



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

Alexandra Cortés Hernández
Asesora: PhD. Martha Lucía Posada Buitrago.

Introducción

Estrategia de control sobre la marchitez bacteriana en cultivos de tomate

Las plantas poseen un elaborado sistema inmune, sin embargo, los fitopatógenos buscan estrategias para evadir sus mecanismos de defensa y lograr invadirlas

Inversión económica para el control de la marchitez bacteriana que puede alcanzar los diez a doce millones de pesos por hectárea del cultivo.



Objetivos

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*.

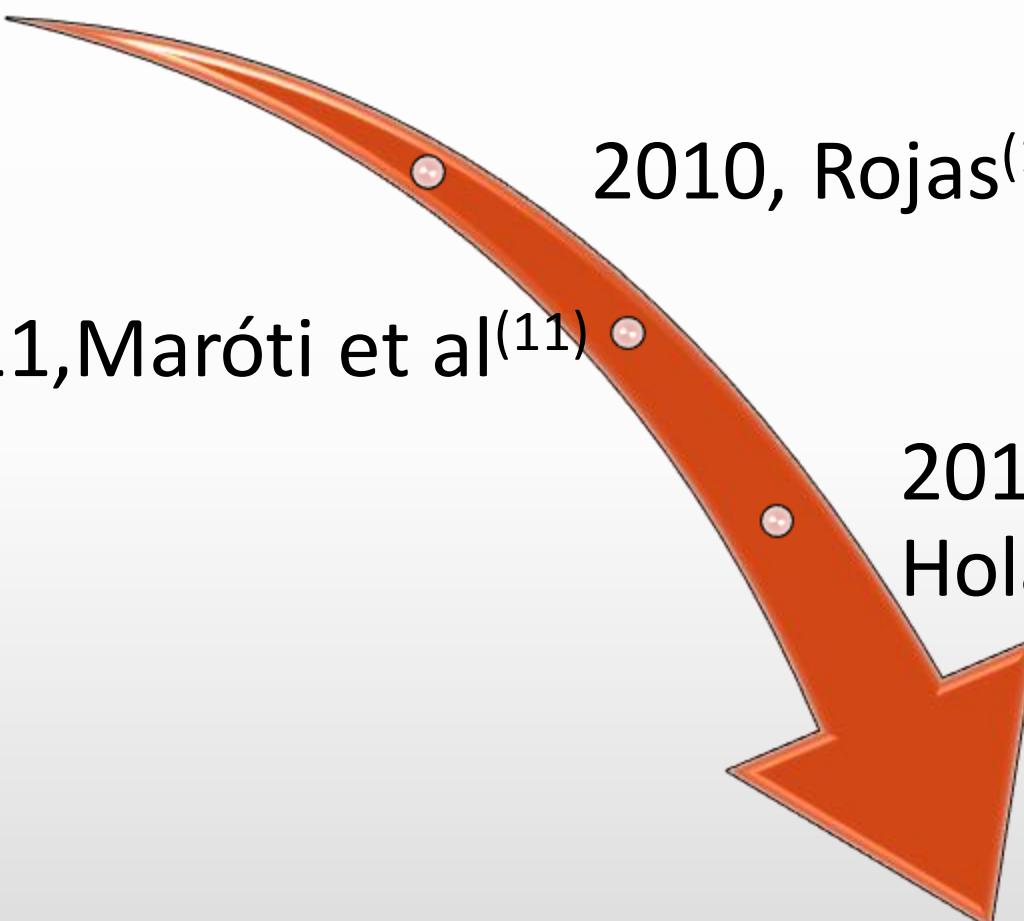
Específicos

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*.

Antecedentes

2009, Castro y
García⁽⁹⁾



2010, Rojas⁽¹⁰⁾

2011, Maróti et al⁽¹¹⁾

2015,
Holaskova⁽¹²⁾

2016, Lipsky et al⁽¹³⁾

Marco teórico

Marco teórico

La marchitez bacteriana es de difícil control por las características que presenta *R. solanacearum*

Las plantas están constantemente expuestas a múltiples fitopatógenos

Virus
Bacterias
Hongos
Oomicetos

las enfermedades causadas en las plantas representan una amenaza para las reservas de alimentos a nivel mundial

¿Por qué utilizar péptidos antimicrobianos?

Actúan contra múltiples patógenos, inhiben hidrolasas de insectos, tienen actividad antitumoral, antiinflamatorio e inmunomodulador

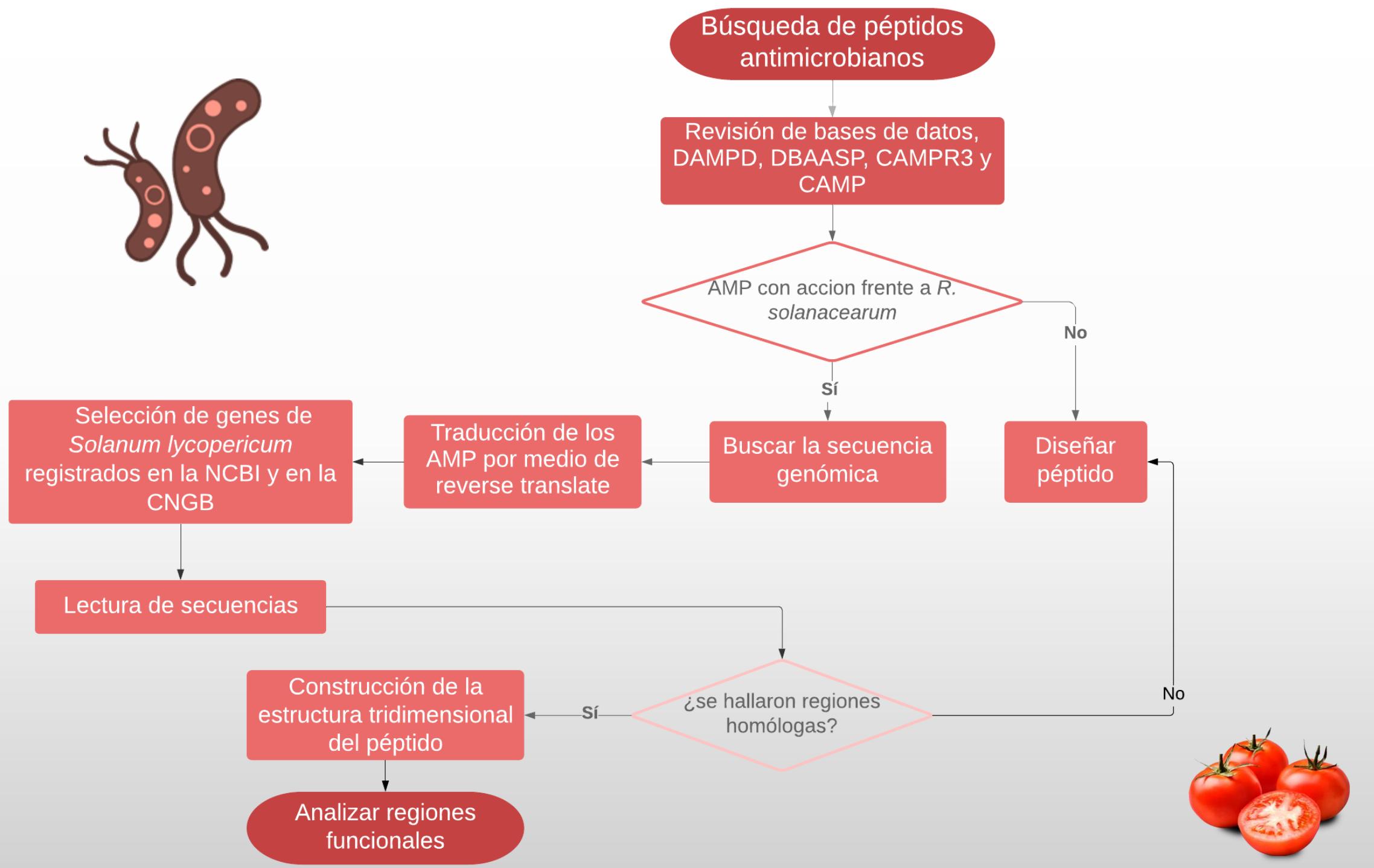
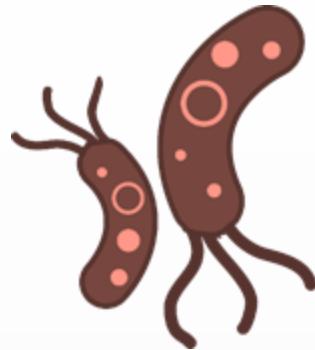
El uso de péptidos antimicrobianos como agentes terapéuticos está siendo ampliamente estudiado

Amplio espectro
Rápida actividad
Baja citotoxicidad en células animales
Dificultad para los patógenos de generar resistencia

Diseño Metodológico

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

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*.



Resultados y Discusión

Péptido	Secuencia nucleotídica
Antimicrobial peptide D1	acctgcgaaagccc gagccataaatttaaaggcccgtgcgc gaccaaccgcaatgcgaaagc
Antimicrobial peptide D2	ggcatttttagcagccgcaa atgcaaaaccccgagcaaaac ctttaaaggcattgcacc cgatagcaactgcgataccag ctgccgctatgaaggctatccggcggcgattgcaaggcat tcgcccgcgctgc atgtgcagcaaaccgtgc
Defensin D5	atgttttttagcagcaaaaatgcaaaaccgtgnnnnaaaac cttcgcggccctgcgtgcgcaacgcgaac

Tabla 3: secuencia traducida de los péptidos antimicrobianos



Péptido	Péptido homólogo	Alineación	
D1	ADK36631 (defensin-like protein, partial)	ADK36631 D1	<pre> 7 GCGCGCACCTGCAGAAAGCCAGAGCCATCGCTTAAAGGCCGTGCGTGAGCAGAAAAAAC -----ACCTGCAGAAGCCCAGGCCATAAAATTAAAGGCCGTGCGCAGCCAACCGCAAC ***** 69 TGCAGCAGCGTGTGCGAAACCGAAGGCTTAGCGGCGGGGATTGCCCGGGCTTCGCCGC TGCAGAACG-----* **** * * * </pre> <p>CGCTGCTTTGCACCCGCCGTGC</p> <p>-----</p>
D1	CAB42006.1 (gamma-thionin [Solanum lycopersicum])	CAB42006.1 D1	<pre> ATGCGCTGTTGCAGACCATGCTGCTGGCATGCTGGTATGGCAGCCGGCCGATG ----- </pre> <p>79</p> <pre> CGCATTGGAAGCGCGCACCTGCAGAAAGCCAGAGCCATCGCTTAAAGGCCGTGCGTG -----ACCTGCAGAAGCCCAGGCCATAAAATTAAAGGCCGTGCGC ***** </pre> <p>141</p> <pre> AGCGAAAAAAACTGCGCGAGCGTGTGCGAAACCGAAGGCTTAGCGGCGGGATTGCCGC ACCAACCGCAACTGCAGAACG * * * * * * * * * * </pre> <p>GGCTTTGCCGCCGTGCTTTGCACCCGCCGTGC</p> <p>-----</p>
D1	NP_001234872.2 (gamma-thionin precursor)	NP_001234872 D1	<pre> ATGGCGAACAGCATGCGCTGTTGCAGACCATGCTGCTGGCATGCTGGTATGGC ----- </pre> <p>91</p> <pre> ACCGGCCGATGCGCATTGTGGAAGCGCGCACCTGCAGAAAGCCAGAGCCATCGCTTAA -----ACCTGCAGAAGCCCAGGCCATAAAATTAA ***** * * * * * * * * * * * * * * * * </pre> <p>153</p> <pre> GGCCCGTGCCTGAGCGAAAAAAACTGCGCGAGCGTGTGCGAAACCGAAGGCTTAGCGGC GGCCCGTGCCTGAGCGAACCAACCGCAACTGCAGAACG ***** * * * * * * * * * * </pre> <p>GGCGATTGCCGCCGTGCTTGCACCCGCCGTGC</p> <p>-----</p>

MUSCLE

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

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 46.0 bits(101)	Expect 7e-08	Identities 14/21(67%)	Positives 14/21(66%)	Gaps 0/21(0%)
Query 2 TCESPSHKFKGPCATNRNCES		22		
ICES SH FKGPC	NC S			
Sbjct 3 TCESQSHRFKGPCVSEKNCAS		23		



Figura 4: Alineamiento péptido D1 con el péptido ADK36631 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 46.0 bits(101)	Expect 1e-07	Identities 14/21(67%)	Positives 14/21(66%)	Gaps 0/21(0%)
Query 2 TCESPSHKFKGPCATNRNCES		22		
ICES SH FKGPC	NC S			
Sbjct 27 TCESQSHRFKGPCVSEKNCAS		47		

Figura 4: Alineamiento péptido D1 con el péptido CAB42006.1 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 46.0 bits(101)	Expect 1e-07	Identities 14/21(67%)	Positives 14/21(66%)	Gaps 0/21(0%)
Query 2 TCESPSHKFKGPCATNRNCES		22		
ICES SH FKGPC	NC S			
Sbjct 31 TCESQSHRFKGPCVSEKNCAS		51		

Figura 4: Alineamiento péptido D1 con el péptido NP_001234872.2 de *Solanum lycopersicum*

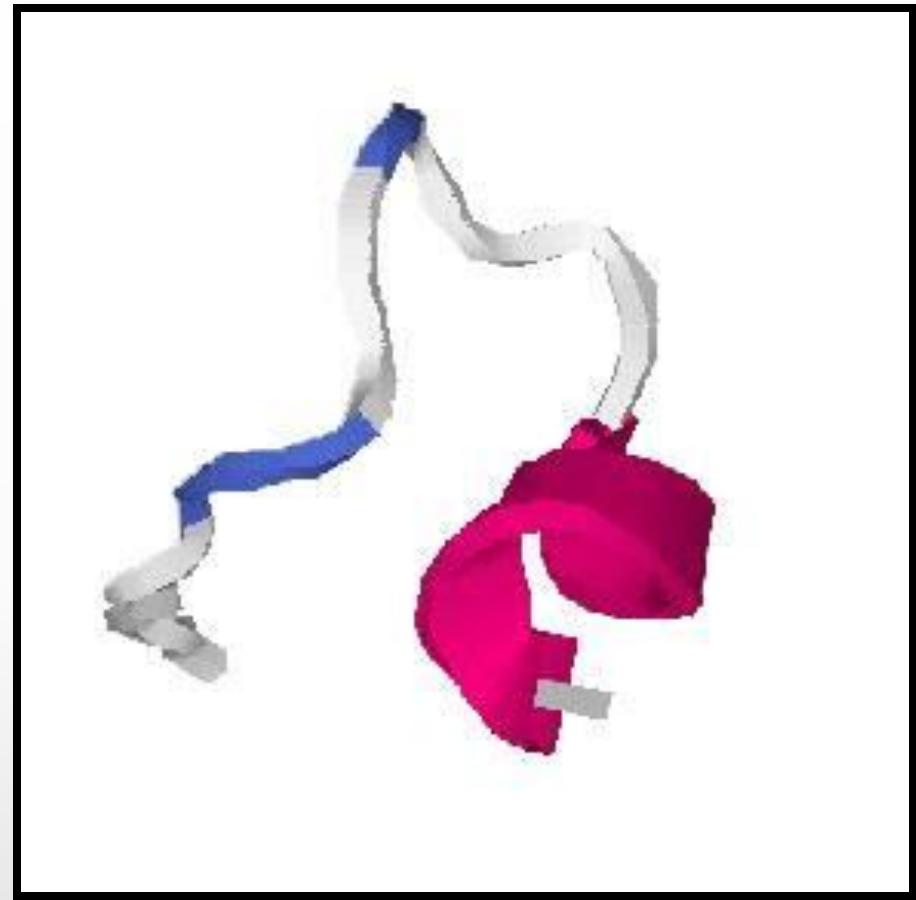


Figura 8: Estructura tridimensional del péptido D1. Ilustración realizada por Alexandra Cortés

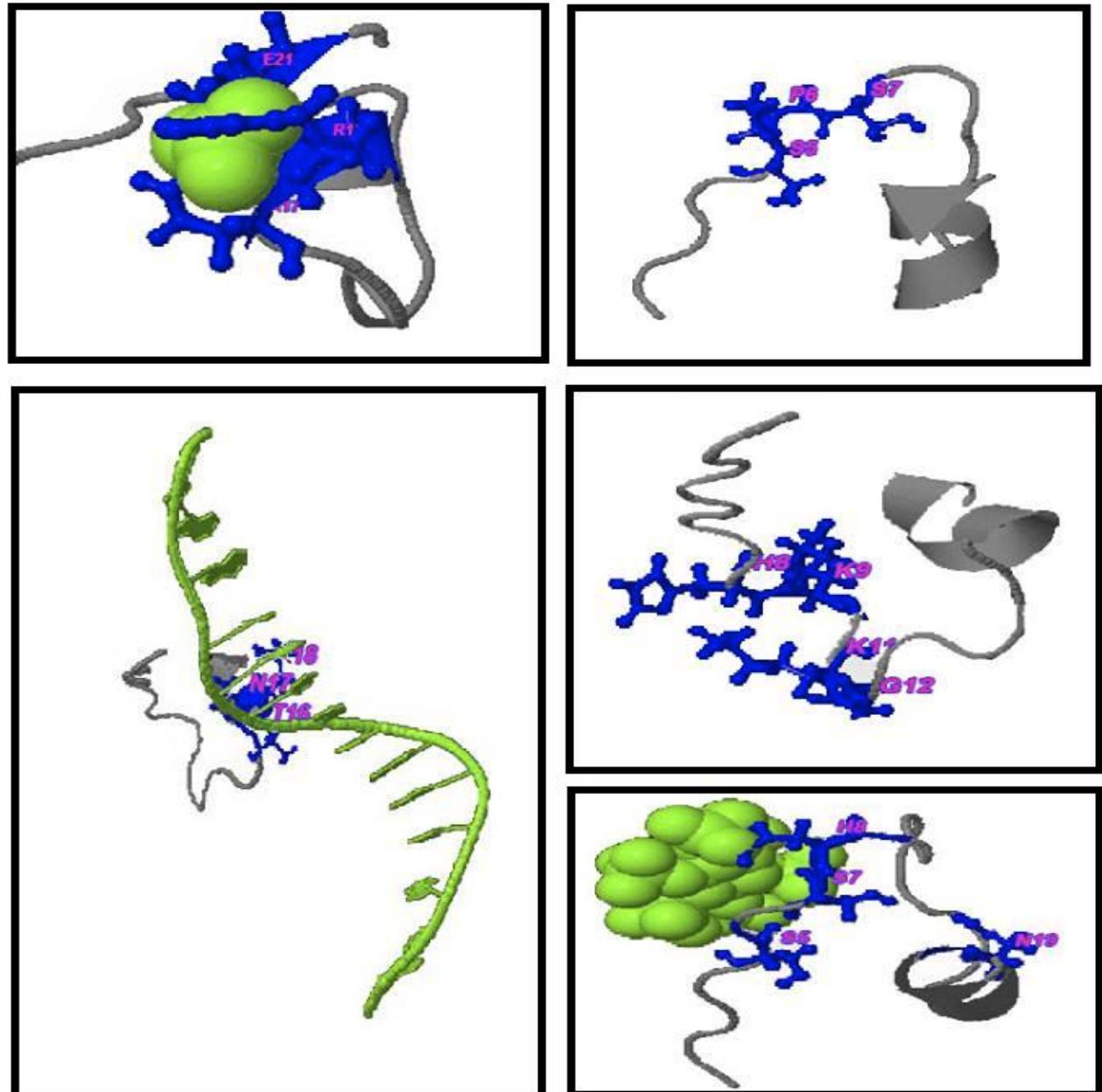


Figura 9: sitios de unión de ligando en el péptido D1. Ilustración realizada por Alexandra Cortés

Aminoacidos D1	Aminoácidos péptidos homologos	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

Tabla 5: Comparación de las propiedades de los aminoácidos presentes en el péptido y los péptidos homólogos. En negrita se observan los aminoácidos que no poseen propiedades iguales.

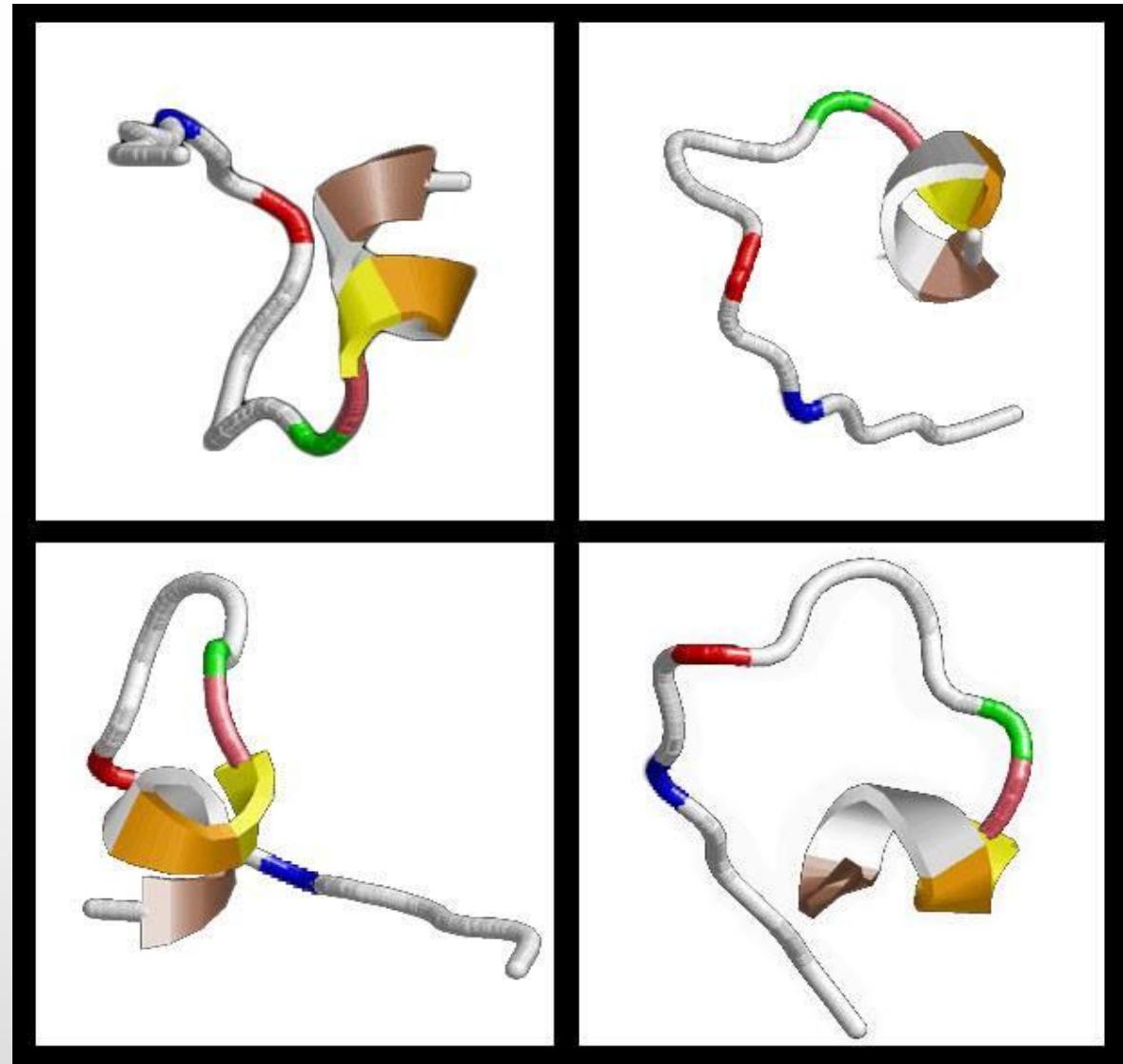


Figura 10: Análisis de los cambios de aminoácidos en el péptido D1. Ilustración realizada por Alexandra Cortés

Conclusiones

La búsqueda de AMP 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 -en 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 contraints 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 Arias. 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 elicidores 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 snakin-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. Olascoaga-Del Angel KS, Sánchez-Evangelista G, Carmona-Navarrete I, Galicia-Sánchez M del C, Gómez-Luna A, Islas-Arrollo SJ, et al. Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Gac México* [Internet]. 2018;154(6):681–8. Available from: http://gacetamedicademexico.com/files/gmm_6_18_682-689.pdf
- 41. Segura A, Moreno M, Molina A, García-Olmedo F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Lett*. 1998;435(2–3):159–62.
- 42. 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.
- 43. 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.
- 44. Cavanagh JP, Granslo HN, Fredheim EA, Christoffersen 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.
- 45. 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.

- 46. 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.
- 47. 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.
- 48. 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.
- 49. Khamis AM, Essack M, Gao X, Bajic VB. Distinct profiling of antimicrobial peptide families. *Bioinformatics*. 2015;31(6):849–56.
- 50. 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>
- 51. Sathoff AE, Samac D. Antibacterial Activity of Plant Defensins. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2018;1–35.
- 52. Cytotoxicity L. Crossm Genomewide Analysis of the Antimicrobial Peptides in Python Cathelicidins with Potent Antimicrobial. 2017;61(9):1–12.

Gracias