

## Identificación del gen de la prosistemina en *Physalis ixocarpa*

Ana Lilia Rosales Campos <sup>1</sup>, José Sánchez Martínez <sup>2</sup>, John Délano Frier<sup>3</sup> y Carla Sánchez Hernández <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Licenciatura en Biología, Universidad de Guadalajara, Apdo. postal 1-139, Zapopan, Jal., 4501, México, <sup>2</sup>Departamento Producción Agrícola, Universidad de Guadalajara, Apdo. postal 1-139, Zapopan, Jal., 4501, México, <sup>3</sup> Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Cinvestav-Guanajuato, Apdo. postal 629, Irapuato, Gto. Mexico.  
Correo-e: sanchez.cv@cucba.udg.mx

### Introducción

Durante su ciclo de vida, desde la semilla hasta su madurez, las plantas son utilizadas como alimento o refugio por diversos insectos. Como respuesta, las plantas han desarrollado un sistema defensivo basado tanto en la erección de barreras físicas como en la síntesis de metabolitos defensivos, que les permiten minimizar el daño. Dentro de las alteraciones metabólicas se incluye la síntesis de compuestos orgánicos y proteínas que de alguna manera pueden modificar patrones de alimentación y oviposición, o bien, intervenir durante el crecimiento, desarrollo o fertilidad de los insectos (Walling, 2000; Gatehouse, 2002). En su conjunto, estas respuestas pueden manifestarse como un incremento en los niveles de expresión génica, como una activación de la síntesis de compuestos químicos y como un aumento en la resistencia a futuros ataques (Karban y Baldwin, 1997; Stout et al. 2006).

Las defensas contra insectos herbívoros pueden clasificarse como constitutivas, al encontrarse presentes durante todo el proceso de desarrollo, o bien, inducibles si su activación depende del daño generado por el insecto, su presencia o de algún componente derivado del mismo durante la interacción con la planta. A su vez, las defensas inducibles pueden activarse de manera localizada en el área de daño o tener efecto sistémico, al activarse en la planta completa.

La sistemina es un componente en la ruta de señalización en respuesta a daño y herbivoría exclusivo de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y solanáceas relacionadas (Pearce y Ryan, 2003). Es un péptido de 18 aminoácidos, sintetizado a partir del extremo C-terminal de una proteína precursora de 200 aminoácidos, conocida como prosistemina (Pearce et al. 1991; McGurl et al. 1992). Resultados de distintos trabajos han resaltado la función esencial de la sistemina y su precursor en la regulación de las respuestas defensivas asociadas a daño por herbivoría. El modelo actual empleado para explicar la activación de estas respuestas involucra la liberación local de sistemina, así como una señalización a distancia transmitida por el tejido vascular mediante una amplificación positiva en continua retroalimentación, tanto de sistemina como de ácido jasmónico (AJ) (Schillmiller y Howe, 2005).

Homólogos de la (pro)sistemina han sido identificados en papa (*Solanum tuberosum*), chile (*Capsicum annuum*) y hierba mora (*Solanum nigrum*). En el análisis de sus secuencias, todas presentan un alto porcentaje de similitud con respecto a la prosistemina de jitomate (73 a 88%), además de mantener la capacidad de inducir la síntesis de inhibidores de proteasas a concentraciones femtomolares (Constabel et al.

1998). Sin embargo, se conoce que la sistemina de *S. nigrum* no participa en la activación de defensas asociadas a herbivoría (Schmidt y Baldwin, 2006).

Aún cuando la respuesta defensiva dependiente de sistemina y AJ ha sido la ruta de señalización estudiada con más detalle en especies Solanáceas, la información sobre los mecanismos de defensa presentes en el tomate de cáscara es escasa. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue identificar la presencia de un gen homólogo a la (pro)sistemina de jitomate en *Physalis ixocarpa*.

## **Materiales y métodos**

### *Inducción*

Para el experimento se utilizaron tres plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) de al menos 10 hojas verdaderas, crecidas en macetas de 250ml bajo condiciones de invernadero. El tratamiento de daño mecánico se realizó en todas las hojas de las plantas presionando con pinzas estériles varias veces en forma perpendicular sobre la vena central y la superficie de la hoja; después de 60 min las hojas se colectaron y congelaron inmediatamente en nitrógeno y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### *RT-PCR*

A partir del material foliar colectado se realizó el aislamiento de RNA total con el kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. La obtención de cDNA se realizó utilizando SuperScript II (Invitrogen) y  $4\mu\text{l}$  de RNA. Los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR (5-CACCATGAGAAGGGAGGAGA-3' y 5- AGGATCACGCTTTGATGGAG-3') se diseñaron a partir de la secuencia codificante del gen de la prosistemina de jitomate (Genebank: M84801). La amplificación se realizó en un volumen final de  $25\mu\text{l}$ , utilizando las siguientes condiciones: 1 ciclo de 5 min a  $94^{\circ}\text{C}$ ; 30 ciclos de 1 min a  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 min a  $64^{\circ}\text{C}$ , 1 min a  $72^{\circ}\text{C}$  y 1 ciclo de 10 min a  $72^{\circ}\text{C}$ . Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 8% o enviados al laboratorio de Secuenciación (Cinvestav-Guanajuato) para su análisis.

### *Análisis de la secuencia*

Las secuencias nucleotídica y la aminoacídica deducida fueron comparadas contra las secuencias homólogas de jitomate (Genebank: M84801), chile (Genebank: AF000375), papa (Genebank: AF000373 y 4) y hierba mora (Genebank: AF000375), utilizando los programas BLAST y Vector NTI.

## **Resultados y discusión**

En el material evaluado se logró la amplificación de un fragmento de tamaño esperado de 500pb (Figura 1). El análisis de la secuencia confirmó la presencia de un gen homólogo de la prosistemina en *Physalis ixocarpa*. Sin embargo, para completar la secuencia se requiere realizar otros ensayos (PCR-RACE) para amplificar en su totalidad los nucleótidos presentes en los extremos.



Los residuos de ácido aspártico y leucina previos a la sistemina son conservados en todas las proteínas. En la secuencia de *Physalis ixocarpa* tres sustituciones importantes ocurren en regiones altamente conservadas; en la posición 11, una lisina es reemplazada por una glutamina; en la posición 108, un residuo de ácido glutámico es sustituido por una valina; por último, en la posición 178, una lisina se cambia por una arginina. La región correspondiente a la sistemina no se puede analizar completamente hasta tener la secuencia nucleotídica completa, aun así, se conservan la mayoría de los aminoácidos necesarios para su actividad biológica.

### **Bibliografía**

- Constabel P, Lynn Y, Clarence R.** 1998. Prosystemin from potato, black nightshade and bell pepper: primary structure and biological activity of predicted systemin polypeptides. *Plant Molecular Biology*. 36:55-62.
- Gatehouse J.** 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*. 156:145-169.
- Karban R y Baldwin IT.** 1997. Induced responses to herbivory. University of Chicago Press, Chicago.
- McGurl B, Pearce G, Orozco-Cardenas M, Ryan CA.** 1992. Structure, expression and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science*. 255:1570-1573.
- Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA.** 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*. 253:895-898.
- Pearce G. y Ryan C.A.** 2003. Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. *The Journal of Biological Chemistry* .278:30044-30050.
- Schilmiller A y Howe G.** 2005. Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology*. 8:369-377.
- Schmidt S. y Baldwin I.** 2006. Sistemina in *Solanum nigrum*. The tomato-homologous polypeptide does not mediate direct defense responses. *Plant Physiology*. 142:1751-1758.
- Stout MJ, Thaler JS, Thomma BP.** 2006. Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. *Annual Review Entomology*. 51:663-689.
- Walling L.** 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulator*. 19:195-216.