



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
LABORATORIO FISIOLÓGÍA MOLECULAR DE PLANTAS

“Actividad antifúngica desnakina de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) producida en el sistema heterólogo *Escherichia coli*-pMAL”

TESIS QUE PRESENTA

LGA. Marco Antonio Hernández Martínez

Para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Director de Tesis:
D.C. Rodolfo López Gómez

Co- Director de Tesis:
D.C. Rafael Salgado Garciglia

Morelia, Michoacán, octubre de 2016



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

LABORATORIO FISIOLÓGÍA MOLECULAR DE PLANTAS

“Actividad antifúngica de snakina de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) producida en el sistema heterólogo *Escherichia coli*-pMAL”

TESIS QUE PRESENTA

LGA. Marco Antonio Hernández Martínez

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Director de Tesis:

D.C. Rodolfo López Gómez

Co- Director de Tesis:

D.C. Rafael Salgado Garciglia

Morelia, Michoacán, septiembre de 2016

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	6
Abstract	7
1. Introducción.....	8
2. Marco teórico.....	10
2.1. Mecanismos de defensa en Plantas	10
2.1.1. Péptidos antimicrobianos	11
2.1.2. Péptidos antimicrobianos de Plantas	15
2.1.3. Péptido antimicrobiano snakina.....	17
2.2. Expresión heteróloga en <i>Escherichia coli</i>	18
2.2.1. Proteínas de fusión	19
2.3. Expresión heteróloga de Snakina	20
2.3. El fruto de Aguacate	22
2.4. Hongos fitopatógenos de interés agronómico.....	23
2.4.1 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	23
2.4.2. <i>Botrytis cinerea</i>	24
2.5. Snakina de aguacate.	24
3. Justificación.....	26
4. Hipótesis.....	27
5. Objetivos	28
5.1. Objetivo general.....	28
5.2. Objetivos específicos	28
6. Estrategia experimental.....	29
7. Capítulo 1. Expresión de la snakina <i>PaSn</i> de aguacate “nativo mexicano” en el sistema heterólogo <i>Escherichia coli</i> - pMAL y purificación del péptido	30

7.1. Introducción	30
7.2. Materiales y Métodos.....	31
7.3. RESULTADOS	37
7.3.1. Amplificación del EST del PA snakina <i>PaSn</i>	37
7.3.2. Doble digestión de <i>PaSn</i> y pMAL-c5x.....	38
7.3.3. Construcción del vector de expresión pMALc5x- <i>PaSn</i>	39
7.3.4. Verificación de la secuencia de <i>PaSn</i> en fase de expresión	41
7.3.5. Expresión de la proteína de fusión MBP-snakina <i>PaSn</i>	43
7.3.6. Purificación de la proteína de fusión	44
7.3.7. Liberación de la proteína de fusión con el Factor Xa (FXa)	46
8.2. Materiales y métodos.....	50
8.3 RESULTADOS	52
8.3.2 Efecto del péptido Snakina sobre <i>B. cinerea</i>	53
8.3.3 Ensayo control con el Factor Xa y <i>C. gloeosporioides</i>	54
8.3.4. Efecto de Snakina sobre la germinación de esporas de <i>C.</i> <i>gloeosporioides</i>	55
9. Discusión general.....	57
10. Conclusiones.....	61
11. Literatura citada.....	62
12. Apéndice	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Clases estructurales de péptidos antimicrobianos.	12
Figura 2. Mecanismo de acción de péptidos que interactúan con membranas. 14	14
Figura 3. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de snakina.....	25
Figura 4. Mapa del vector de expresión pMAL-c5x	31
Figura 5. Secuencia de nucleótidos del péptido maduro de <i>PaSn</i>	32
Figura 6. Secuencia perteneciente al vector pMAL-c5x..	33
Figura 7. Amplificación de <i>PaSn</i> por PCR.....	37
Figura 8. Electroforesis del producto de PCR purificado.....	38
Figura 9. Digestiones enzimáticas de <i>PaSn</i> y pMAL-c5x.....	39
Figura 10. Mapa del vector de expresión pMALc5x-PaSn.....	40
Figura 11. Crecimiento de colonias de <i>E. coli</i> ER2523.....	40
Figura 12. PCR y doble digestión de ADN de células transformadas..	41
Figura 13. Amplificación por PCR del fragmento clonado.	42
Figura 14. Verificación de la secuencia de snakina <i>PaSn</i> en fase de expresión... 42	42
Figura 15. SDS-PAGE de proteínas totales de la cepa transformada.	43
Figura 16. Gráfica de purificación de la proteína recombinante.....	45
Figura 17. SDS-PAGE de la proteína de fusión purificada.....	46
Figura 18. SDS-PAGE de la separación de la MBP y snakina <i>PaSn</i>	47
Figura 19. Cuantificación de las proteínas separadas	48
Figura 20. Ensayo de difusión en caja de Petri con <i>C. gloeosporioides</i>	52
Figura 21. Acercamiento de las zonas oscurecidas de <i>C. gloeosporioides</i>	53
Figura 22. Ensayo de difusión en caja de Petri con <i>B. cinerea</i>	54
Figura 23. Ensayo control en caja Petri con <i>C. gloeosporioides</i> y el Factor Xa. ...	55
Figura 24. Efecto de snakina <i>PaSn</i> sobre la germinación de esporas de <i>C. gloeosporioides</i>	56

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Péptidos antimicrobianos de plantas (Tam et al., 2015)	16
Tabla 2. Oligonucleotidos para amplificación y subclonación de <i>PaSn</i>	32

Resumen

La expresión heteróloga es una técnica utilizada para producir grandes cantidades de proteínas que son de especial interés a nivel médico, industrial y agronómico. Consiste en la síntesis de una proteína en un organismo distinto al nativo. Los organismos hospederos más utilizados son levaduras, células de mamífero y bacterias, siendo estos últimos los más utilizados debido a su bajo costo de producción. En el presente trabajo se demostró la producción de un péptido antimicrobiano vegetal, snakina *PaSn* de aguacate “nativo mexicano” (*Persea americana* var. *drymifolia*), funcionalmente activo, por expresión heteróloga en *Escherichia coli* cepa ER2523. El péptido fusionado a la Proteína de unión a maltosa (MBP por sus siglas en inglés) no resultó ser tóxico para la cepa. La MBP inhibe la función biológica de snakina *PaSn*, favorece la solubilidad del péptido evitando la formación de cuerpos de inclusión y presenta afinidad a amilosa utilizada en el primer paso de purificación por cromatografía de afinidad. Se obtuvo un óptimo rendimiento con el sistema de purificación establecido, consiguiendo un 30% de la proteína de fusión MBP-snakina *PaSn*. Para liberar al péptido snakina *PaSn* de la proteína de fusión, se utilizó la proteasa Factor Xa. La digestión con la proteasa generó un péptido con un tamaño de 8 KDa similar al esperado. En los ensayos *in vitro*, se demostró que el péptido presentó actividad contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*, fitopatógenos de importancia agronómica, a una concentración de 150 µg/mL de snakina *PaSn*.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, Expresión heteróloga, Péptido antimicrobiano, Proteína de unión a maltosa.

Abstract

Protein heterologous expression is a technique used to produce large quantities of proteins that are of particular interest to medical, industrial and agricultural research. Consists in the protein synthesis by a foreign organism. The most widely used host organisms are yeasts, mammalian cells and bacteria, due to low costs and levels of protein production, bacterial systems are the most used. In this work we reported the production of avocado snakin *PaSn* functionally active by heterologous expression in *Escherichia coli* strain ER2523. The peptide fused to the Maltose binding protein (MBP) resulted was not toxic for the strain. The MBP inhibits the biological function of snakin *PaSn* it favors the solubility of the peptide avoiding the formation of inclusion bodies and presents affinity to amylose used in the first step of purification by affinity chromatography. It was obtained an optimum performance with purification system established achieving 30% of the fusion protein MBP-snakin *PaSn*. Optimal performance with established purification system was obtained, achieving 30% of the fusion protein MBP-snakin *PaSn*. To release the peptide snakin *PaSn* of the fusion protein was use protease Factor Xa. The digestion with protease generated a peptide with size of 8 kDa similar to what was expected. *In vitro* tests showed that the purified peptide showed antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botrytis cinerea* phytopathogens of agronomical importance at concentrations of 150 µg/mL.

Keywords: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, Heterologous expression, Antimicrobial peptide, Maltose binding protein.

1. Introducción

Aunque las plantas han desarrollado mecanismos de defensa para contrarrestar las infecciones causadas por microorganismos patógenos, se han buscado alternativas para contrarrestar las infecciones causadas por microorganismos patógenos, utilizando proteínas de origen vegetal que puedan aplicarse en la protección de frutos y cultivos (Glazebrook, 2005).

Como parte de los mecanismos de defensa de organismos multicelulares se encuentran la producción de compuestos para eliminar la invasión de microorganismos. Entre estos se destacan los péptidos antimicrobianos (PAs), componentes del sistema de inmunidad innata en eucariontes superiores. Son moléculas usualmente cortas de 12 a 100 residuos de aminoácidos con carga positiva, aunque también hay con carga negativa y neutra. Los PAs de plantas son parte de su mecanismo de defensa, se expresan constitutivamente o pueden ser inducidos en respuesta al ataque de un patógeno (Murray y Liu, 2008).

Éstos han sido clasificados dentro de varias familias, incluyendo a los péptidos de transferencia de lípidos (LTP's), los ciclótidos, péptidos como heveínas, defensinas y snakinas (López-meza *et al.*, 2011). Las snakinas fueron clasificadas como miembros de la familia Snakina/GASA, estimuladas por ácido giberélico en *Arabidopsis thaliana*, debido a que presenta homología con péptidos producidos por este organismo modelo. Estos péptidos antimicrobianos ricos en cisteínas fueron inicialmente aislado de tubérculos de papa y mostró ser activo contra diferentes patógenos de plantas. Todas estas pequeñas proteínas están compuestas de un péptido señal en la región N-terminal y en el C-terminal, presentan una región de aproximadamente 60 aminoácidos que contiene 12 residuos de cisteína en posiciones conservadas (Segura *et al.*, 1999).

En el grupo de trabajo de la presente investigación, Guzmán-Rodríguez *et al.* (2013) reportaron un transcrito (EST) aislado de la semilla de aguacate "nativo mexicano"

(*P. americana* var. *drymifolia*) que codifica para un PA tipo Snakina (*PaSn*). Para probar su funcionalidad, expresaron este EST en un sistema de células endoteliales de bovino y evaluaron su actividad contra dos bacterias patógenas de humanos, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, inhibiendo su crecimiento a 100 µg/mL de la proteína total.

Avances en técnicas de ADN recombinante han proporcionado una oportunidad para producir grandes cantidades de péptidos antimicrobianos de plantas, debido a que son una alternativa para utilizarse en la protección de los cultivos contra sus microorganismos patógenos. Esta tecnología permite clonar genes foráneos en vectores específicos para la expresión en hospederos eucariontes y procariontes. En estudios recientes se ha demostrado que los principales hospederos utilizados para la producción de PAs son levaduras y bacterias. *E. coli* es el hospedero más utilizado, puesto que es el microorganismo más rentable para la producción de proteínas recombinantes (400 µg/mL) debido a su rápido crecimiento, en comparación con células de mamífero que presentan baja producción de proteína recombinante (30 µg/mL); gran disponibilidad de vectores de expresión comerciales, los protocolos de manipulación de ADN están bien establecidos y un amplio conocimiento con respecto a su genética, bioquímica y fisiología (Sorensen y Mortensen, 2005; Demain y Vaishnav, 2009).

Con el propósito de producir el PA Snakina de aguacate nativo mexicano en un modelo biológico con un alto rendimiento, en el presente trabajo se expresó y purificó la Snakina de aguacate nativo mexicano a partir de un sistema de expresión heteróloga procarionte del EST de *PaSn*, utilizando el vector de expresión y purificación pMAL-c5x y la cepa hospedera *E. coli* ER2523. Asimismo, se evaluó su actividad biológica, determinando su efecto mediante ensayos *in vitro* sobre la inhibición del crecimiento en dos importantes fitopatógenos de plantas, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*.

2. Marco teórico

2.1. Mecanismos de defensa en Plantas

Debido a que las plantas se encuentran confinadas a un solo sitio y expuestas a gran variedad de patógenos, se ven obligadas a desarrollar una amplia gama de mecanismos de defensa para contrarrestar los ataques y evitar las enfermedades. Las plantas se defienden de los patógenos ejerciendo mecanismos físicos y químicos que han adquirido durante el proceso evolutivo y que reducen la posibilidad de infección o previenen el acceso de patógenos al hospedante. Entre éstos se encuentran las barreras estructurales como la cutícula consistente de cutina, un polímero complejo de ácidos grasos esterificados recubiertos con cutina; la deposición de lignina rígida en la pared celular; barreras anatómicas como lenticelas, pelos y estomas (Sels *et al.*, 2008).

En ausencia de un reconocimiento específico del patógeno, también ocurre una respuesta de defensa basal, la cual aparentemente es manejada por los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), que son conocidos como inductores generales no específicos. Como resultado al reconocimiento de un patógeno, ocurre la respuesta hipersensible que implica la síntesis de proteínas relacionadas a patogénesis (PR) y causan muerte celular programada en el hospedero, que se observa como una necrosis visible. En esta etapa del proceso de infección, también ocurre la deposición de calosa en el sitio de infección y el reforzamiento de la pared celular (Cortés *et al.*, 2010).

Además, también ocurre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), acumulación de metabolitos secundarios como las fitoalexinas y diversos tipos de compuestos fenólicos. Las proteínas PR aparecen durante la infección y tienen la capacidad de impedir el desarrollo del patógeno. Entre las proteínas PR existen los péptidos antimicrobianos y enzimas como las quitinasas y glucanasas (Sels *et al.*, 2008).

2.1.1. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAs) son moléculas que han sido aisladas de bacterias, hongos, animales y plantas. Éstos forman parte importante en la defensa del hospedero (inmunidad innata) y la mayoría de ellos tienen actividad de amplio espectro, ya que pueden presentar actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, citotóxica o actuar como moléculas moduladoras del sistema inmune. Estos péptidos exhiben acciones antimicrobianas en objetivos celulares específicos en varias vías, tales como la perturbación de la membrana celular microbiana, o por inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, enzimas y componentes de la pared celular que son esenciales para la supervivencia de microorganismos (Nguyen *et al.*, 2011).

Los PAs son producidos por una extensa variedad de organismos como parte de su primer sistema de defensa (eucariontes) o como estrategias de competición por nutrientes y espacio (procariontes). Estas moléculas son usualmente péptidos cortos de 12 a 100 residuos de aminoácidos con carga positiva, negativa o neutra (Murray y Liu, 2008).

Basado en lo anterior, el amplio espectro de actividades antimicrobianas reportadas para estas moléculas sugiere un beneficio potencial en el tratamiento contra el cáncer, infecciones parasíticas, virales, microbianas y en la modulación del sistema inmune, lo cual refuerza la importancia de estudiar estas moléculas (Mercado *et al.*, 2005; Schweizer, 2009).

Los péptidos se clasifican de acuerdo a su estructura terciaria, que se encuentran distribuidos en cuatro clases principales: láminas- β , hélices- α , loop y péptidos extendidos. Las dos primeras clases son las más comunes en la naturaleza (Powers y Hancock, 2003) (Figura 1).

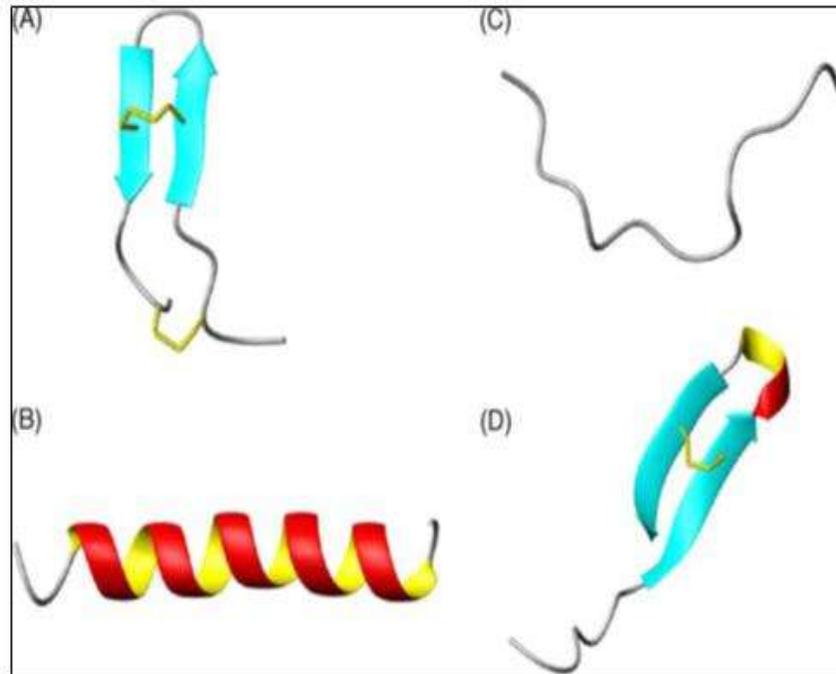


Figura 1. Clases estructurales de péptidos antimicrobianos: **A)** Láminas- β , **B)** Hélices- α , **C)** Extendidos, **D)** Lloop (Powers y Hancock, 2003).

La naturaleza de los PAs, basada en su composición de aminoácidos, carga y tamaño, le permiten insertarse fácilmente en los lípidos de la membrana de los microorganismos. El mecanismo general por el que los PAs dañan la membrana, es considerado universal para todos los péptidos descritos y se basa en las interacciones electrostáticas. En el caso de bacterias, la interacción de PAs catiónicos con los fosfolípidos aniónicos de membrana y con los grupos fosfato de los lipopolisacáridos de Gram negativas, así como la interacción con los ácidos teicoicos en bacterias Gram positivas, ocurre a través de mecanismos electrostáticos, constituyendo el primer paso de acción. Posteriormente, los péptidos que se encuentran en contacto con la célula bacteriana pasan a través de los polisacáridos o ácidos teicoicos y lipoteicoicos para interactuar con la membrana plasmática. El segundo paso es la permeabilización de la membrana, este

mecanismo está dado por la formación de poros debido a las interacciones y arreglos de PAs (Ogata *et al.*, 1992; Boman, 2003).

La acción tóxica de los PAs sobre los hongos está asociada con la habilidad de estos compuestos para interactuar con los esteroides de la membrana provocando la formación de poros (Osborn, 1996), y también ha propuesto que interactúan con los canales de potasio (K^+), inhibiendo procesos como la salida de K^+ , liberación de neurotransmisores, transporte de electrolitos y la regulación del volumen celular (Almeida *et al.*, 2002).

Las interacciones de los PAs con membranas han sido estudiadas principalmente en péptidos catiónicos con estructuras α -hélices. Estos mecanismos son explicados en los modelos “barril”, “poro toroidal”, y modelo de “carpetas”:

Modelo de “*Barril*”.- El péptido se orienta perpendicularmente al plano de la membrana permitiendo que la región hidrofóbica del péptido interactúe con la región hidrofóbica de la bicapa, mientras la superficie hidrofílica del péptido es orientada hacia el interior, formando un canal hidrofílico que se expande a lo largo de la membrana (Figura 2) (Téllez y Castaño, 2010).

Modelo “*Poros toroidales*”.- Este modelo explica el mecanismo de acción de péptidos catiónicos con estructuras hélices- α y de aquellos que forman enlaces disulfuro. Inicialmente, el péptido se orienta paralelamente al plano de la membrana y se une a la región de las cabezas polares de los fosfolípidos en un estado funcionalmente inactivo. Cuando la concentración del péptido supera a los lípidos de membrana, los péptidos se reorientan perpendicularmente al plano de la bicapa. Esto forma un complejo dinámico supramolecular péptido-lípido, que causa la ruptura irreversible de la membrana (Figura 2) (Huang, 2000).

Modelo de “*Carpetas*”.- Cuando el péptido alcanza una cierta concentración crítica, los monómeros rotan y se orientan hacia el núcleo hidrofóbico de la membrana,

causando la formación de micelas y el colapso de la membrana (Figura 2) (Shai, 1995).

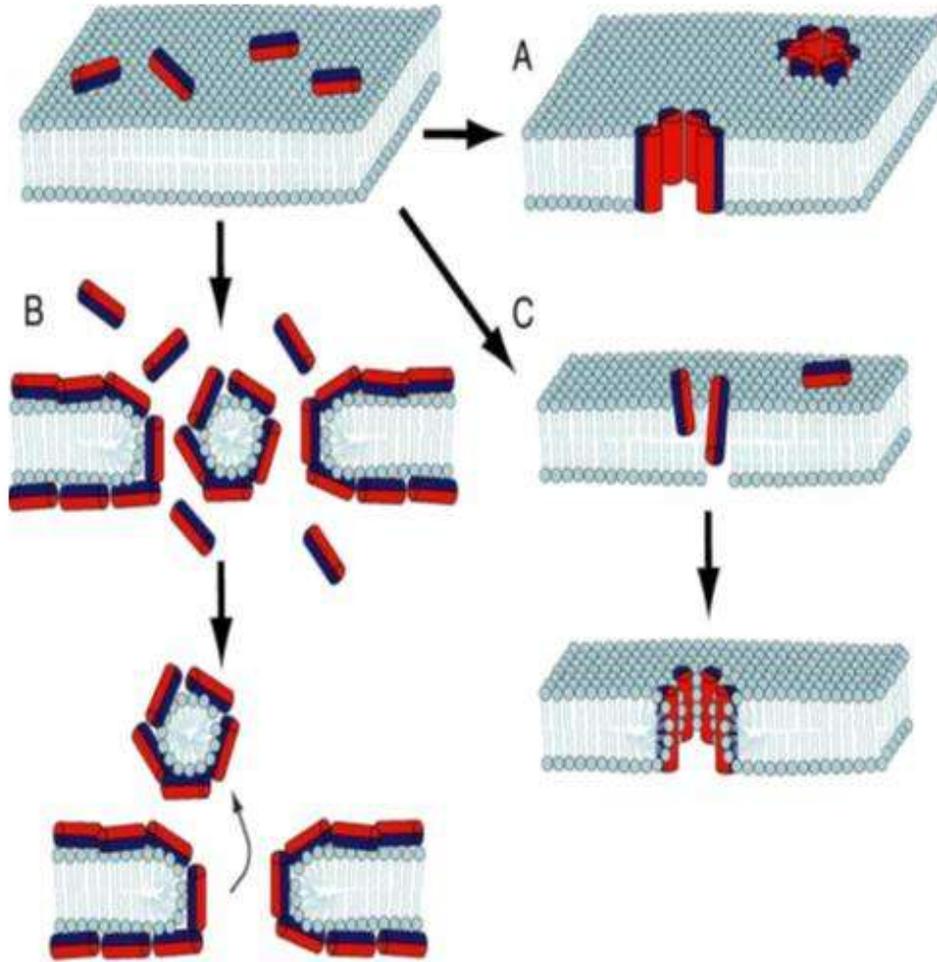


Figura 2. Mecanismo de acción de péptidos que interactúan con membranas. **A)** Modelo de Barril. **B)** Modelo de Carpeta. **C)** Modelo de Poro toroidal.

Los péptidos no solo actúan a nivel de membrana, también lo hacen sobre objetivos citoplasmáticos. Una vez que se encuentran presentes en el interior de la célula se unen a moléculas intracelulares y esto provoca la inhibición de la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Peters *et al.*, 2010). Aún no se ha dilucidado el verdadero

mecanismo de los péptidos contra objetivos intracelulares, así que, esta actividad todavía se mantiene como una posible hipótesis.

2.1.2. Péptidos antimicrobianos de Plantas

Los PAs de plantas forman parte de sus mecanismos de defensa, son tejido específico, se expresan de manera constitutiva o pueden ser inducidos en respuesta al ataque de un patógeno. Comparados con la producción y acción de metabolitos secundarios, los PAs pueden aparecer inmediatamente después de que la infección es producida. Se expresan por un solo gen y se requiere menor gasto de energía (Thomma *et al.*, 2002; Lay y Anderson, 2005).

La mayoría de los PAs de plantas caracterizados hasta ahora, tienen un peso molecular en el intervalo de 2 a 10 kDa, son básicos, y debido a que son moléculas de secreción están compuestos por un péptido señal y un péptido maduro donde contienen 4, 6, 8 ó 12 residuos de cisteína que forman puentes disulfuro. Estos enlaces no solo le confieren estabilidad al péptido, sino que también son responsables de su actividad. Se clasifican de acuerdo a su identidad en secuencia de aminoácidos, número y posición de cisteínas. Hasta la fecha se han descrito doce familias de PAs en plantas y entre las familias más representativas se encuentran los péptidos de transferencia de lípidos (LTP's), las defensinas, tioninas y péptidos como heveínas, knotinas y snakinas (Tabla 1) (Tam *et al.*, 2015).

Se ha reportado que los PAs de plantas son capaces de inhibir diversas bacterias, especialmente las fitopatógenas y presentan actividad a bajas concentraciones, por ejemplo: las defensinas Pp-AMP1 y Pp-AMP2 muestran fuerte actividad sobre las bacterias fitopatógenas *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium radiobacter*, *Clavibacter michiganensis* y *Curtobacterium flaccumfaciens*, a una concentración que varía desde 13 a 25 µg/mL. Por otra parte, las proteínas tipo heveína Ac-AMP1 y Ac-AMP causan inhibición de crecimiento en *Bacillus megaterium* y *Sarcina lutea*, a concentraciones de 40 y 250 µg/mL, respectivamente (Barbosa *et al.*, 2011).

Tabla 1. Péptidos antimicrobianos de plantas. Modificada de Tam et al., 2015

Familia	Número de aminoácidos	Enlaces disulfuro	Actividad
LTPs	70-90	8	Bacterias y hongos
Defensina	45-54	4	Bacterias, hongos, citotóxico
Tionina	45-47	3-4	Bacterias, hongos, larvas de insectos.
Heveína	29-45	3-5	Bacterias Gram (+) y hongos
Knotina	30	3	Bacterias, citotóxico, insecticida, antiviral (VIH)
Snakina	61-100	6	Bacterias (Gram +,-) y hongos, citotóxico

Los PAs son el producto de proteínas que contienen un péptido señal, un predominio y una región correspondiente al péptido maduro. La presencia, longitud y posición relativa de estas regiones varía entre las diferentes familias de PAs, y solo el péptido maduro es el único que interactúa con el microorganismo (Lay y Anderson, 2005).

2.1.3. Péptido antimicrobiano snakina

La familia snakina es un novedoso PA de plantas que muestra similitud con los miembros de la familia de proteínas GASA que se caracterizan por ser estimuladas por ácido giberélico en *Arabidopsis thaliana*. Se ha reportado que están involucrados en procesos de división celular, metabolismo primario y composición de la pared celular en hojas. Estos péptidos ricos en cisteínas están extensamente distribuidos entre especies de plantas, incluidos papa, tomate, petunia, fresa, maíz, alfalfa y aguacate (Nahirñak *et al.*, 2012; García *et al.*, 2014).

Todas las snakinas están caracterizadas por doce residuos de cisteínas conservadas que están involucradas en la formación de seis puentes disulfuro (Segura *et al.*, 1999). Estos enlaces son importantes para mantener su estructura terciaria y también son responsables de su actividad biológica (Tam *et al.*, 2015). Presentan un péptido señal en la región N-terminal y un péptido maduro presente en la región C-terminal que es la secuencia biológicamente activa.

El primer miembro aislado y caracterizado de la familia de las snakinas de plantas, fue aislado un de un extracto celular de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) (SN1). Este péptido resultó mostrar actividad contra bacterias y hongos fitopatógenos como *Clavibacter michiganensis*, *Fusarium solani*, *Bipolaris maydis* y *Colletotrichum lagenarium*, a muy bajas concentraciones (<10µM). Los patrones de expresión del gen SN1 sugieren que podría ser un componente constitutivo de las barreras de defensa de la planta, especialmente de órganos reproductivos y de almacenaje. Un segundo péptido snakina (SN2), que presenta una fuerte identidad en secuencia de aminoácidos (30%) con SN1 y que también fue aislado de tubérculos de papa (Segura *et al.*, 1999), presentó actividad a bajas concentraciones sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002).

2.2. Expresión heteróloga en *Escherichia coli*

El sistema de expresión heteróloga es una de las técnicas más utilizadas en la biología molecular para producir grandes cantidades de proteínas. Los hospederos más utilizados son levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias como *Escherichia coli*, aunque también se utilizan células de mamífero y de insecto (Rai y Padh, 2001).

E. coli es una bacteria en forma de varilla con un cromosoma circular de cerca de tres millones de pares de bases (pb) de longitud, que puede crecer rápidamente en medio mínimo que contenga una fuente de carbono y sales que proporcionen nitrógeno, fósforo y algunas trazas de metales. Esta bacteria ha sido el huésped procarionte más utilizado para la expresión de proteínas recombinantes debido a que su genética molecular, fisiología y sistema de expresión han sido ampliamente caracterizados (Makrides, 1996; Choi y Lee, 2004). Su maquinaria ribosomal, que se encuentra en el citoplasma es un catalizador excelente de la biosíntesis de la proteína recombinante. *E. coli* facilita la expresión de proteínas por su relativa simplicidad, su cultivo de alta densidad barato y rápido, la genética bien conocida y el gran número de herramientas compatibles disponible para la biotecnología, especialmente la variedad de plásmidos disponibles y parejas de fusión recombinantes (Sorensen y Mortensen, 2005). En comparación con las células de mamífero o insecto, estas últimas resultan complicadas y costosas, además de tener un crecimiento lento; adicionalmente es difícil obtener líneas celulares transformadas y se necesita mayor densidad poblacional para obtener buenos rendimientos de la proteína recombinante (Mus-Veteau, 2002; Demain y Vaishnav, 2009).

La expresión de proteínas recombinantes mediante este sistema requiere de vectores específicos, conocidos como plásmidos, que son moléculas de ADN circular extracromosomal que se encuentra en bacterias y que no es esencial para la supervivencia de las mismas, pero que contienen genes que codifican proteínas

que les confieren ventajas adaptativas. Existe una gran variedad de vectores con una gran diversidad genética que facilitan la localización y purificación de la proteína. La secuencia o gen de interés puede ser insertado en el vector para formar un híbrido o plásmido recombinante que es capaz de replicarse puesto que presenta secuencias de iniciación de la replicación y promotores de la transcripción. Las construcciones (vector/secuencia o gen) son introducidas en las bacterias por un método de transformación, como el método de choque térmico o electroporación, que se fundamenta en la formación de poros en la membrana y pared celular para permitir la entrada del material genético hacia el interior de la célula (Rivera *et al.*, 2014).

La expresión de proteínas heterólogas en bacterias requiere que el vector presente un promotor transcripcional fuerte e inducible, para controlar la expresión del gen. El promotor Lac es el más utilizado para la expresión de proteínas, puesto que regula la transcripción del gen de manera condicionada. Cuando las células crecen en un medio en presencia de glucosa, la transcripción es bloqueada por el represor Lac, que es el producto de gen *LacI*, el cual evita que la ARN polimerasa inicie la transcripción. Para la expresión de proteínas recombinantes generalmente se emplean inductores químicos, de los cuales el más común es el Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) el cual interacciona con el represor *Lac* evitando que se inhiba la transcripción de genes que se encuentren bajo el control de ese promotor (Terpe, 2006).

2.2.1. Proteínas de fusión

Algunos vectores generan proteínas de fusión, proteínas que van ligadas a un péptido o proteína con características conocidas, que proporcionan un marcador de reconocimiento y simplifican el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad. Muchas proteínas recombinantes pueden ser obtenidas como proteínas de fusión con el objetivo de facilitar los procedimientos de purificación a partir del fragmento unido a la proteína. Las proteínas de fusión o proteínas quiméricas

incluyen generalmente una etiqueta ligada a la proteína pasajera o de interés, por un sitio de reconocimiento para una proteasa específica. Una gran variedad de polipéptidos o *tags* han sido empleados para la obtención de proteínas recombinantes, tales como: Glutación S transferasa (GST), polihistidinas (His-tag), tiorredoxina (TRX) y proteína de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés). La etiqueta His-tag y la MBP son comúnmente utilizadas para purificar las proteínas por cromatografía de afinidad. Las proteínas de fusión también presentan ventajas *in vivo*, ya que podrían proteger a la proteína pasajera de la proteólisis intracelular o incrementar la solubilidad (Rosano y Ceccarelli, 2014).

En el caso a la producción de PAs, el péptido podría llegar a tóxico para *E. coli* durante su expresión. Para evitar la toxicidad, las proteínas de fusión unidas al péptido tienen la capacidad de inhibir su actividad (Kapust y Waugh, 1999; Huang *et al.*, 2009). El péptido debe ser liberado de la proteína de fusión, y esto se hace con la ayuda de proteasas que cortan en sitios presentes en la secuencia de la proteína de fusión. Esto es necesario para que el PA pueda realizar su actividad biológica una vez que es purificado.

2.3. Expresión heteróloga de Snakina

Ruhul *et al.* (2016), realizaron la expresión de snakina-1 (SN1) de papa (*Solanum tuberosum*), utilizando un sistema de expresión heterólogo de origen eucarionte, en *Pichia pastoris*, obteniendo rendimientos de 40 mg/L de SN1. La purificación la realizaron utilizando residuos de histidina (His-tag) producidos por el vector pPIC9 y posteriormente otro paso de purificación para separar la mezcla de His-tag y SN1, mediante HPLC-FR.

En esta investigación se evaluó la actividad de SN1 recombinante contra bacterias (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* y *E. coli*) inhibiendo su crecimiento a concentraciones que van de 5 a 20 μM ; contra las levaduras *Candida parapsilosis* y *P. pastoris*, inhibiéndolas con 10 μM del péptido; y contra el hongo *Fusarium*

oxysporum, el que fue inhibido a una concentración de 60 μM de SN1 (Ruhul *et al.*, 2016).

En el 2009, Kovalskaya y Hammond también expresaron y purificaron la Snakina-1 (SN1) de papa (*Solanum tuberosum*), utilizando una cepa de *E. coli* BL21 como el sistema de expresión heteróloga, con el vector de expresión pET26b, que cuenta con la secuencia de polihistidinas (His-tag). En la construcción que realizaron, la secuencia que codifica para SN1 fue fusionado a la secuencia de His-tag, diseñada de esta manera para facilitar la purificación utilizando una resina Ni-NTA. Generalmente en *E. coli* se forman cuerpos de inclusión que mantiene insoluble a la proteína. En este trabajo demostraron mediante ensayos *in vitro*, que el péptido purificado mostró una fuerte actividad contra *Clavibacter michiganensis*, *Clostridium coccooides* y *B. cinerea*, con una actividad máxima de inhibición a una concentración de 14 μM . Con esto, demostraron un efectivo sistema de expresión procarionte para la generación y caracterización de proteínas vegetales ricas en cisteína con potencial actividad antimicrobiana.

Herbel *et al.* (2015), expresaron Snakina-2 (SN2) de tomate (*Solanum lycopersicum*), utilizando un sistema de expresión procarionte con el vector pET-32c, que cuenta con la secuencia His-tag y de TRX, para facilitar la purificación del péptido. La secuencia codificante para SN2 fue fusionado a tiorredoxina para enmascarar su actividad durante la expresión en *E. coli* BL21 e incrementar la solubilidad de la proteína. Purificaron la proteína mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna Ni-TED. Para liberar la proteína de fusión utilizaron una proteasa TEV, debido a que SN2 no presenta actividad si permanece unida a la proteína de fusión. Obtuvieron un rendimiento de 3 mg/L de proteína de fusión, donde 1 mg/L correspondía a SN2. Los ensayos antifúngicos los realizaron con la mezcla de proteínas, SN2-Trx, puesto que no pudieron separar la proteína de fusión de la mezcla. SN2 mostró una fuerte actividad antimicrobiana contra hifas de un hongo fitopatógeno, *Fusarium solani*, donde reportan una concentración mínima inhibitoria de 4.25 μM .

2.3. El fruto de Aguacate

El aguacate es originario de las regiones tropicales y subtropicales de Centroamérica y México. Desde los tiempos precolombinos esta fruta era consumida por las poblaciones indígenas, siendo de gran importancia tanto para la civilización Maya como Azteca. Fue introducido por los españoles a las Antillas, luego se extendió a Florida, California y a varios países sudamericanos, donde se generaron mejoras genéticas tanto en factores agronómicos como de calidad. Posteriormente se dispersó a varias regiones del mundo en donde existían las condiciones ecológicas para su desarrollo (Garbanzo, 2011).

El árbol de aguacate puede alcanzar una altura de hasta 20 metros, sin embargo, cuando se cultiva no se deja crecer más de cinco metros, para facilitar las prácticas de control fitosanitario, cosecha, poda y fertilización foliar. Es de tronco grueso y con hojas alargadas que terminan en punta en la parte alta del tronco. Es considerado un producto perene debido a que se cultiva todo el año. El fruto es una baya (fruto carnoso con hueso en su interior) en forma de pera, de color verde claro a verde oscuro y de violeta a negro (SAGARPA, 2011).

El aguacate comprende tres variedades, Mexicana, Guatemalense y Antillana: La variedad Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*) tiene como característica principal el aroma a anís que libera al triturar las hojas y por presentar una cáscara delgada en el fruto; variedad Guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*), que se caracteriza por tener una cáscara gruesa en el fruto, esta variedad se adapta a zonas altas e intermedias; y la variedad Antillana (*P. americana* var. *americana*), que crece en zonas tropicales y produce frutos grandes y cáscara gruesa. De estas variedades se derivan diversos cultivares como el Hass, Fuerte, Bacon, Reed, Pinkerton y Gwen (Garbanzo, 2011).

México aporta 3 de cada 10 toneladas de aguacate que se producen en el mundo lo cual lo coloca como el país exportador del fruto número uno seguido por

Indonesia, quien exporta 294 mil toneladas en tanto México supera el millón 316 mil toneladas anuales (SAGARPA, 2015). El principal estado productor es Michoacán, seguido por Morelos, Nayarit, Jalisco y Guerrero (SAGARPA, 2007). Michoacán aporta el 85 % de la exportación total del fruto (SAGARPA, 2015).

2.4. Hongos fitopatógenos de interés agronómico.

2.4.1 *Colletotrichum gloeosporioides*.

Colletotrichum gloeosporioides es el principal patógeno poscosecha del fruto de aguacate, su infección causa antracnosis en el fruto y posteriormente provoca la pudrición de éste (Everett y Pak, 2002). El patógeno ataca diferentes partes de la planta: en las hojas se observan pequeñas manchas de color café claro; en ramas tiernas da origen a exudados de color blanco, puede secar las partes atacadas que generalmente son las puntas de las ramas, en cuyo caso se le conoce como “marchitez de las puntas”; también ataca como tizón de las flores, originando su caída o aborto de los frutos (Vidales *et al.*, 2005); en frutos, inicialmente los síntomas aparecen como lesiones circulares pequeñas de color café claro. Cuando la lesión se alarga, se torna hundida en el centro y cambia a color café oscuro o negro. Bajo condiciones de humedad, aparecen masas de esporas de color salmón en el centro de las lesiones.

Las infecciones pueden ocurrir durante periodos extendidos de tiempo, en climas cálido y lluvioso. Las infecciones más severas ocurren durante los meses de junio a agosto y en menor grado en los meses de febrero y marzo, cuando se presentan condiciones de alta humedad. El clima cálido favorece la presencia de la enfermedad, durante el día con 18° a 30° C y fríos nocturnos en zonas húmedas con >60 % de humedad relativa. La enfermedad en frutos se disemina por los daños causados por golpes o en cuando es cosechado (Vidales *et al.*, 2005).

2.4.2. *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea es el agente causal de la “podredumbre gris”, infecta más de 200 especies vegetales distintas, determinando serias pérdidas económicas antes y después de la recolección. El patógeno puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo del mismo y puede infectar cualquier parte de la planta. Es un patógeno de rápido crecimiento y capacidad de adaptarse a condiciones adversas para su desarrollo (Benito *et al.*, 2000).

Como todo los miembros del género *Botrytis*, actúa como patógeno necrótrofo, infectando los tejidos del huésped e induciendo su necrosis, pero además es capaz de sobrevivir y formar estructuras de resistencia (esclerocios) en el tejido necrótico generado por la infección (Van-Kan, 2006). De esta manera, las fuentes de inóculo en el cultivo son múltiples, dada su posibilidad de infectar y sobrevivir en partes verdes y muertas del propio cultivo y de las malas hierbas adyacentes (Holz *et al.*, 2007).

2.5. Snakina de aguacate.

En nuestro grupo de trabajo, Guzmán-Rodríguez *et al.* (2013), identificaron de una biblioteca de ESTs de semilla de aguacate "nativo mexicano", una secuencia que codifica para el PA snakina (*PaSn*), el cual es un componente del sistema inmune en plantas y se expresa de manera abundante en la semilla de aguacate variedad Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*). Para probar su actividad antimicrobiana, realizaron la expresión heteróloga de *PaSn* en un sistema de origen eucarionte, utilizando células endoteliales de bovino. Lograron expresar la proteína pero ésta se excreta al medio extracelular y para realizar los bioensayos utilizaron el medio condicionado donde reportaron que la proteína recombinante presentó actividad antimicrobiana en contra de *E. coli* y *Staphylococcus aureus* a una concentración de 100 µg/mL de proteína total. En este trabajo reportan la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de *PaSn* de aguacate, que se muestra en la figura 3. Está compuesto

3. Justificación

Los péptidos antimicrobianos de plantas son una alternativa para utilizarse en la protección de los cultivos contra sus microorganismos patógenos. Sin embargo hace falta un mejor conocimiento de sus actividades antimicrobianas, mecanismo de acción tanto en patógenos como en la fisiología de la planta. Por estas razones, es importante plantear estrategias con modelos que aseguren una alta producción como los sistemas de expresión heteróloga.

En particular, la snakina de aguacate presenta actividad contra bacterias patógenas de humano pero se desconocen sus propiedades antifúngicas y aunque ha sido expresada de manera heteróloga en células endoteliales de bovino, los rendimientos son bajos.

Por lo tanto, es de nuestro interés producir la snakina de aguacate de manera heteróloga, utilizando el sistema de *Escherichia coli*-pMAL-c5x, con la finalidad de conseguir un mayor rendimiento del péptido y evaluar su actividad antifúngica.

4. Hipótesis

La snakina *PaSn* de aguacate “nativo mexicano” (*Persea americana* var. *drymifolia*) producida en el sistema heterólogo *E. coli* - pMAL presenta actividad antifúngica.

5. Objetivos

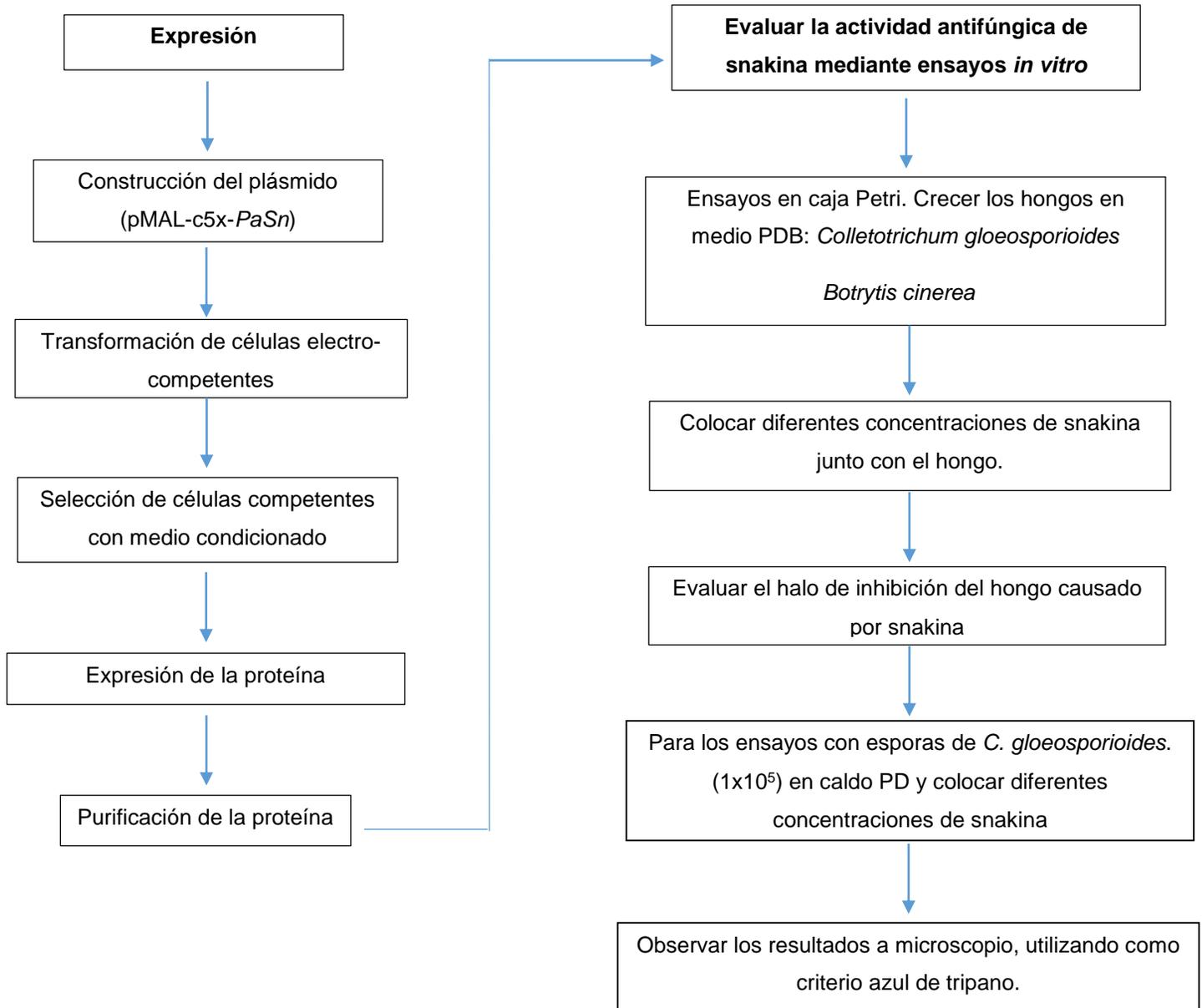
5.1. Objetivo general

Expresar la snakina *PaSn* de aguacate “nativo mexicano” (*Persea americana* var. *drymifolia*) en el sistema heterólogo *E. coli* - pMAL y evaluar su actividad antifúngica.

5.2. Objetivos específicos

1. Expresar la snakina *PaSn* de aguacate “nativo mexicano” en el sistema heterólogo *E. coli* - pMAL y purificar el péptido.
2. Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de la snakina *PaSn* de “aguacate nativo mexicano”.

6. Estrategia experimental



7. Capítulo 1. Expresión de la snakina *PaSn* de aguacate “nativo mexicano” en el sistema heterólogo *Escherichia coli* - pMAL y purificación del péptido

7.1. Introducción

El vector pMAL-c5x proporciona un método para la expresión y purificación de una proteína producida a partir de un gen clonado. El vector está diseñado para producir una proteína de fusión llamada Proteína de Unión a Maltosa (MBP por sus siglas en inglés), donde la proteína de interés puede ser separada de la MBP con una proteasa específica, el Factor Xa (FXa) que realiza la digestión entre los aminoácidos Isoleucina (Ile) y Arginina (Arg). El sitio de clonación múltiple se encuentra río abajo del sitio *XmnI*, dicho sitio codifica para cuatro aminoácidos Ile-Glu-Gly-Arg, entre los cuales el FXa realiza el corte para realizar la separación sin dejar residuos de la MBP en la proteína de interés. El gen de interés es liga al vector vector pMAL-c5x río abajo del gen *malE* que codifica para MBP.

Escherichia coli (ER2523) es recomendada para hacer la propagación y subclonación del vector. Para realizar la selección de las transformantes se utiliza un medio condicionado debido a que el vector contiene el gen *bla* de resistencia a carbenicilina. El vector utiliza un promotor fuerte P_{tac} para dar inicio a las señales de transcripción de la MBP para expresar grandes cantidades de la proteína de fusión. El vector pMAL-c5x expresa a la MBP en el citoplasma. La proteína de fusión se purifica con una columna pre-empaquetada de resina de amilosa MBP-Trap HP mediante cromatografía de afinidad. El vector pMAL-c5x se muestra en la figura 4.

7.2. Materiales y Métodos

Vector de expresión pMAL-c5x.

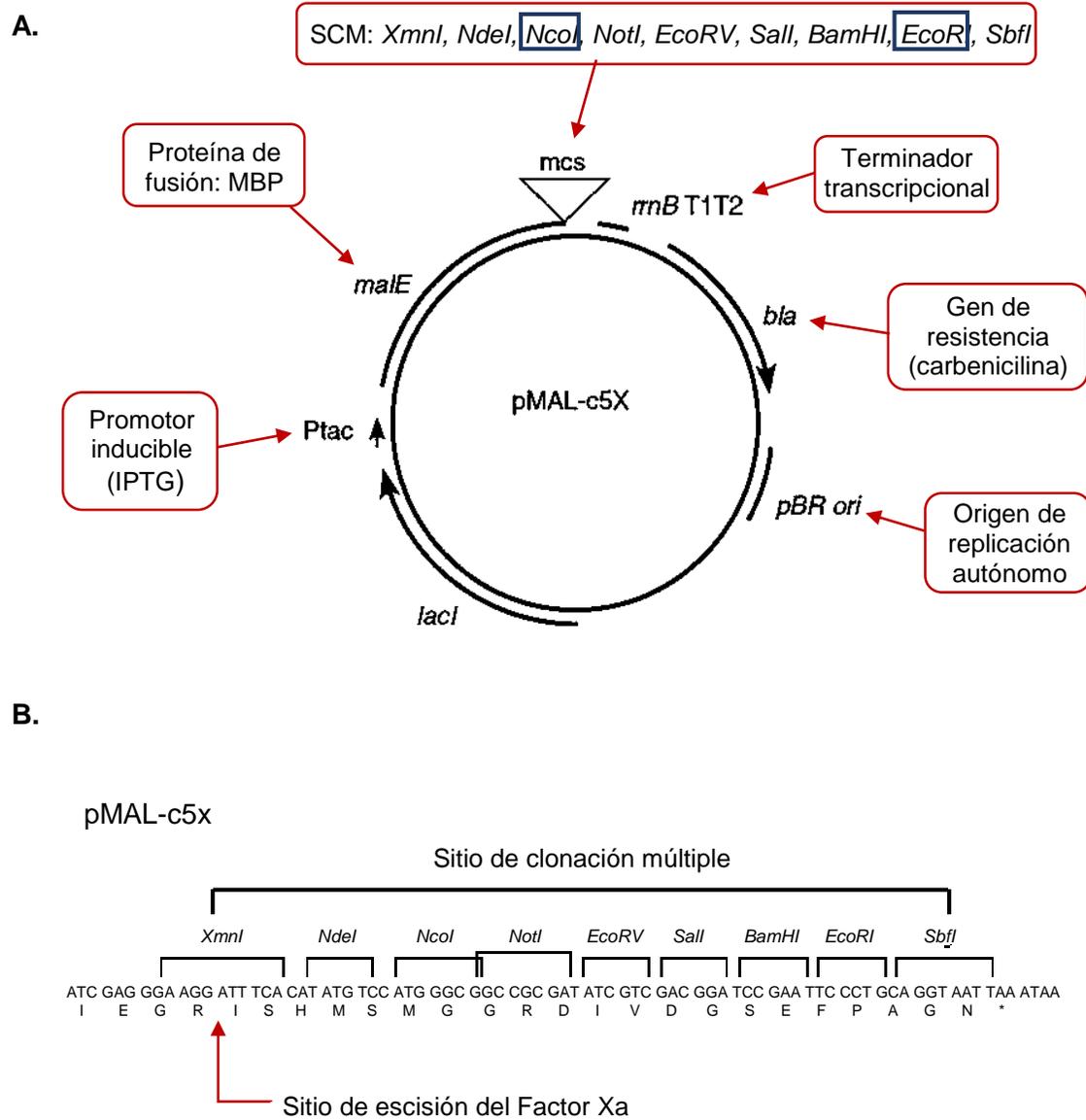


Figura 4. Mapa del vector de expresión pMAL-c5x (New England BioLabs #Cat. N8108S). **A)** Componentes del vector de expresión. **B)** Sitio de reconocimiento del Factor Xa que se encuentra en el vector.

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos para amplificar el EST del PA snakina *PaSn* de aguacate se diseñaron a partir de la secuencia reportada por Guzmán-Rodríguez *et al.* (2013) (Figura 5). Para facilitar la subclonación se incorporaron los sitios de restricción de las enzimas *NcoI* y *EcoRI* considerando solo el péptido maduro utilizando el programa UGENE (Tabla 2).

5' **TTTCAGTCTCATT**CGCTGCCTACACCTGCGGATGAGAGAAATCTCCTTCAAC
 AAATAGATTGCGGGACATCTTGTTCTGCGAGGTGTCGATTGTCATCAAGGCCT
 AGACTCTGCAAGAGGGCTTGTGGGACATGTTGTGCGAGGTGCAACTGCGTAC
 CATCAGGAACTGCAGGCAACTTAGACGAGTGCCCTTGCTACGCCAACATGAC
 TACTCAT**GGGAACAAACGCAAATGTCCTTAA** 3'

Figura 5. Secuencia de nucleótidos del péptido maduro de *PaSn* (240 pb). En sombreado con gris se muestra la zona donde se diseñaron los oligonucleótidos.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos generados para realizar la subclonación. En negritas se muestran los sitios agregados (*NcoI* y *EcoRI*).

Fw	<i>NcoI</i>	5' CAT GCC ATG GCA TGG TTT CAG TCT CAT TCG 3'
Rv	<i>EcoRI</i>	5' CCG GAA TTC TTA AGG ACA TTT GCG TTT GTT CC 3'

Verificación de la fase de *PaSn*

Para revisar la secuencia en fase del inserto en el vector, se diseñaron los oligonucleótidos para secuenciación donde se tomó como referencia las zonas río arriba y río abajo del sitio de clonación múltiple perteneciente al vector pMAL-c5x (Figura 6).

```
5'GACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAATAACAATAACAACA  
ACCTCGGGATCGAGGGAAGGATTCACATATGTCCATGGGCGGCCGCGATAT  
CGTCGACGGATCCGAATTCCCTGCAGGTAATTAATAAGCTTCAAATAAAACG  
AAAGGCTCAGTCGAAAGACTGG3'
```

Figura 6. Secuencia perteneciente al vector pMAL-c5x. En sombreado con gris se muestra la zona de donde se diseñaron los oligonucleótidos y en letras rojas se representan los sitios *NcoI* y *EcoRI* que se encuentran en el sitio de clonación múltiple del vector.

Amplificación del EST del PA snakina *PaSn* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se partió de una clona de snakina *PaSn* que se encuentra dentro del vector pTracer. La reacción de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones de amplificación. Activación: 94 °C por 2 min (1 ciclo), desnaturalización: 94 °C por 15 seg, alineamiento: 63 °C por 30 seg, extensión: 72 °C por 30 seg (35 ciclos), elongación 72 °C por 7 min (1 ciclo). Componentes y concentraciones: dNTP's 10 mM 1µL, Buffer 10X 1µL, MgCl₂ 50 mM 0.3µL, *Taq* polimerasa 5U/µL 0.2µL, Oligonucleótidos Fw y Rv 10 mM 1µL respectivamente, ADN 50 µg/mL 1µL, H₂O grado molecular 4.5µL, volumen final de 10µL.

Extracción de ADN plasmídico (Mini-Prep)

Las extracciones de ADN plasmídico se realizaron por la técnica de lisis alcalina y la metodología descrita por Birnboim y Doly (1979).

Digestión enzimática del ADN

Para las digestiones se utilizaron las enzimas *NcoI* y *EcoRI*. La mezcla de reacción por 1 h a 37° C. Componentes: Enzimas de restricción *NcoI* y *EcoRI* 1µL respectivamente, Buffer 10X 2µL, Vector pMAL-c5x/*PaSn* 4µL respectivamente, H₂O 12µL, volumen final 20µL.

Purificación de productos de PCR

Se utilizó el kit Zymoclean Gel Recovery Kit (Zymo Research) para realizar la limpieza de los productos de PCR.

Reacción de ligación

La mezcla de ligación (pMAL-*PaSn*) se realizó en un volumen total de 20µL. Se incubó durante 24 h a -4 °C. Componentes: Buffer 5X ligasa 4µL, T4 DNA ligasa 1µL, Vector pMAL-c5x 3µL, ADN *PaSn* 6µL, H₂O 6µL, volumen final 20µL (T4 DNA Ligasa (Invitrogen® No.Cat.15224-017)).

Limpieza de ADN plasmídico

Se utilizó el kit ZR ADN Sequencing Cleanup (Zymo Research) para la limpieza de ADN plasmídico.

Transformación de *E. coli* cepa ER2523

Se agregaron 3µL de la reacción de ligación a un tubo que contenía 30µL de células competentes (ver apéndice). Esto se colocó en una celda de electroporación aplicando un pulso de 2,500 volts. Se sacó la celda del electroporador (eppendorf 2510) y el contenido se pasó a un tubo eppendorf y se adicionó 500µL de medio LB. Se incubó a 37 °C con agitación durante 1 h. Por último se tomaron 100µL homogenizando cuidadosamente con una micropipeta y se colocaron en cajas Petri con medio LB con antibiótico (carbenicilina 100 mg/mL), se distribuyó con perlas de cristal y se dejaron incubando toda la noche a 37 °C.

Expresión de la proteína de fusión

Se inocularon células transformadas en 3 mL de caldo LB con carbenicilina y se crecieron durante toda la noche a 37 °C. Del cultivo de toda la noche se tomó 1 mL y se puso a incubar a 37 °C en 100 mL de caldo LB con carbenicilina hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 (D.O.₆₀₀). Una vez alcanzada la densidad esperada se transfirió el cultivo a tubos eppendorf de 1.5 mL y se les adicionó 22µL de IPTG a una concentración final de 0.3 mM y se incubaron durante 2 h a 37 °C.

Se separaron las muestras en un volumen final de 0.5 mL y se centrifugaron por un minuto a 12,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100µL de buffer de muestra (ver apéndice). Después se hirvieron las muestras durante 5 min. Se guardaron las muestras a -20 °C hasta su uso.

Purificación de la proteína por cromatografía de afinidad

Se inocularon 500 mL de caldo LB más glucosa y carbenicilina con 5 mL de cultivo de células con el plásmido de fusión y se incubó a 37° C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5, aproximadamente 2×10^8 células/mL. Posteriormente se agregó IPTG para una concentración final de 0.3 mM, y se incubaron las células a 37° C por 2 h. Se cosecharon las células por centrifugación a 6000 rpm por 20 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 20 mL de buffer de columna. Se colocó la

muestra en hielo y se sonicó cada muestra con un pulso corto de 15 seg o menos, hasta alcanzar un tiempo de tratamiento con ultrasonidos de 2 min. Se centrifugó a 14000 rpm por 30 min. Se guardó el sobrenadante (extracto crudo) para diluirlo con buffer de columna 1:6. Se cargaron 5 mL de muestra en el equipo de purificación ÄKTA-pure (General Electric) y se siguieron las instrucciones del fabricante para una columna de purificación MBPTrap Hp de 1 mL. Las fracciones colectadas posteriormente fueron cuantificadas mediante un ensayo de Bradford a una longitud de onda de 595 nm (modificado de New England BioLabs #Cat. N8108S).

Separación de la proteína de fusión con el FXa

En tubos de 500 μ L, se mezclaron 20 μ L de proteína de fusión MBP-snakina obtenida del paso de purificación con 0.2 μ L del Factor Xa (FXa) a una concentración de 1 mg/mL. La mezcla de reacción de temperatura ambiente durante 24 h y se verifico realizando un SDS-PAGE al 10%.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Amplificación del EST del PA snakina *PaSn*

La región codificante para el péptido maduro de *PaSn* fue amplificado por PCR usando los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia reportada por Guzmán-Rodríguez *et al.* (2013), utilizando ADN plasmídico de la clona *PaSn*-pTracer con los sitios de restricción elegidos (*NcoI*-*EcoRI*).

La amplificación por PCR de *PaSn* desde el plásmido pTracer se confirmó en un gel de agarosa al 12 %. El fragmento amplificado aparece a la altura de las 240 pb que comprenden al péptido maduro. Los resultados se muestran en la figura 7.

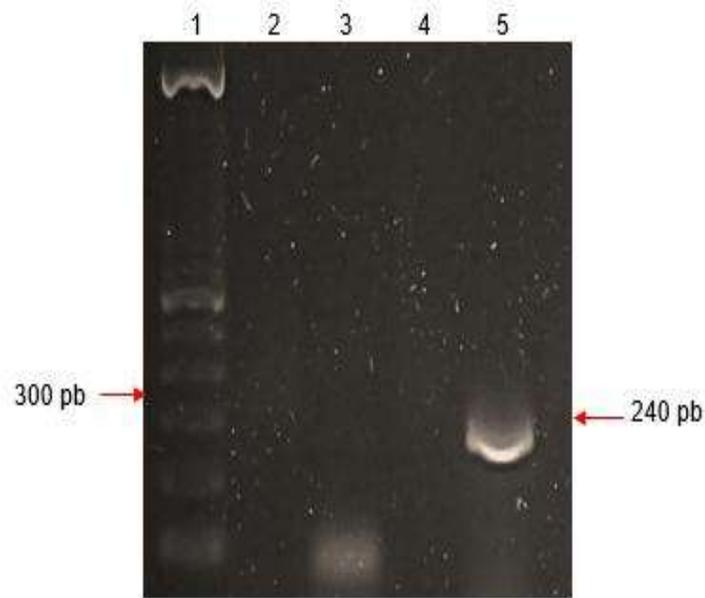


Figura 7. Amplificación de *PaSn* por PCR. **1:** Marcador de tamaño molecular, **3:** Control negativo, **5:** Fragmento amplificado de *PaSn*.

Se purificó el producto amplificado de *PaSn* y la recuperación del producto se confirmó en un gel de agarosa al 1.2 % (ver apéndice). El fragmento purificado se observa a una altura de 240 pb, como se muestra en la figura 8.

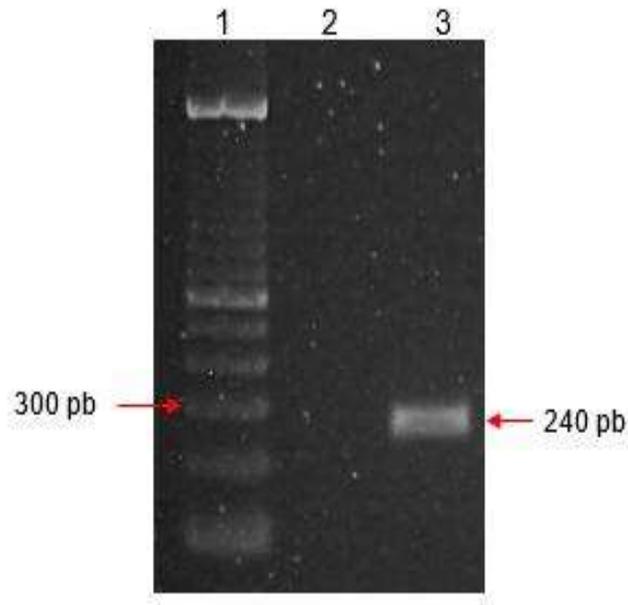


Figura 8. Electroforesis del producto de PCR purificado. **1:** Marcador de tamaño molecular, **3:** Producto de PCR purificado.

7.3.2. Doble digestión de *PaSn* y pMAL-c5x

El producto de amplificación de *PaSn* y el vector pMAL-c5x fueron digeridos con las enzimas de restricción *NcoI* y *EcoRI*, correspondientes a los sitios de clonación múltiple presentes en el vector pMAL-c5x. Para corroborar las digestiones, se tomaron 5 μ L de la reacción y se corrieron en un gel de agarosa al 1.2 %. El fragmento de *PaSn* se observó en el tamaño de 240 pb y el vector pMAL-c5x linearizado se observó arriba de 1 kb, como se observan en la figura 9, de esta manera se verifica la doble digestión de ambos productos.

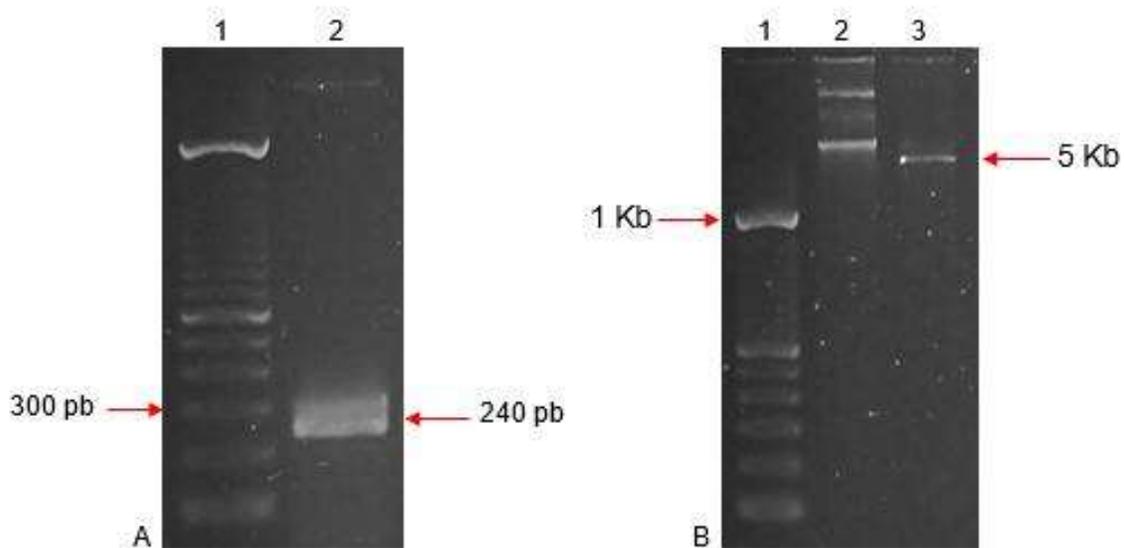


Figura 9. Digestiones enzimáticas de *PaSn* y pMAL-c5x con *NcoI* y *EcoRI*. **A)** Doble digestión de *PaSn*. 1: Marcador de tamaño molecular, 2: *PaSn*. **B)** Doble digestión del vector pMAL-c5x. 1: Marcador de tamaño molecular, 2: Vector sin digerir, 3: pMAL-c5x.

7.3.3. Construcción del vector de expresión pMALc5x-*PaSn*

La clonación del fragmento de *PaSn* se realizó en el sitio de clonación múltiple del vector pMAL-c5x mediante una reacción de ligación. El vector pMAL-c5x contiene el gen *malE* que codifica para la proteína de unión a maltosa (MBP), la cual se fusionó a la secuencia de *PaSn* para facilitar los pasos subsecuentes de purificación. También contiene el gen *bla*, el cual confiere resistencia a carbenicilina. El mapa de la construcción pMALc5x-*PaSn* se muestra en la figura 10.

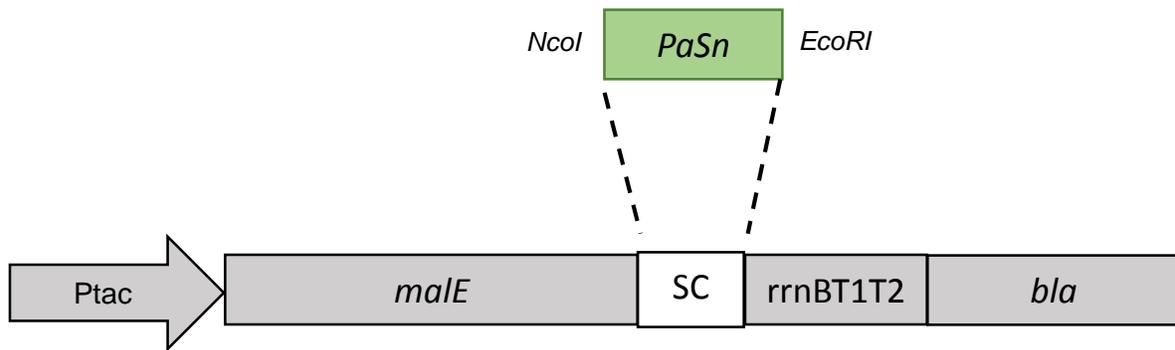


Figura 10. Mapa del vector de expresión pMALc5x-*PaSn*. **Ptac**: Promotor; **malE**: Proteína de unión a maltosa; **SCM**: Sitios de clonación múltiple; **PaSn**: Fragmento insertado; **rrnBT1T1**: Sitio de paro; **bla**: Gen de resistencia a antibiótico.

Se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* ER2523 con la construcción pMALc5x-*PaSn* y se crecieron en medio de selección con antibiótico 100 mg/mL (LB-CB). Se seleccionaron al azar diez colonias y se les realizó un ensayo (extracción de ADN plasmídico) para verificar la presencia del inserto de *PaSn* mediante una reacción de PCR y doble digestión al vector. Los resultados se muestran en las figuras 11 y 12, donde se presenta el crecimiento de la cepa ER2523 transformada y las reacciones de PRC y además una doble digestión. Con ello se corroboró la presencia del inserto *PaSn* en las células transformadas.

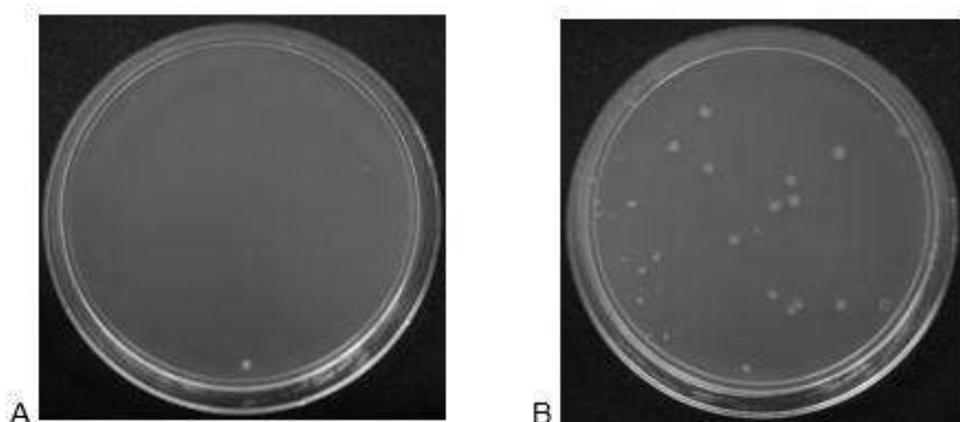


Figura 11. Crecimiento de colonias de *E. coli* ER2523 transformadas con el vector de expresión pMALc5x-*PaSn* en medio LB de selección. **A**) Control negativo, **B**) Células transformadas.

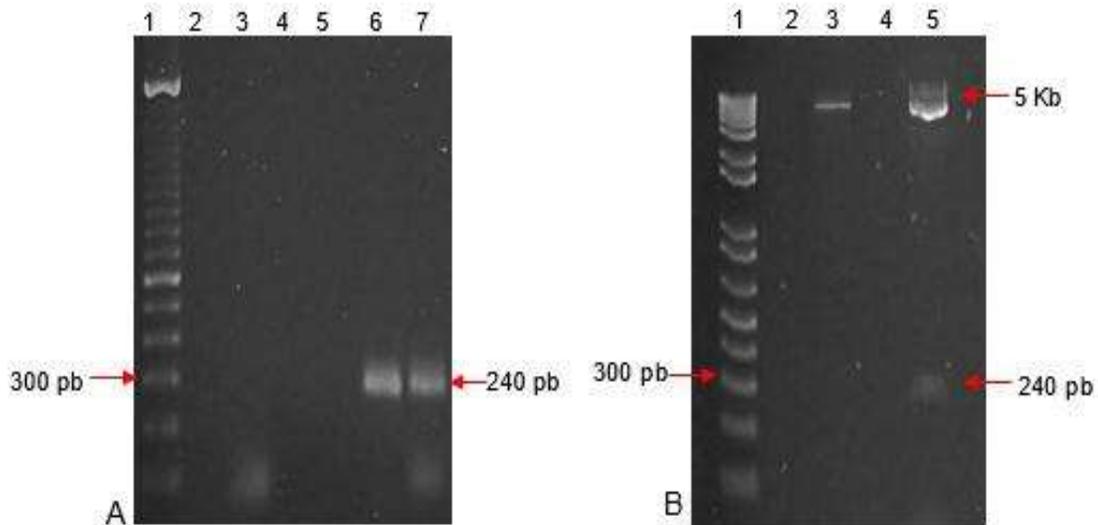


Figura 12. PCR y doble digestión de ADN de células transformadas. **A)** PCR. **1:** Marcador de tamaño molecular, **3:** Control negativo, **6:** Control positivo *PaSn*, **7:** Fragmento amplificado de una colonia transformada con el vector pMALc5x-*PaSn*. **B)** Doble digestión. **1:** Marcador de tamaño molecular, **3:** Control negativo (vector pMALc5x sin el inserto *PaSn*), **5:** Doble digestión con el inserto *PaSn* liberado.

7.3.4. Verificación de la secuencia de *PaSn* en fase de expresión

Los oligonucleótidos para secuenciación (ver materiales y métodos) se utilizaron para realizar un PCR con el ADN de las células transformadas con el vector pMALc5x y el ADN del vector sin el inserto de *PaSn*. En la imagen se observa el fragmento amplificado con los oligonucleótidos de secuenciación, que tiene un tamaño de 398 pb, como se muestra en la figura 13.

El ADN plasmídico de las células transformadas se envió a secuenciar utilizando los oligonucleótidos antes mencionados, al departamento de servicios genómicos del LANGEBIO (CINVESTAV-IPN Campus Guanajuato), ésta fue realizada por el método Sanger. En los resultados de secuenciación se identificó la secuencia de *PaSn* en fase de expresión confirmando de esta manera su clonación correcta (Figura 14). Se resalta en negritas la secuencia de nucleótidos y sombreado en gris la secuencia de aminoácidos pertenecientes a la secuencia de *PaSn*.

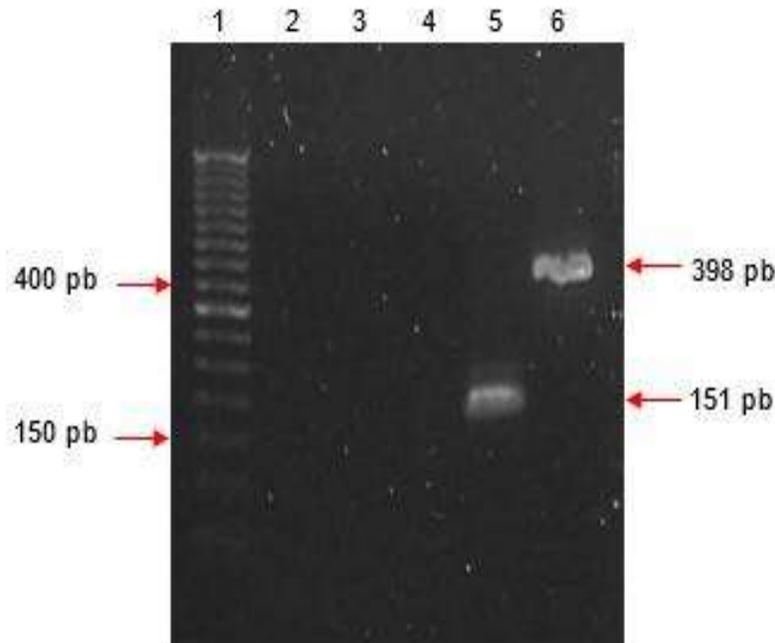


Figura 13. Amplificación por PCR del fragmento clonado en el vector pMAL-c5x. **1:** Marcador de tamaño molecular, **3:** Control negativo, **5:** pMAL-c5x, **6:** pMALc5x-*PaSn*.

```

1 M S M A W F Q S H S L P T P A D E R N L

1 ATGTCCCATGGCATGGTTTCAGTCTCATTCGCTGCCTACACCTGCGGATGAGAGAAATCTC
1      10      20      30      40      50
21 L Q Q I D C G T S C S A R C R L S S R P
61 CTTCAACAAATAGATTGCGGGACATCTTGTCTGCGAGGTGTCGATTGTCATCAAGGCCT
61      70      80      90      100     110
41 R L C K R A C G T C C A R C N C V P S G
121 AGACTCTGCAAGAGGGCTTGTGGGACATGTTGTGCGAGGTGCAACTGCGTACCATCAGGA
121      130     140     150     160     170
61 T A G N L D E C P C Y A N M T T H G N K
181 ACTGCAGGCAACTTAGACGAGTGGCCCTTGCTACGCCAACATGACTACTCATGGGAACAAA
181      190     200     210     220     230
81 R K C P
241 CGCAAATGTCCT

```

Figura 14. Verificación del marco de lectura por secuenciación del plásmido recombinante. En negritas se resalta la secuencia de nucleótidos y en gris la secuencia se aminoácidos pertenecientes al EST de snakina *PaSn* reportada por Guzmán-Rodríguez *et al.*, (2013).

7.3.5. Expresión de la proteína de fusión MBP-snakina *PaSn*

Una vez que se corroboró que la secuencia de *PaSn* se encontraba en fase, lo siguiente fue a expresar la proteína, para lo cual se siguió la metodología descrita previamente en materiales y métodos. La proteína MBP tiene un peso de 44 kDa y el péptido de 8 kDa, que fusionados representan un peso de 52 kDa. En la figura 15 se observa la expresión de la proteína de fusión MPB-snakina *PaSn* con un tamaño calculado de 52 kDa. Comparado con la expresión de la MBP (Figura 15, carril 2) se puede confirmar claramente la exitosa expresión de la proteína de fusión.



Figura 15. SDS-PAGE de proteínas totales de la cepa transformada. **1:** Estándar de amplio rango de peso molecular, **2:** Expresión de MBP, **3:** Proteína de fusión MBP-snakina *PaSn*.

7.3.6. Purificación de la proteína de fusión

Para la purificación se partió de un cultivo celular de 500 mL y se cargaron en el equipo solamente 5 mL de una muestra de proteínas solubles totales. La muestra de proteínas solubles totales tenía una concentración de 10 mg/mL y después del paso de purificación se obtuvo una concentración de 3 mg/mL correspondientes a la proteína recombinante, y de esos 3 mg, 700 µg corresponden a snakina *PaSn*, entonces, por cada 5 mL se obtienen aproximadamente 1 mg de péptido purificado, y en 1 L se estarían obteniendo 200 mg de proteína pura.

De las fracciones obtenidas, solo se tomaron en cuenta aquellas donde se observó mayor contenido de proteína purificada de acuerdo con la gráfica arrojada por equipo de purificación ÄKTA-pure. Los resultados del paso de purificación se muestran en la figura 16.

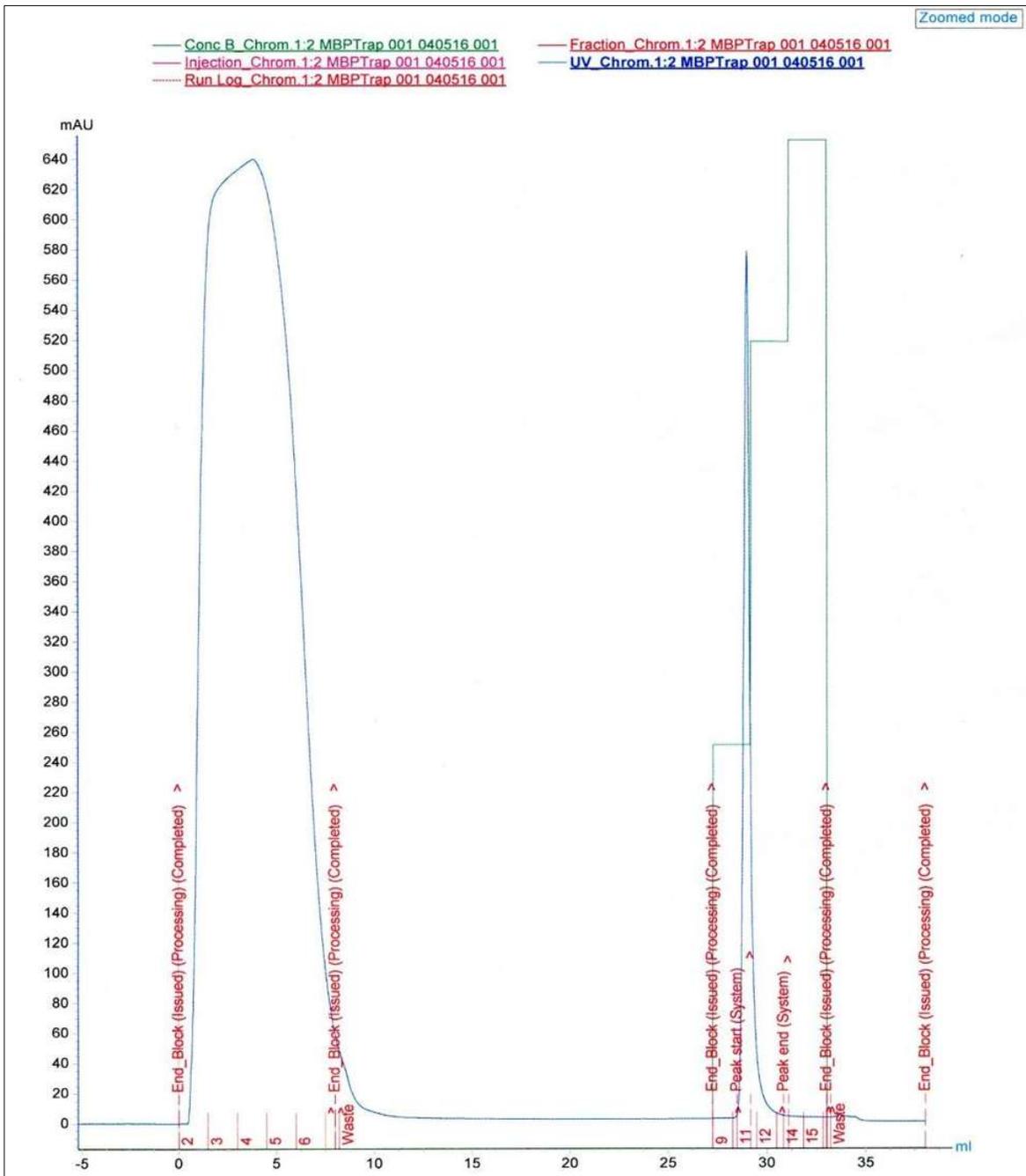


Figura 16. Gráfica de purificación de la proteína recombinante MBP-snakina *PaSn*. En el eje de las X de la gráfica se encuentran en números rojos las fracciones colectadas. De las fracciones 2 a 6 representan la proteína que no se unió a la columna y las fracciones 11 y 12, donde aparece el pico más alto, representan a la proteína que se unió a la columna y donde se encuentra la proteína de fusión MBP-snakina *PaSn*.

De los resultados del paso de purificación, se seleccionaron las fracciones 11 y 12, y se corrieron en un gel de acrilamida al 10%. De acuerdo con los resultados obtenidos del gel, se eliminaron las proteínas totales y solo se obtuvo la proteína de fusión MBP-snakina *PaSn* que presenta un tamaño de 52 KDa. Solo en la fracción 11 se obtuvo la proteína de fusión purificada, como se muestra en la figura 17.

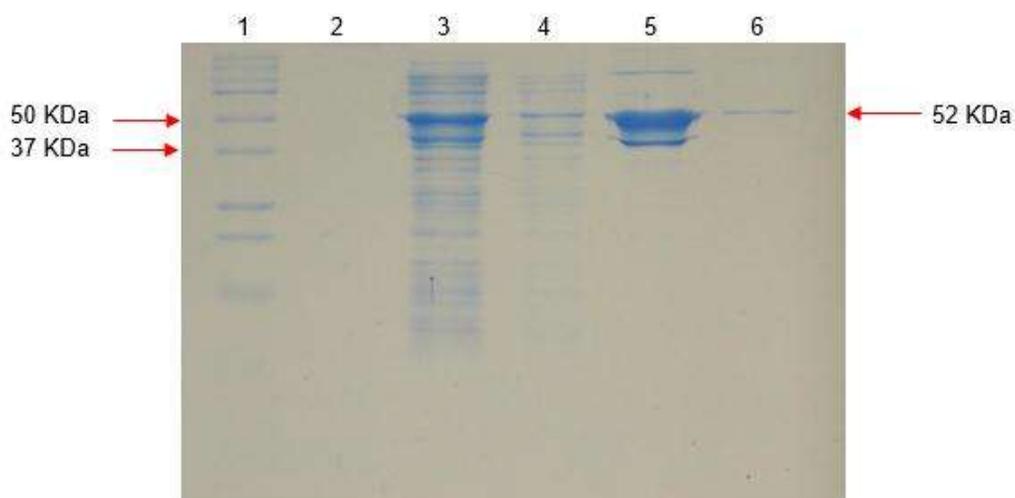


Figura 17. SDS-PAGE de la proteína de fusión purificada. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de muestra. 1: Estándar de peso molecular 3: Proteínas totales, 4: proteínas que no se unieron a la columna, 5-6: Fracciones 11 y 12.

7.3.7. Liberación de la proteína de fusión con el Factor Xa (FXa)

De acuerdo a los resultados obtenidos de la purificación y de los datos corroborados en el gel de acrilamida, se optó por utilizar la fracción 11, que fue donde se observó la proteína MBP-snakina *PaSn*. Esta muestra fue sometida a digestión con el FXa para liberar la snakina *PaSn* de la MBP. La separación es necesaria para que el péptido pueda presentar actividad. La digestión se corroboró en un gel de acrilamida al 10%, donde se observó la separación de las bandas (Figura 18). La MBP se encuentra en un peso mayor a los 37 KDa y la snakina *PaSn* se encuentra entre las bandas de 14 y 6 KDa correspondientes al estándar de bajo rango. De esta manera

se confirmó la separación de las proteínas. Una vez confirmada la separación de la MBP se le adicionó a la muestra buffer de resuspensión en relación 1:3.

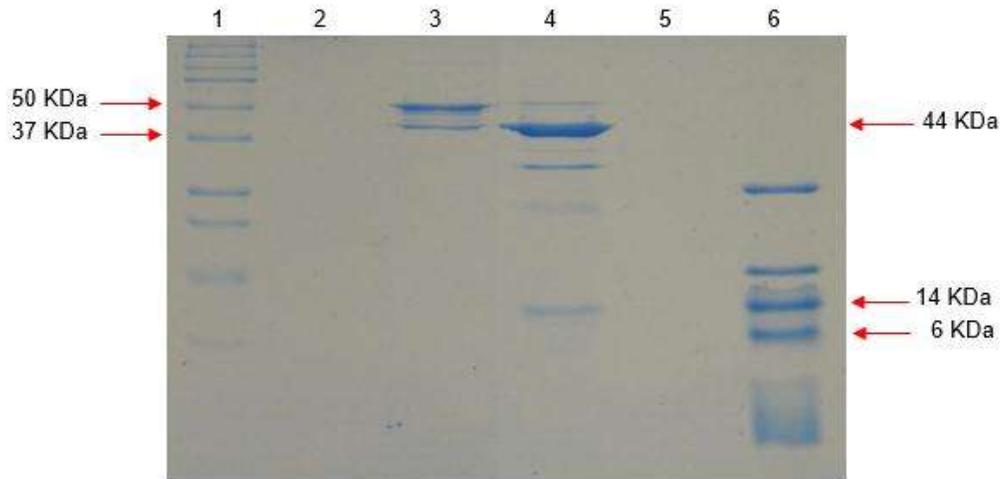


Figura 18. SDS-PAGE de la separación de la MBP y snakina *PaSn* realizada con el FXa. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de muestra. **1:** Estándar de peso molecular de amplio rango, **3:** Fracción 11 no digerida, **4:** Fracción 11 digerida con el FXa, **6:** Estándar de bajo peso molecular.

Para establecer las concentraciones del péptido por cada muestra, se realizó un análisis densitométrico con ayuda del programa Image-J. Se analizó la densidad de bandas por carril en escala de grises; el programa arroja una gráfica donde cada pico representa una banda en el carril y la intensidad que muestra dicha banda, posteriormente se estimó el área bajo la curva de los picos y se calculó la concentración de cada banda en relación al total de proteína que fue cargada en el pozo. En la figura 19 se muestra la imagen del análisis densitométrico.

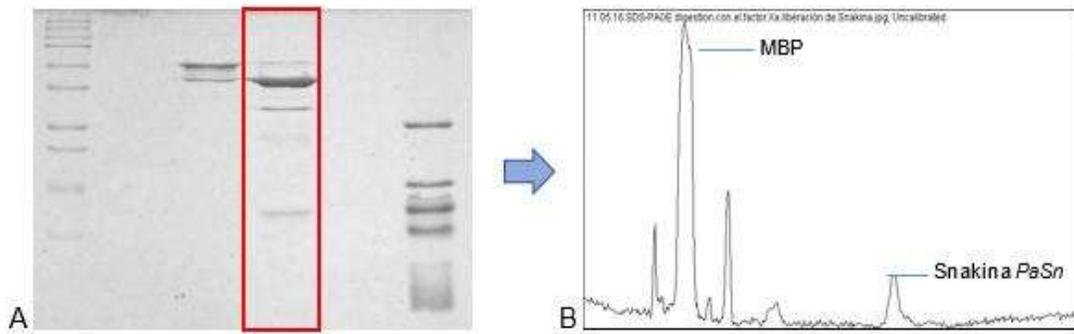


Figura 19. Cuantificación de las proteínas separadas con el programa **ImageJ** para realizar la cuantificación. **A)** SDS-PAGE en escala de grises, **B)** Gráfica del análisis sobre la densidad de bandas en el gel.

8. Capítulo 2. Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de la snakina PaSn de “aguacate nativo mexicano”

8.1. Introducción

Los péptidos antimicrobianos son una familia moléculas polifacéticas con complejos mecanismos de acción relacionados a la interacción con el patógeno a través de su membrana. Aunque la generación de resistencia a los péptidos antimicrobianos es mucho menor si se compara con la generada por los antibióticos convencionales, existen mecanismos de resistencia ya descritos, como la degradación de proteasas, la liberación de proteínas inhibitoras o los cambios en la conformación de la membrana del patógeno (Téllez y Castaño, 2010) . El estudio de estas moléculas ha permitido evidenciar sus usos potenciales en el ámbito agronómico, y mediante ensayos *in vitro* se ha buscado dilucidar su posible actividad antifúngica.

Los ensayos *in vitro* se realizan para evaluar la actividad o acción de un compuesto con la finalidad comprobar y proporcionar un pronóstico fiable de como un microorganismo responde a una terapia antimicrobiana o antifúngica en el hospedador infectado. Generalmente estos ensayos son reproducibles y de bajo costo, por ejemplo, los ensayos de difusión y ensayos de viabilidad con azul de tripano (Ramírez y Castaño, 2009; Louis y Siegel, 2011).

Los ensayos de difusión hacen referencia a la difusión de un compuesto a una cierta concentración a partir de discos u orificios realizados en un medio de cultivo sólido que ha sido sembrado con el aislado seleccionado. Este método se realiza para poder observar la acción de un compuesto contra el crecimiento micelial del patógeno, evaluando el halo de inhibición creado por la acción de dicho compuesto (Balouiri *et al.*, 2016).

Los ensayos de tinción con azul de tripano se utilizan como un indicio de perforaciones a nivel de membrana celular. El azul de tripano es capaz de filtrarse al interior de la célula. Si las células se tiñen completamente de azul indicaría que ocurrió una perforación en la membrana y si no existe tinción quiere decir que las células siguen viables y no hubo perforación.

En este trabajo se utilizaron dos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea* para realizar los ensayos *in vitro*.

8.2. Materiales y métodos

Para realizar los ensayos antifúngicos se utilizaron los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, cepa certificada donada por el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y *Botrytis cinerea*, donado por el D.C. Rafael Salgado Garciglia.

Ensayos de inhibición de crecimiento de micelio en caja de Petri

Se preparó 250 mL de medio sólido PDA para resembrar los hongos, se dejaron crecer por 72 h a 22° C en oscuridad total. Después de transcurrido este tiempo, con ayuda de una micro pipeta se colocaron los diferentes tratamientos cerca de la zona de crecimiento del hongo, que consistieron en distintas concentraciones de proteína (10, 50, 100, 150, 200 y 300 µg/mL), el fungicida Tecto₆₀ 1 mg/mL (control positivo) y buffer de resuspensión de la proteína (control negativo). Las cajas se incubaron a 22°C durante 48 h.

Ensayos de inhibición de germinación de esporas

Producción de esporas de *C. gloeosporioides*.- Se crecieron los hongos en cada Petri con medio PDA a 22° C durante 8 días, después se le agregó 5 mL de agua estéril y se dejó reposar durante 15 min. Posteriormente, transcurrido este tiempo, se utilizó un asa bacteriológica para raspar el cultivo y provocar la liberación de las esporas.

Ensayos de inhibición de germinación de esporas de *C. gloeosporioides*.

Azul de Tripano.

Se preparó una suspensión de esporas de 1×10^5 /mL. En tubos eppendor se 0.5 mL se colocó la concentraciones de esporas con distintas concentraciones del péptido. El ensayo se realizó por triplicado. Se incubaron los tubos a 22°C en completa oscuridad durante 48 h y los resultados se observaron a microscopio transcurrido el tiempo de incubación, colocando en un portaobjetos 15µL de muestra y 10µL de azul de tripano.

8.3 RESULTADOS

8.3.1 Efecto de Snakina sobre *C. gloeosporioides*

Se creció a *C. gloeosporioides* como se describe en materiales y métodos, y se colocaron distintas concentraciones de Snakina. En la figura 20 se muestran los resultados del experimento. En los ensayos se observa que a medida que aumenta la concentración de snakina *PaSn* (Figura 20 a) ocurre una mayor inhibición en cuanto al crecimiento micelial del hongo en comparación a la muestra control (letra b), donde el hongo presenta un crecimiento normal.

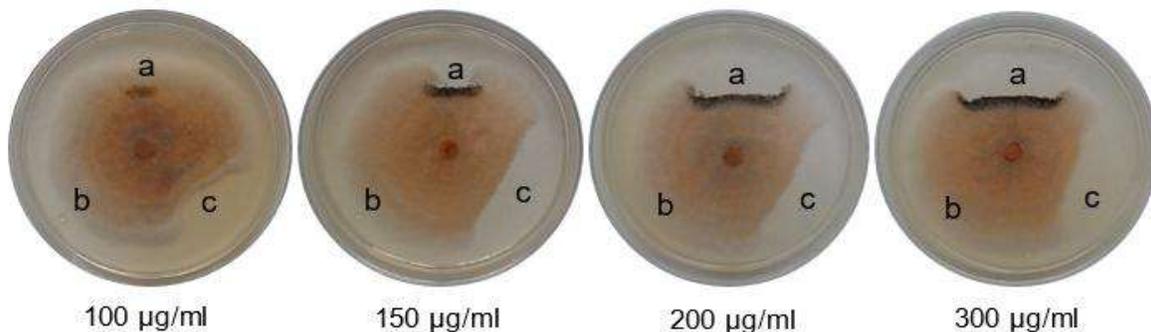


Figura 20. Ensayo de difusión en caja de Petri con *C. gloeosporioides*: a) Concentraciones de Snakina. b) Control negativo (buffer de resuspensión). c) Control positivo (Tecto₆₀ 1mg/mL). Las imágenes se tomaron tres días después del inicio del tratamiento.

Se realizó un acercamiento de las zonas con oscurecimiento en los ensayos de difusión con *C. gloeosporioides*. Se utilizó un microscopio óptico y se observaron las muestras a 10 y 40 X. Los resultados se muestran en la figura 21.

En las imágenes con oscurecimiento se observa un acortamiento, ramificación y deformación de las hifas del hongo, efecto que causa snakina *PaSn* al estar en contacto con el crecimiento del hongo, lo que sugiere que el péptido, aparte de estar

inhibiendo su crecimiento, también podría estar causado un efecto a nivel intracelular.

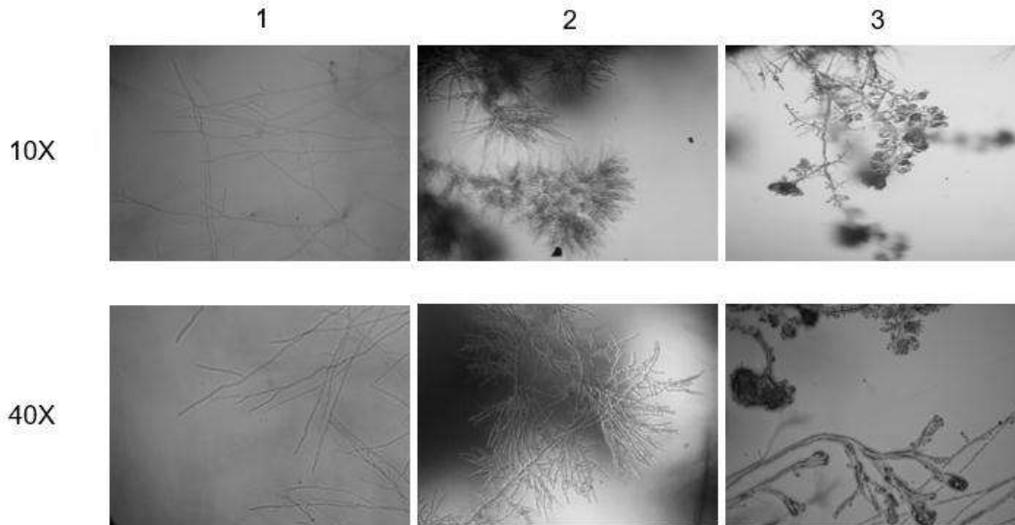


Figura 21. Acercamiento de las zonas oscurecidas de *C. gloeosporioides* en contacto con el péptido en los ensayos de difusión en placa. Imágenes tomadas desde microscopio óptico a 10 y 40 X, a los 3 días del inicio de ensayo. 1) control, 2 y 3) concentraciones de Snakina.

8.3.2 Efecto del péptido Snakina sobre *B. cinerea*

Se creció a *B. cinerea* como se describe en materiales y métodos. En el ensayo con *B. cinerea* se utilizaron las mismas concentraciones que el experimento anterior (figura 21). En la figura 22 se observan los resultados.

En los ensayos se muestra el efecto de snakina *PaSn* (Figura 22 a) sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*, a los dos días después del inicio del tratamiento. Conforme aumenta la concentración del péptido va en aumento la inhibición en cuanto al crecimiento micelial del hongo, efecto causado por el péptido, que se observa como un halo de inhibición en comparación a la muestra control (Figura 22 c).

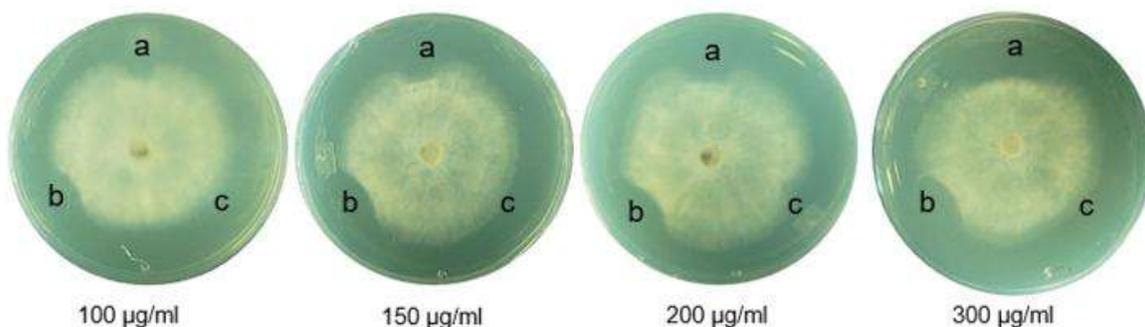


Figura 22. Ensayo de difusión en caja de Petri con *B. cinerea*: **a)** Concentraciones de Snakina. **b)** Control positivo (Tecto₆₀ 1mg/mL). **c)** Control negativo (buffer de resuspensión). Las imágenes se tomaron dos días después del inicio del tratamiento.

8.3.3 Ensayo control con el Factor Xa y *C. gloeosporioides*

Se realizó un experimento control para verificar que los efectos obtenidos en los ensayos de difusión en placas con los hongos no fuera causado por la proteasa que se utilizó para la separación de la proteína de fusión y el péptido. Se creció a *C. gloeosporioides* como se explica en materiales y métodos y se colocaron tres concentraciones distintas del Factor Xa (1, 0.5 y 0.2 mg/ml) (Figura 23).

En el ensayo no se observa algún efecto de inhibición de crecimiento micelial similar al obtenido en los ensayos anteriores (figura 20 y 22), explicando que el FXa no ejerce ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos y que el efecto es producido por snakina *PaSn*. Esto ya había sido confirmado por Wang *et al.* (2001), quienes utilizaron como control al FXa para confirmar que el efecto inhibitorio sobre el hongo *Valsa ambiens* no es producido por la proteasa. Con la misma intención, también utilizan la MBP como control confirmando que tampoco presenta actividad inhibitoria sobre el hongo.

Así se confirma que el efecto de inhibición en los ensayos de difusión en placa el producido por las distintas concentraciones de Snakina.

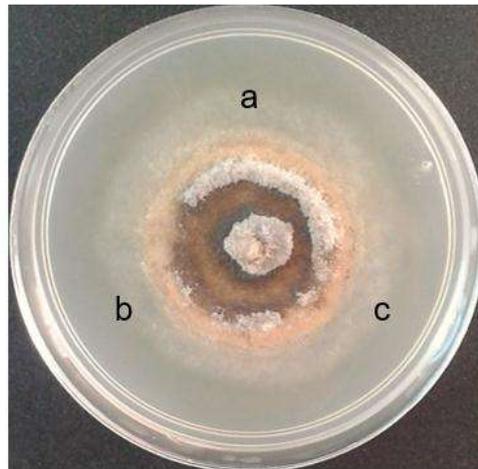


Figura 23. Ensayo control en caja Petri con *C. gloeosporioides* y el Factor Xa: a) 1 mg/mL, b) 0.5 mg/mL, c) 0.2 mg/mL. Tres días después del inicio del tratamiento.

8.3.4. Efecto de Snakina sobre la germinación de esporas de *C. gloeosporioides*

Debido a que se observó un mayor efecto de snakina *PaSn* sobre *C. gloeosporioides* y que el hongo aparentemente presentó respuesta de melanización ante el reconocimiento del péptido, se decidió realizar un ensayo con esporas de *C. gloeosporioides* con distintas concentraciones del péptido para evaluar si existía algún efecto en cuanto a la germinación de las esporas. El ensayo se realizó como se describe en materiales y métodos. Los resultados se muestran en la figura 24.

El incremento de la concentración de snakina *PaSn* tuvo un efecto inhibiendo el crecimiento y ramificación de las hifas. Estos resultados podrían reforzar lo que se observó en los ensayos de difusión en placa, sustentando la idea de que snakina

PaSn podría estar causado efectos intracelulares que provocan la deformación y acortamiento de las hifas.

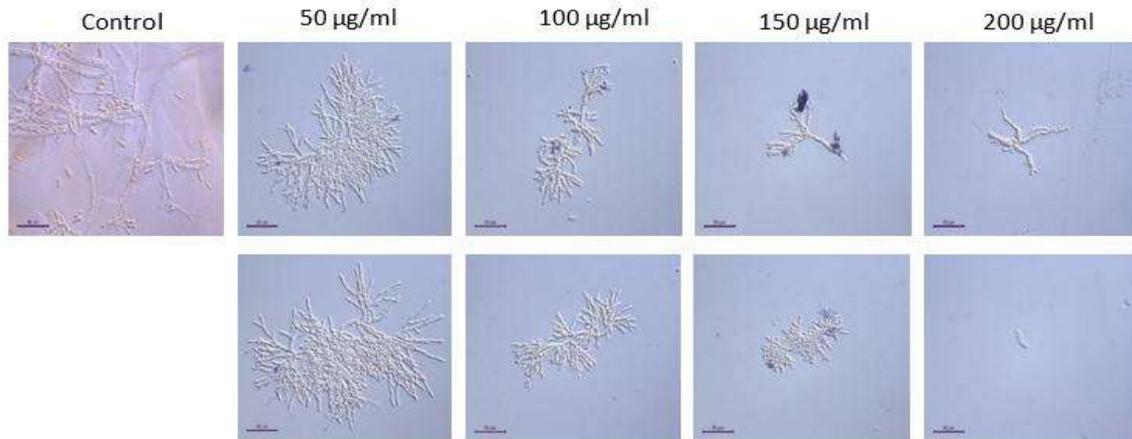


Figura 24. Efecto de snakina *PaSn* sobre la germinación de esporas de *C. gloeosporioides*. Los resultados de obtuvieron a las 48 h de incubación. Se utilizaron 50, 100, 150 y 200 µg/mL de Snakina. Fotos tomadas con microscopio Nomarski a 40X. Escala de 50 µm.

9. Discusión general

En el presente trabajo se realizó la producción de snakina *PaSn* de aguacate nativo mexicano, funcionalmente activo, utilizando un sistema de expresión procarionte y evaluando su actividad contra los hongos fitopatógenos *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*. Este péptido antimicrobiano es un miembro de la familia Snakina/GASA aislado de la semilla de aguacate que ha sido previamente evaluado contra bacterias patógenas de humanos (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013).

Los sistemas de expresión heteróloga han sido ampliamente utilizados para producción de péptidos antimicrobianos y específicamente los de origen procarionte, puesto que es posible obtener grandes cantidades de proteína recombinante (Skorupa, 2012). La expresión de *PaSn* se realizó en una cepa de *Escherichia coli*, utilizando el vector de expresión pMAL-c5x que produce una proteína de fusión llamada proteína de unión a maltosa (MBP) que se ligó al péptido. El péptido no resultó ser tóxico para *E. coli* debido a que la proteína de unión a maltosa inhibe la actividad de snakina *PaSn*.

Una vez que se obtuvo el vector de expresión pMAL-*PaSn*, la transformación de *E. coli* se llevó a cabo por electroporación y se utilizó un medio de selección con antibiótico para crecer las células. Las células no transformadas presentaron un 100% de mortalidad en presencia del medio con antibiótico (carbenicilina). La presencia de *PaSn* dentro de las células se confirmó realizando una reacción de PCR y una reacción de doble digestión al plásmido (pMAL-*PaSn*) utilizando ADN plasmídico de las células transformadas.

La proteína de fusión MBP-snakina *PaSn* resultó ser altamente soluble, dicha solubilidad fue favorecida por la proteína de fusión. El incremento de la solubilidad de MBP sobre proteínas pasajeras ya había sido reportado, incluso podría favorecer el plegamiento de la proteína (Kapust y Waugh, 1999). Se utilizó IPTG para inducir

la expresión de la proteína, puesto que el vector presenta un promotor inducible, Ptac.

La proteína de fusión se purificó mediante cromatografía de afinidad, donde la MBP presenta afinidad con la resina de amilosa de las columnas utilizadas para la purificación (MBPTap Hp), obteniendo concentraciones de 3 mg/mL de proteína de fusión, partiendo de un cultivo de 500 mL. De esos 3 mg/ml, 700 µg corresponden a snakina *PaSn*, entonces, por cada 5 ml de proteínas totales se obtiene aproximadamente 1 mg/ml de péptido purificado y en 1 L se estarían obteniendo 200 mg de proteína pura . Se obtuvieron buenos rendimiento de proteína recombinante, comparado con los obtenidos en reportes previos utilizando *E. coli* como organismo hospedero, donde purificaron snakina-2 de tomate (*Solanum lycopersicum*), con un rendimiento de 1 mg/L de cultivo (Herbel *et al.*, 2015); o la expresión de snakina-1 de papa (*Solanum tuberosum*), realizada en *Pichia pastoris*, donde obtuvieron un rendimiento de 40 mg/L de péptido purificado (Ruhul *et al.*, 2016).

La separación de la MBP y snakina *PaSn* se realizó con una reacción de digestión con el Factor Xa. Para la separación se recomienda utilizar la proteasa a una concentración de 200 µg/mL con 1 mg/mL de proteína (England BioLabs #Cat. N8108S). Para este ensayo se realizaron experimentos de prueba con 200, 500 y 1000 µg/mL del FXa, donde solo con la concentración más alta se consiguió la separación de ambas proteínas.

Puesto que no fue posible separar la MBP y snakina *PaSn*, se utilizó la mezcla de proteínas para realizar todos los ensayos antifúngicos. Herbel *et al.*, (2015) y Kovlaskaya y Hammond, (2009), de igual manera realizaron los experimentos antimicrobianos y antifúngicos con la mezcla de proteínas, TRX y His-tag respectivamente, reportando que a la proteína de fusión no se le relaciona con algún efecto antimicrobiano.

La actividad de snakina PaSn se demostró mediante ensayos *in vitro* contra *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*. El péptido presentó actividad contra estos hongos a una concentración de 150 µg/ml, inhibiendo el crecimiento micelial demostrado en ensayos de difusión en placa. La actividad contra hongos ya se había demostrado para snakinas aisladas de otros cultivos, como: papa (Kovalscaya y Hammond, 2009); alfalfa (García *et al.*, 2014); tomate (Herbel *et al.*, 2015), pero la actividad contra hongos no se había demostrado con Snakina de aguacate.

En los ensayos de snakina PaSn con *C. gloeosporioides* se observa un oscurecimiento en la zona de inhibición. Este tono color café oscuro del hongo podría ser una respuesta ante el reconocimiento de un agente externo, en este caso el péptido, induciendo la producción de melanina, que ocurre durante la formación de esporas. La melanización es un factor que está asociado a la supervivencia de las esporas, puesto que la melanina protege a las esporas de la luz UV. La producción de melanina también se relaciona con la virulencia de las esporas. Este mecanismo se ha descrito para hongos como *Alternaria alternata* y *Cochliobolus heterotrophus*. Para las especies de *Colletotrichum* la producción de melanina aparece cuando ocurre la formación de apresorios (Calvo *et al.*, 2002). Aún falta por dilucidar porque *C. gloeosporioides* esta melanizando en presencia del péptido, pero está claro que está ejerciendo efecto sobre el crecimiento micelial. Efecto que todavía no se ha reportado.

Cabe hacer mención que *C. gloeosporioides* no presenta este comportamiento en respuesta al fungicida Tecto₆₀ utilizado como control positivo, lo que sugiere un mecanismo de respuesta del hongo ante dos compuestos antifúngicos diferentes.

En los ensayos de difusión en placa de snakina PaSn con *B. cinerea*, también se observa una inhibición del crecimiento micelial, efecto producido por el péptido, pero no observó oscurecimiento del hongo al estar en contacto con snakina PaSn, esto podría ser porque *B. cinerea* presenta distintos mecanismo de respuesta ante el reconocimiento de un agente externo.

El Factor Xa no presentó actividad contra *C. gloeosporioides*, esto se confirmó con un ensayo de difusión (Figura 24), donde no se observa acortamiento del micelio ni oscurecimiento del hongo. La presencia de la actividad del FXa ya había sido probada con anterioridad (Wang *et al.*, 2001).

El péptido podría estar inhibiendo la germinación de esporas de *C. gloeosporioides*, donde se observa un acortamiento, ramificación y deformación de las hifas al estar en contacto con el péptido. Estos datos sugieren que snakina *PaSn* no solo podría estar interactuando con la membrana de las hifas, sino que, también podría estar causando un efecto a nivel intracelular provocando el rearrreglo del citoesqueleto o estar inhibiendo la síntesis de proteínas asociadas a la conformación de este organelo. El efecto en las hifas causado por el péptido (acortamiento, ramificación y deformación) también podría estar relacionado con la interacción del péptido con los canales de potasio (K^+), que son un grupo de proteínas relacionadas a la salida de K^+ de la célula, liberación de neurotransmisores, transporte de electrolitos y la regulación del volumen celular. La interacción con los canales de potasio ya ha sido reportado para defensinas (Almeida *et al.*, 2002); y esto podría explicar el comportamiento que presentan las hifas al estar en contacto con snakina *PaSn*, pero aún faltaría realizar experimentos para sustentar estas hipótesis.

Estos resultados aún no han sido reportados, donde se relacione el efecto de un péptido antimicrobiano con la deformación y acortamiento de las hifas y el oscurecimiento micelial de *C. gloeosporioides*. Por ello, es de gran importancia realizar más estudios sobre el mecanismo de acción de Snakina de aguacate y de otros péptidos antimicrobianos, puesto que aún se desconoce su posible mecanismo de acción contra microorganismos patógenos.

10. Conclusiones

Se logró expresar y purificar al péptido antimicrobiano snakina *PaSn* de aguacate “nativo mexicano” utilizando el sistema de expresión heterólogo de origen procarionte *E. coli*-pMAL.

El péptido purificado snakina *PaSn* presentó actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los hongos *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*.

El péptido snakina *PaSn* tuvo un efecto inhibitorio en la germinación de esporas de *C. gloeosporioides*.

11. Literatura citada

Almeida, M. S., Cabral, K. M., Kurtenbach S., Almeida F. C. L., and Valente A. P. (2002). Solutions structure of *Pisum sativum* defensin by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. *J. Mol. Biol.* 315: 749–757.

Baneyx F. (1999). Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology.* 10: 411 – 421.

Barbosa P., Perseghini del Sarto R., Nascimento S. O., Luiz F. O., y Grossi-de-Sa M. F. (2011). Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. *Biochem Res Int.*

Benito P. E., Arranz M. y Eslava P. Arturo. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinérea*. *Rev Iberoam Micol.* 17: 42-46.

Berrocal-Lobo M., Segura A., Moreno M., Lopez G., Garcia-Olmedo F. y Molina A. (2002). Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol.* 128 (3): 951–961.

Boman, H. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Internal Medicine.* 254 (3): 197-215.

Calvo M. A., Wilson A. R., Bok W. J. y Keller P. N. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 66 (3): 447-459.

Choi J. H. y Lee S. Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64(5): 624-635.

Cortés M. A., Hernández A., López R. y Salgado R. (2010). La búsqueda de genes de resistencia como una alternativa para la selección de portainjertos de aguacate con tolerancia a *Phytophthora cinnamomi*. *Biológicas,* 12(2): 143-150.

Demain A. L. y Vaishnav P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Advances.* 27(3): 297-306.

Everett K.R. y Pak H.A. (2002). Infection criteria for pathogens causing body roots in avocados. 2.

Garbanzo S. M. (2011). Manual de Aguacate: Buenas prácticas de cultivo variedad hass. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica.

García A., Ayub N., Fox A., Gomez M., Dieguez M. y Pagano E. (2014). Alfalfa snakina-1 prevents fungal colonization and probably coevolved with rhizobia. *BMC Plant Biol.* 14:248.

García-Olmedo, F., Rodríguez, P., Molina, A., Alamillo, J., López, E., Berrocal, M. y Poza, C. (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxydinitrite in plant defence. *FEBS Letters.* 498 (2-3): 219-222.

Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 43: 205-227.

Guzmán-Rodríguez, J.J., Ibarra-Laclette, E., Herrera-Estrella, L., Ochoa-Zarzosa, A., Suárez-Rodríguez, L.M., Rodríguez-Zapata, L.C., Salgado-Garciglia, R., Jiménez-Moraila, B., López-Meza, J.E. y López-Gómez, R. (2013). Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reveals abundant expression of the gene encoding the antimicrobial peptide snakina. *Plant Physiology and Biochemistry.* 70: 318-324.

Herbel V., Schäfer H. y Wink M. (2015). Recombinant production of Snakina-2 (an Antimicrobial Peptide from Tomato) in *E. coli* and analysis of its bioactivity. *Molecules.* 20 (8): 14889-148901.

Holz G., Coertze S. y Williamson B. (2007). The ecology of Botrytis on plant surfaces. *Springer.* 9-27.

Huang, H. (2000). Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry.* 39 (29): 8347-8352.

Huang L., Leong S.S. y Jiang R. (2009). Soluble fusion expression and characterization of bioactive human β -defensin 26 and 27. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (2): 301–308.

Kapust, R.B. y Waugh, D.S. (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 8 (8): 1668–1674.

Kovalskaya N. y Hammond R.W. (2009). Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snakina-1 and defensin recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* 63 (1): 12-17.

Lay F. and Anderson M. (2005). Defensins: Components of the innate immune system in plants. *Current Protein and Peptide Science. Current Protein and Peptide Science.* 6 (1): 85-101.

Louis S. K. y Siegel C. A. (2011). Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods, Chapter 2. Mammalian cell viability: methods and protocols. 17-12.

Makrides S. C. (1996). Strategies for Achieving High-level Expression of Genes in *Escherichia coli*. Microbiological Reviews. 60 (3): 512-538.

Mercado L., Schmitt P., Marshall S. y Arenas G. (2005). Gill tissues of the mussel *Mytilus edulis chilensis*: A new source for antimicrobial peptides. Electronic Journal of Biotechnology. 8 (3): 284-290.

Mus-Veteau I. (2002). Heterologous expression and purification systems for structural proteomics of mammalian membrane proteins. Comparative and Functional Genomics. 3: 511-517.

Murray R. y Liu C. (2008). Properties and applications of antimicrobial peptides in biodefense against biological warfare threat agents. Critical Reviews in Microbiology. 34 (2): 89-107.

Mounyr B., Sadiki M. y Koraichi I. S. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. J. Pharmaceutical Analysis. (6): 71-79.

Nahirñak V., Almasia I. N., Fernández V. P., Hopp E. H., Estevez M. J., Carrari F. y Vázquez-Rovere C. (2012). Potato snak-in-1 gene silencing affects cell division, primary metabolism, and cell Wall composition. Plant physiology. 158 (1): 252-263.

Nguyen L.T., Haney E.F. y Vogel H.J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends Biotechnol. 29: 464-472.

Ogata K., Linzer, B., Zuberi R., Ganz, T. y Catanzaro S. (1992). Activity of defensins of human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. Infection and Immunity. 60 (11): 4720-4725.

Osborn A. E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. The Plant Cell. 8 (10): 1821-1831.

Rai M. y Padh H., (2001). Expression systems for production of heterologous proteins. Research Gate. 80 (9).

Ramírez L. S. y Castaño M. D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia Et Technica. 42(15): 263-268.

Rivera A. L., Gómez-Lim M., Fernández F. y Loske A. M. (2014). Genetic Transformation of Cells using Physical Methods. J. Genetic Syndromes and Gene Therapy. 5: 237.

Rosano G. L. y Ceccarelli E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 5: 172.

Ruhul K. M., Rumi F., Tsutsumi M., Takahashi R., Yumano M., Kamiya M., Kikukawa T., Demura M. y Aizawa T. (2016). Expression, purification and characterization of the recombinant cysteine-rich antimicrobial peptide snakin-1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. 122: 15-22.

Peters B. M., Shirliff M. E. y Jabra-Rizk M. A. (2010). Antimicrobial peptides: Primeval molecules of future drugs?. *PLoS Pathogens*. 6 (10).

Powers J. P., Hancock R. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. 24 (11): 1681-1691.

Schweizer F. (2009). Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *European Journal of Pharmacology*. 625 (1-3): 190-194.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2011. Monografía de cultivos Aguacate. Subsecretaría de fomento a los agro-negocios.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2015. Boletín No. 034 México, productor número 1 del fruto en el mundo.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2007. Reportes Agrícolas de Aguacate. Volumen 27, Número 1, 2009.

Segura A, Moreno M., Madueno F., Molina A., Garcia-Olmedo F. (1999). Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact*. 12(1): 16–23.

Sels J., Mathys J., De Coninck B., Cammue B., De Bolle M., (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46 (11): 941-950.

Shai Y. (1995). Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends in Biochemical Sciences*. 20 (11): 460-465.

Sorensen H. and Mortensen K. (2005). Advanced Genetic Strategies for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 115: 113 – 128.

Tam P. J., Wang S., Wong H. K. y Liang T. W. (2015). Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*. 8: 711-757.

Téllez G. A. y Castaño J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*. 14 (1): 55-67.

Terpe K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to comercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 72: 211-222.

Thomma B., Cammue, B., and Thevissen K. (2002). Plant defensins. *Planta*. 216 (2): 193-202.

Van-Kan J. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci*. 11: 247–253.

Vidales J. A., Coria V. M., Anguiano J., Alcantar J. J. (2005). Control integrado de la antracnosis del aguacate. Instituto nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias (INIFAP).

12. Apéndice

Medio Luria-Bertani (LB)

Medio LB para cultivo de bacterias. Componentes (1L): Triptona 10g, NaCl 10 g, Extracto de levadura 5 g, Agar bacteriológico 15 g.

Medio Papa Dextrosa Agar (PDA)

Medio PDA para cultivo de hongos. 39 g/L.

Electroforesis en gel de agarosa

Se prepara el gel de agarosa al 1.2 % y se tiñe con bromuro de etidio. Se utiliza el buffer TBE al 0.5 X.

Purificación de bandas a partir de una electroforesis en gel de agarosa

Para purificar el DNA de *PaSn* se cortó el fragmento de PCR del gel y se utilizó el kit Zymoclean Gel Recovery Kit.

Preparación de células electrocompetentes (*E. coli* ER2523)

Se inocularon 500 ml de caldo LB con 1/100 de volumen de un cultivo fresco de toda la noche de *E. coli* ER2523. Se crecieron las células a 37 °C con agitación a 250 rpm hasta una D.O.₆₀₀ de 0.5- 0.7. El cultivo se colocó en hielo por 20 minutos. Para cosechar, el cultivo se transfirió en tubos de centrifuga (previamente enfriados) y se centrifugo a 5,000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se desecha el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 500 ml de glicerol 10% frio y centrifugar a 5,000 rpm por 5 minutos a -4 °C. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 250 ml de glicerol al 10% frio, se volvió a centrifugar a 5, 000 rpm por 5 minutos a -4 °C. Se descartó el sobrenadante. Se volvió a resuspender la pastilla en 200 ml aproximadamente de glicerol al 10% frio. Se centrifugo a 5,000 rpm por 5 minutos a -4 °C y se descartó el sobrenadante. La pastilla celular se volvió a resuspender en un volumen final de 1-2 mL de glicerol al 10% frio. Esta suspensión se congelo en alícuotas de 150 µL y se almacenaron a -70 °C.

Electroforesis en SDS-PAGE

Se preparó un gel de acrilamida al 10%. Para hacer el gel de separación, se mezcló 0.8 ml de H₂O, 0.8 mL de Tris-HCl pH 8.8 y 1.6 mL de acrilamida T 30% C 0.8% (30% de acrilamida y 0.8% de bisacriladmida), se homogenizo perfectamente la mezcla y posteriormente se le adicionaron 33.3 µl de SDS al 10%, 16.6 µL de PSA (Persulfato de amonio 10%) y 3.3µL de TEMED y se mezclan perfectamente. Al momento en que el PSA y el TEMED son agregados es necesario homogenizar y cargar lo más rápido posible, puesto que se corre el riesgo de que la mezcla se polimerice antes de formar el gel. Para preparar el gel de staking se mezclan 0.8 mL de H₂O, 0.39 mL de Tris-HCl pH 6.8, 0.26 de acrilamida T 30% C 0.8%, se homogeniza la mezcla y después de agregan 15.6 µL de SDS al 10%, 11.7 µL de PSA y 1.5 µL de TEMED. Se homogeniza bien la mezcla y se repiten los pasos del procedimiento anterior.

Buffer de columna

20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4.

Buffer de resuspensión

20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4.

Buffer de muestra

10 mM Beta-mercapto-etanol, 10% Glicerol, 0.05% Azul de bromofenol, 0.2 M Tris-HCl pH 6.8.