51. Dayeong Kim, Nagasundarapandian Soundrarajan a JL, Cho H, Choi M, Cha S-Y, Byeongyong Ahn a HJ, Le MT, et al. crossm Genomewide Analysis of the Antimicrobial Peptides in Python Cathelicidins with Potent Antimicrobial. Am Soc Microbiol. 2017;61(9):1–12.

ANEXOS

Histórico del cultivo de tomate:

Cultivo		Área sembrada (ha)			Área cosechada (ha)			Producción (t)			Rendimiento (t/ha)			
		Semestre A	Semestre B	Total	Semestre	Semestre B	Total	Semestre	Semestre B	Total	Semestre	Semestre B	Total	
Tomate	2011	Hectáreas	4.757	3.626	8.383	1.366	5.575	52.235	206.869	259.103	38,2	37,1	37,1	
		Cve	30,6	16,8		24,2	27,4	20,3	11,0		20,3	11,0		
	2012	Hectáreas	3.429	4.121	7.550	1.371	4.127	53.847	170.655	224.502	39,3	41,4	41,4	
		Cve	12,7	15,1		16,2	14,4	10,1	8,9		10,1	8,9		
	2013	Hectáreas	2.862	4.005	6.866	1.802	2.358	80.205	95.481	175.686	44,5	40,5	42,5	
		Cve	19,3	14,7		24,7	16,1	17,7	11,6		17,7	11,6		
	2014	Hectáreas	4.945	5.922	10.867	3.587	4.911	147.884	266.040	413.924	41,2	54,2	48,7	
		Cve	19,0	18,3	14,6	17,3	21,3	15,8	30,8	21,6	11,8	14,4	10,9	
	2015	Hectáreas	3.791	5.200	8.992	2.651	4.623	127.961	217.330	345.291	48,3	47,0	47,5	
		Cve	15,2	14,3	13,7	17,8	16,7	16,2	18,7	19,8	16,9	11,4	10,2	8,2
	2016	Hectáreas	4.399	4.051	8.450	4.507	4.399	211.234	171.375	382.609	46,9	39,0	43,0	
		Cve	18,7	13,7	14,9	16,0	14,9	13,8	18,6	21,6	18,3	12,7	12,8	11,1

Fuente: DANE - ENA 2011-2016
 †Producción en vaina o verde
 ‡Producción en grano seco
 Las estimaciones del año 2016 incluyen los departamentos de Arauca, Caqueta, Putumayo y Vichada.



El Boletín técnico nacional agropecuario arrojado por el DANE para el año 2016, muestra que Colombia presentó una producción de 382.609t de tomate en 26 departamentos del país. La producción para el primer y segundo semestre del año fue de 211,234t y 171,375t respectivamente ⁽²⁾

Listado de los genes utilizados en este proyecto.

A continuación se presentan los 256 genes de *Solanum lycopersicum* registrados en la NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y en la CNGB (China National GeneBank) (<https://www.cngb.org/home.html>); de estos ochenta y seis están validados experimentalmente y ciento setenta son modelos en proceso de validación.

Validado experimentalmente:

Genes del tomate involucrados en resistencia a enfermedad

1. PR-1
2. PR-5
3. LOX
4. PAL5
5. CAT
6. PTI4
7. PTI5
8. PR10
9. GAI
10. ASR1
11. Ve1
12. WRKY31
13. NAC1
14. MPK3
15. TCTR2
16. mpka 1
17. loxD
18. 2-CP2
19. 2-CP1
20. MKK2
21. SN2
22. SRC2
23. loxC
24. LOx1.1
25. loxF
26. Adi3
27. TPP3
28. LYK1
29. Mi-1B
30. Mi-1F
31. Mi-1C
32. Asc-1
33. PTI6
34. Psy1
35. MPK2
36. IAA9
37. FUL1
38. PSY2
39. lanceolate
40. OVATE
41. MBD5
42. AG1

43.ERF2
44.FUL2
45.BZIP1
46.AOS3
47.PIN1
48.LOC100529104
49.SUN
50.LHA4
51.AP2a
52.MYC2
53.LIN8
54.Dof22
55.PIN4
56.HSP90
57.GoIS2
58.LAX1
59.TDR6
60.EBF2
61.ICE1a
62.EBF1
63.CCD1B
64.IPT3
65.Aucsia-1
66.Aucsia-2
67.CCD1A
68.PIN3
69.PIN2
70.RAV2
71.LAX2
72.LOC543926
73.LOC101259679
74.Bs4
75.Mi-1G
76.CURL3
77.Ve2
78.Pto
79.Cel1
80.XSP10
81.DEFL1
82.LOC101262930
83.LOC101263224
84.TGAS118
85.MSRA5
86.LOC101266025

Modelos:

Genes del tomate involucrados en resistencia a enfermedad

87. LOC104647314
88. LOC101267035
89. LOC101265838
90. LOC101263528
91. LOC101255212
92. LOC101254607
93. LOC101249140
94. LOC101248836
95. LOC101244389
96. LOC104649822
97. LOC104649821
98. LOC104646745
99. LOC101255807
100. LOC101255507
101. LOC109120657
102. LOC101253784
103. Cel2
104. DDB1
105. LOC101259408
106. LOC101256316
107. LOC101243903
108. rrn5
109. LOC101261222
110. LOC101253568
111. LOC101259993
112. LOC101263413
113. LOC101248239
114. SLR4
115. I2C7
116. LOC101246473
117. rrn18 (34678307)
118. LOC101246623
119. LOC101250393
120. LOC101250108
121. TYNBS1
122. LOC101245269
123. LOC101250981
124. LOC101247516
125. LOC101262348
126. ES890174.1
127. >ES890242.1
128. LOC101253873

129.	LOC101245185
130.	LOC101244742
131.	LOC104646714
132.	LOC101259765
133.	LOC101244988
134.	LOC101260401
135.	LOC101262485
136.	LOC101263014
137.	LOC104647504
138.	LOC101257742
139.	LOC109118728
140.	LOC101263305
141.	LOC101263545
142.	LOC101247810
143.	LOC101250682
144.	LOC101246739
145.	LOC101246940
146.	LOC101246181
147.	LOC101246761
148.	LOC109120916
149.	LOC109119058
150.	LOC101266442
151.	LOC101259459
152.	LOC112941466
153.	LOC112941326
154.	LOC101259700
155.	LOC101251707
156.	LOC101250459
157.	LOC101247854
158.	LOC101248751
159.	LOC101245131
160.	LOC101254234
161.	LOC101252249
162.	LOC101248228
163.	LOC101262940
164.	LOC101259908
165.	LOC101260422
166.	LOC101267658
167.	LOC101262748
168.	LOC101262283
169.	LOC104649423
170.	LOC101259727
171.	LOC104645852
172.	LOC109118707
173.	LOC104649499

174.	LOC101264592
175.	LOC101264419
176.	LOC101244428
177.	LOC101252871
178.	LOC101246875
179.	LOC101244633
180.	LOC101250562
181.	LOC101251733
182.	LOC101246197
183.	LOC101253263
184.	LOC109118931
185.	LOC109120047
186.	LOC109118898
187.	LOC109119487
188.	LOC101268149
189.	LOC104644413
190.	LOC109120903
191.	LOC109119741
192.	LOC101243906
193.	LOC101244974
194.	LOC101263218
195.	LOC101255710
196.	LOC101264610
197.	LOC101247650
198.	LOC101249661
199.	LOC101265646
200.	LOC101266520
201.	LOC101267424
202.	LOC101267917
203.	LOC101261581
204.	LOC101256766
205.	LOC101268210
206.	rps14
207.	rrn26
208.	LyesC2r001
209.	LyesC2r002
210.	LyesC2r006
211.	LyesC2r005
212.	rps19
213.	LyesC2r007
214.	LyesC2r003
215.	ycf1
216.	LyesC2r008
217.	LyesC2r004
218.	trnM(CAT)

219. trnK-TTT
220. trnN(GTT)
221. trnQ(TTG)
222. trnL(CAA)
223. trnI(CAT)
224. trnS(GGA)
225. trnS(TGA)
226. trnW(CCA)
227. trnE(TTC)
228. trnF(GAA)
229. trnP(TGG)
230. trnY(GTA)
231. trnG(GCC)
232. trnD(GTC)
233. trnC(GCA)
234. LOC101245963
235. LOC101251136
236. LOC101250072
237. LOC101252187
238. LOC101252426
239. LOC101246716
240. LOC101245298
241. LOC101253931
242. LOC101253716
243. dhv
244. LOC101252435
245. TPX2
246. ASCL
247. LOC101256296
248. LOC101250839
249. CMPG1
250. LOC104644334
251. >ADK36631
252. CAB42006.1
253. NP_001234872.2
254. NP_001333453.1
255. NP_001297247.1
256. XP_019070205.1

Predicción de la estructura secundaria de D1:

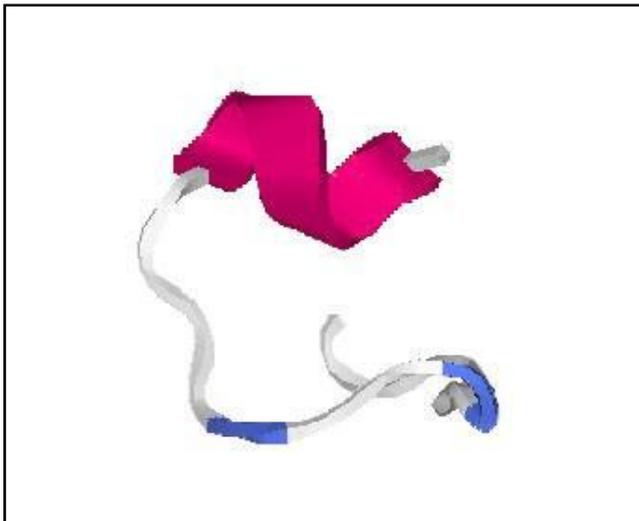
La siguiente imagen representa la estructura secundaria del péptido D1 realizada a través de I-TASSER

	20
Sequence	CTCESPSHKFKGPCATNRNCES
Prediction	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
Conf. Score	9555765443576345665679
	H:Helix; S:Strand; C:Coil

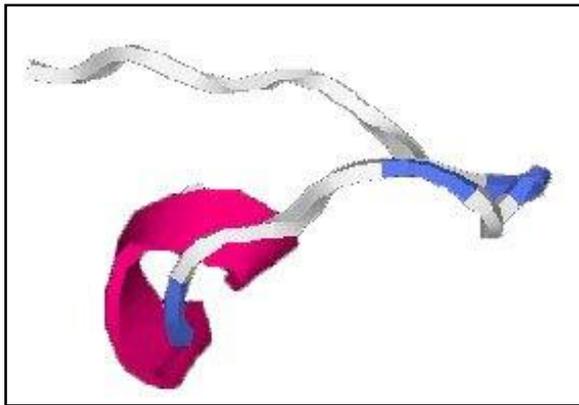
Modelos predictivos de D1 que no fueron utilizados:

I-TASSER predijo cinco posibles estructuras del péptido D1, en las siguientes imágenes se presentan los modelos que no fueron utilizados.

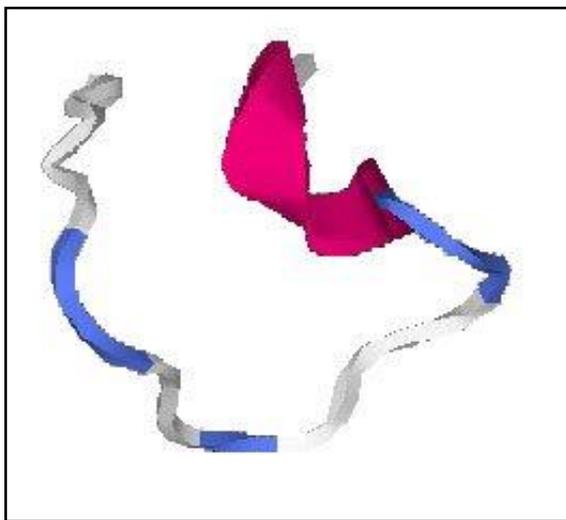
Modelo 2:



Modelo 3:



Modelo 4:



Modelo 5:

