



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Estudio de defensinas de flores de cardos con potencial
aplicación biotecnológica***

Tesista: Lic. Agustina Fernández

Directora: Dra. Sandra Vairo Cavalli

Codirectora: Dra. Laura Bakás

Año: 2022



**ESTUDIO DE DEFENSINAS DE
FLORES DE CARDOS CON
POTENCIAL APLICACIÓN
BIOTECNOLÓGICA**

Agustina Fernández

**Directora: Dra. Sandra E. Vairo Cavalli
Codirectora: Dra. Laura S. Bakás
Julio 2022**

Estudio de defensinas de flores de cardos con potencial aplicación biotecnológica



El presente trabajo, para optar por el grado de Doctora en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue desarrollado en el Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIPROVE), bajo la dirección de la Dra. Sandra Vairo Cavalli y la codirección de la Dra. Laura Bakás.

“-Lo adquirí en un pueblo de la llanura, a cambio de unas rupias y de la Biblia. Su poseedor no sabía leer. Sospecho que en el Libro de los Libros vio un amuleto. Era de la casta más baja; la gente no podía pisar su sombra, sin contaminación. Me dijo que su libro se llamaba el Libro de Arena, porque ni el libro ni la arena tienen ni principio ni fin. Me pidió que buscara la primera hoja.

Apoyé la mano izquierda sobre la portada y abrí con el dedo pulgar casi pegado al índice. Todo fue inútil: siempre se interponían varias hojas entre la portada y la mano. Era como si brotaran del libro.

-Ahora busque el final.

También fracasé; apenas logré balbucear con una voz que no era la mía:

-Esto no puede ser.

Siempre en voz baja el vendedor de biblias me dijo:

-No puede ser, pero es. El número de páginas de este libro es exactamente infinito. Ninguna es la primera; ninguna la última. No sé por qué están numeradas de ese modo arbitrario. Acaso para dar a entender que los términos de una serie infinita admiten cualquier número.

Después, como si pensara en voz alta:

-Si el espacio es infinito estamos en cualquier punto del espacio. Si el tiempo es infinito estamos en cualquier punto del tiempo.”

Fragmento del cuento “El libro de arena”
(El libro de arena, Jorge Luis Borges, 1975)

Agradecimientos

El presente trabajo de tesis, que por momentos pareció ser infinito como “El libro de arena”, representó para mí un enorme aprendizaje y un camino de crecimiento tanto profesional como personal. Quiero, entonces, expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que directa o indirectamente me ayudaron a completar este trabajo...

En primer lugar, quiero agradecer a los organismos que hicieron posible que desarrolle el presente trabajo de investigación: a la Universidad Nacional de La Plata, y a la Facultad de Ciencias Exactas en particular, por la formación pública, gratuita y de calidad; y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca para la realización del presente trabajo de tesis.

A mi directora, la Dra. Sandra Vairo Cavalli, por el gran compromiso asumido y el esfuerzo realizado en guiarme y aconsejarme durante todos estos años compartidos, no sólo en lo referido al ámbito científico sino también en el personal; por su apoyo incondicional, dedicación, paciencia infinita y la tranquilidad que siempre me transmitió, aun en los momentos más difíciles.

A mi codirectora, la Dra. Laura Bakas, por su valiosa ayuda y excelente predisposición, por su tiempo, tolerancia y sus enseñanzas.

Al Dr. Néstor O. Caffini, “el Profe”, por abrirme las puertas del CIPROVE, donde realicé este trabajo, por su amabilidad y por haber hecho del laboratorio un hogar, por su admirable pasión por la investigación y la enseñanza, que siempre nos transmitió.

A todos los laboratorios y grupos de trabajo que colaboraron con nuestro trabajo y nos permitieron enriquecerlo:

- Al Dr. Ismael Malbrán del Centro de Investigaciones en Fitopatologías (CIDEFI-UNLP), por su ayuda con los ensayos realizados con *F. graminearum* en el presente trabajo y sus aportes y asistencia constante.
- A las Dras. Romina Vazquez y Sabina Maté del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata "Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner" (INIBIOLP), por su ayuda en los ensayos con monocapas.
- A la Dra. Fanny Guzman, quien me abrió muy amablemente las puertas de su laboratorio, la Unidad de Síntesis de Péptidos del Núcleo de Biotecnología Curauma (UNCPV-Chile). Por su tiempo, dedicación e invaluable ayuda.

- A las Dras. Lucrecia Curto, Gabriela Gómez del Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB-UBA), por su colaboración con los espectros de dicroísmo circular de los péptidos y al Dr. José María Delfino por su valioso aporte en la discusión de algunos de los resultados aquí presentados.

A mis compañeros/as de laboratorio, con quienes tuve el placer de compartir el trabajo de estos años y de quienes he aprendido enormemente además de haber disfrutado hermosos momentos. Un agradecimiento especial a Lau y a Costi por la ayuda en el trabajo experimental, por sus enseñanzas cuando recién comenzaba este camino.

A mi familia y amigos/as, por su apoyo incondicional. A los que están y los que estuvieron, que siempre estarán presentes en mí.

A continuación, se detallan los trabajos científicos elaborados a partir de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral:

Publicaciones en revistas científicas

- FERNÁNDEZ A., COLOMBO ML., CURTO L.M., GÓMEZ G.E., DELFINO J.M., GUZMÁN QUIMBAYO F., BAKÁS L., MALBRÁN I., VAIRO-CAVALLI, S.E. "Peptides derived from the α - and γ -core regions of a putative *Silybum marianum* flower defensin show antifungal activity against *Fusarium graminearum*". *Frontiers in Microbiology*. 2021. ISSN: 1664-302X. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.632008>.

- FERNÁNDEZ A., GONZÁLEZ M., MALBRÁN I., VAZQUEZ R., MATÉ S., GUZMÁN QUIMBAYO F., BAKÁS L., VAIRO-CAVALLI S.E. "Peptides derived from the α -core of a *Silybum marianum* defensin induced membrane permeabilization, oxidative stress and cell death in *Fusarium graminearum* conidia" (En redacción).

Comunicaciones a congresos y eventos internacionales

- FERNÁNDEZ, A. GONZÁLEZ, M., MALBRÁN, I., MATÉ, S., VAZQUEZ, R., GUZMÁN, F., BAKÁS, L. VAIRO CAVALLI, S. "Peptides derived from the alpha-core of a *Silybum marianum* defensin induced membrane permeabilization, oxidative stress and cell death in *Fusarium graminearum* conidia". XLIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. 1 al 3 de diciembre de 2021. Modalidad: minipresentación.

- FERNÁNDEZ, A. GONZÁLEZ, M., MALBRÁN, I., GUZMÁN, F., BAKÁS, L. VAIRO CAVALLI, S. "Estudio de péptidos derivados del alfa-core de la defensina DefSm2D de flores de *Silybum marianum* sobre conidios del hongo fitopatógeno *Fusarium graminearum*" en el 4to Workshop "Péptidos terapéuticos para Bio-aplicaciones", organizado por el Laboratorio de Síntesis de Péptidos del Núcleo de Biotecnología Curauma de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. 17, 18 y 19 de noviembre del 2021. Modalidad: presentación oral.

- FERNANDEZ A., MALBRÁN I., GUZMÁN F., BAKÁS L., VAIRO-CAVALLI S. "Estudio de péptidos derivados de motivos estructurales de la defensina DefSm2-D de flores de *Silybum marianum*

con acción sobre *Fusarium graminearum*: permeabilización de la membrana de conidios y efecto sobre su ultraestructura celular". III Workshop de Péptidos terapéuticos para bioaplicaciones, 17 y 18 de octubre de 2019, Valparaíso, Chile. Modalidad: póster.

- FERNANDEZ, A., MALBRÁN, I., VÁZQUEZ, R., MATÉ, S., GUZMÁN, F., CURTO, L., BAKÁS, L., VAIRO CAVALLI, S. *Design, synthesis and characterization of antifungal peptides derived from the sequence of two thistle flowers defensins*. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica, La Plata, diciembre de 2018. Modalidad: póster.

- FERNANDEZ, A., COLOMBO, ML., GUZMÁN, F., BAKÁS, L., MALBRÁN, I., VAIRO CAVALLI, S. *Mapping and identification of antifungal peptides in putative defensins of flowers of the thistle *Silybum marianum**. XXXII Reunión Argentina, XVI Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal, Córdoba, noviembre de 2018. Modalidad: póster.

- FERNANDEZ, A., MALBRÁN, I., VAIRO CAVALLI, S. *Diseño de péptidos antifúngicos a partir de dos defensinas de flores de cardo. Síntesis y actividad contra *Fusarium graminearum**. XXVI Jornada de Jóvenes Investigadores, Asociación de Universidades Grupo Montevideo, Mendoza, octubre de 2018. Modalidad: exposición oral.

- FERNANDEZ, A., COLOMBO, ML., LIGGIERI, C., BAKÁS, L., VAIRO CAVALLI, S. *Bioinformatic analyses of two defensin-like proteins from *Silybum marianum* flowers*. Reunión Conjunta de Sociedades de BioCiencias LIII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Palais Rouge, Buenos Aires, noviembre de 2017. Modalidad: póster.

- FERNANDEZ, A., COLOMBO, ML., LIGGIERI, C., BAKÁS, L., VAIRO CAVALLI, S. *Gene organization and bioinformatic analyses of DefSm1D, a defensin-like protein domain from flowers of *Silybum marianum**. III Latin American Federation of Biophysical Societies (LAFEBS) - IX IberoAmerican Congress of Biophysics - XLV SAB Annual Meeting, noviembre 2016, Tucumán, Argentina. Modalidad: poster.

Índice de contenidos

Abreviaturas	1
Capítulo I: Introducción	3
1.1 Inmunidad innata en plantas	4
1.2 Péptidos antimicrobianos	9
1.2.1 Mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos.....	11
1.3 Defensinas vegetales	13
1.3.1 Características generales	14
1.3.2 Clasificación	17
1.3.4 Mecanismos de acción	20
1.3.5 Aplicaciones biotecnológicas	21
1.4 Enfermedades fúngicas de plantas	23
1.4.1 <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe (telemorfo <i>Gibberella zeae</i>).....	24
1.4.1.1 Epidemiología de la FE	26
1.4.1.2 Impacto de la FE en la Argentina.....	28
1.5 Tecnologías de producción de péptidos	29
1.5.1 Generalidades	29
1.5.2 Síntesis de péptidos	30
1.5.3 Síntesis química de péptidos.....	31
1.5.3.1 Síntesis química de péptidos en fase sólida (SPFS)	32
1.5.4 Diseño racional de péptidos antimicrobianos.....	34
Capítulo II: Objetivos e hipótesis	37
2.1 Objetivos	37
2.1.1 Objetivos generales.....	37
2.1.2 Objetivos específicos.....	37
2.2 Hipótesis	37

3.1 Materiales	40
3.1.1 Material biológico	40
3.1.2 Medios de cultivo.....	41
3.1.3 Soluciones buffers.....	41
3.1.4 Soluciones de antibiótico	42
3.1.5 Vectores plasmídicos	42
3.1.6 Cebadores	44
3.1.7 Enzimas recombinantes	44
3.1.8 Reactivos empleados para la síntesis peptídica	45
3.1.9 Herramientas bioinformáticas	46
3.1.9.1 Herramientas generales.....	46
3.1.9.2 Herramientas empleadas para el modelado molecular por homología de las defensinas de <i>S. marianum</i>	47
3.1.9.3 Herramientas empleadas para el análisis filogenético.....	48
3.1.9.4 Herramientas empleadas para el diseño y caracterización de péptidos.....	48
3.2 Metodologías	49
3.2.1 Clonación de defensinas de flores de <i>Silybum marianum</i>	49
3.2.1.1 Extracción de ARN total de flores	49
3.2.1.2 Determinación de la concentración y pureza del ARN total	49
3.2.1.3 Síntesis de ADN complementario	50
3.2.1.4 Amplificación por PCR.....	51
3.2.1.5 Ligación.....	52
3.2.1.6 Digestión enzimática de ADN.....	53
3.2.1.7 Crecimiento y mantenimiento de cepas bacterianas.....	54
3.2.1.8 Obtención de células competentes químicas	54
3.2.1.8.1 Método de cloruro de calcio	54
3.2.1.8.2 Método de cloruro de rubidio.....	55

3.2.1.9 Transformación por shock térmico.....	55
3.2.1.10 Electroforesis en gel de agarosa	56
3.2.1.11 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	56
3.2.1.12 Purificación de ADN plasmídico	57
3.2.1.12.1 Método de lisis alcalina con unión a sílica	57
3.2.1.12.2 Kit comercial.....	57
3.2.1.13 Secuenciación y análisis de datos	58
3.2.2 Estudio bioinformático.....	58
3.2.2.1 Modelado molecular por homología de los dominios defensina.....	58
3.2.2.1.1 Evaluación y validación de los modelos obtenidos	59
3.2.2.2 Predicción funcional.....	60
3.2.2.3 Cálculo del potencial de superficie electrostático	61
3.2.2.4 Análisis filogenético	61
3.2.2.5 Diseño de péptidos potencialmente antifúngicos a partir de las secuencias de las defensinas de <i>S. marianum</i>	62
3.2.2.6 Diseño de péptidos modificados.....	62
3.2.3 Síntesis química en fase sólida, purificación, caracterización y actividad biológica de péptidos derivados de las secuencias de las defensinas clonadas	63
3.2.3.1 Síntesis automática de péptidos en fase sólida F-moc	63
3.2.3.2 Síntesis de péptidos cíclicos por formación de puentes disulfuro intramolecular	64
3.2.3.3 Purificación de los péptidos.....	65
3.2.3.3.1 Cromatografía en fase reversa C18.....	65
3.2.3.3.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (HPLC-FR)	65
3.2.3.4 Espectrometría de masas (ESI-MS)	66
3.2.3.5 Dicroísmo Circular.....	66
3.2.3.6 Derivatización de péptidos con sondas fluorescentes	66
3.2.3.7 Ensayos biológicos in vitro de los péptidos sintetizados.....	67

3.2.3.7.1 Preparación de stock de péptidos	67
3.2.3.7.2 Preparación de las suspensiones de conidios de <i>Fusarium graminearum</i> ..	67
3.2.3.7.3 Preparación de la suspensión de <i>Candida albicans</i>	68
3.2.3.7.4 Ensayos de inhibición de crecimiento de <i>Fusarium graminearum</i>	68
3.2.3.7.5 Ensayos de inhibición de crecimiento de <i>Candida albicans</i>	68
3.2.3.7.6 Evaluación de la integridad de membrana por microscopía óptica de fluorescencia	69
3.2.3.7.7 Tiempo de muerte-time to kill	69
3.2.3.7.8 Evaluación de la producción de estrés oxidativo a través de la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS)	70
3.2.3.7.8.1 Medición fluorimétrica con lector de placas	70
3.2.3.7.8.2 Microscopía Láser Confocal	71
3.2.3.7.9 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	71
3.2.3.7.10 Estudio de la inserción de los péptidos en monocapas lipídicas.....	72
3.2.3.7.11 Localización subcelular de los péptidos modificados.....	72

Capítulo IV: Resultados 77

4.1 Clonación de dos defensinas a partir de flores de <i>Silybum marianum</i>	75
4.1.1 Material vegetal utilizado como fuente de defensinas	75
4.1.2 Clonación de defensinas a partir de inflorescencias de <i>Silybum marianum</i>	76
4.1.3 Búsqueda y análisis de los genes que codifican para las defensinas clonadas	80
4.2 Análisis bioinformático de DefSm1 y DefSm2	84
4.2.1 Análisis de la estructura primaria.....	84
4.2.2 Predicción y análisis de la estructura secundaria.....	86
4.2.3 Predicción y análisis de la estructura terciaria	87
4.2.4 Evaluación y validación de los modelos	89
4.2.5 Predicción funcional.....	93
4.2.6 Análisis filogenético	94

4.3 Estudio de péptidos de síntesis química derivados de las secuencias DefSm1D y DefSm2D	95
4.3.1 Diseño de péptidos a partir de la secuencia de defensinas de flores de <i>S. marianum</i>	95
4.3.2 Diseño de péptidos modificados	100
4.3.3 Síntesis química en fase sólida, purificación y caracterización de los péptidos	103
4.3.4 Screening de la actividad antifúngica de los péptidos sintetizados sobre <i>Fusarium graminearum</i> y la levadura <i>Candida albicans</i>	106
4.3.5 Efecto de los péptidos sintéticos sobre <i>Fusarium graminearum</i>	107
4.3.5.1 Concentración inhibitoria mínima	107
4.3.5.2 Tiempo de muerte- <i>time to kill</i>	108
4.3.5.3 Aproximación al mecanismo de acción de los péptidos derivados de DefSm2D	110
4.3.5.3.1 Permeabilización de membrana	110
4.3.5.3.2 Inducción de estrés oxidativo	113
4.3.5.3.3 Estudio de la inserción de los péptidos en monocapas lipídicas	115
4.3.5.3.4 Efecto sobre la ultraestructura de conidios	117
4.3.5.3.5 Localización subcelular del péptido SmAP2 _{α1-21} derivado del α-core	117
4.3.5.3.6 Relevancia de la His 19 y evaluación de la ciclación en el péptido derivado del α-core	120
Capítulo V: Discusión & Conclusiones	136
Anexo	154
Bibliografía	160

Índice de Figuras

FIGURA 1 Componentes de los mecanismos de resistencia de las plantas frente a patógenos involucrados en la (1) detección, (2) transducción de señales y (3) respuesta de defensa.....	7
FIGURA 2 Árbol filogenético no enraizado de las distintas familias de péptidos antimicrobianos de plantas.....	10
FIGURA 3 Mecanismos de acción de los AMPs frente a patógenos microbianos.....	12
FIGURA 4 Representación esquemática de una <i>cis</i> -defensina.....	13
FIGURA 5 Alineamiento de la secuencia aminoacídica de defensinas maduras de distintas plantas.....	15
FIGURA 6 Características de la estructura primaria, secundaria y terciaria de las defensinas vegetales.....	16
FIGURA 7 Clasificación de defensinas vegetales en 18 grupos.....	18
FIGURA 8 Dos clases de defensinas vegetales.....	19
FIGURA 9 Características morfológicas de <i>F. graminearum</i> Schawbe.....	25
FIGURA 10 Ciclo de vida de <i>F. graminearum</i> , agente causal de la Fusariosis de la espiga en trigo.....	27
FIGURA 11 Representación esquemática de la síntesis de péptidos en fase sólida.....	34
FIGURA 12 Mapa del vector pGEMT-Easy.....	44
FIGURA 13 Mapa del vector pTZ57R/T.....	44
FIGURA 14 Sintetizador automático de péptidos por microondas.....	67
FIGURA 15 Formación de un puente disulfuro intramolecular entre dos cisteínas de un péptido hipotético de 8 residuos aminoacídicos.....	67
FIGURA 16 <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.....	79
FIGURA 17 Alineamientos múltiples de secuencias N-terminal de defensinas vegetales.....	80
FIGURA 18 Análisis de la extracción de ARN total por electroforesis en gel de agarosa (1%).....	81
FIGURA 19 Amplificación de las secuencias correspondiente al marco de lectura abierto de las defensinas de flores de <i>S. marianum</i>	82
FIGURA 20 ADNc que codifica para las proteínas tipo defensina y sus respectivas secuencias aminoacídicas.....	84
FIGURA 21 Organización del gen que codifica para DefSm1.....	86
FIGURA 22 Organización del gen que codifica para DefSm2.....	87
FIGURA 23 Alineamiento múltiple de secuencia entre los dominios defensina correspondientes a DefSm1D y DefSm2D y defensinas relacionadas según los resultados del análisis con el servidor BLAST.....	89

FIGURA 24 Logotipo correspondiente al perfil HMM de la familia PF00304.....	90
FIGURA 25 Predicción de la estructura secundaria de las defensinas DefSm1D y DefSm2D.....	91
FIGURA 26 Modelo estructural de las defensinas de <i>S. marianum</i> estudiadas.....	92
FIGURA 27 Potencial de superficie electrostática de los modelos tridimensionales de las defensinas visualizados con PyMOL.....	94
FIGURA 28 Evaluación estructural del modelo: diagrama de Ramachandran.....	95
FIGURA 29 Evaluación energética de los modelos obtenidos.....	96
FIGURA 30 Análisis filogenético de defensinas vegetales de distintas familias.....	98
FIGURA 31 Detalle del árbol filogenético realizado.....	99
FIGURA 32 Análisis y diseño de péptidos potencialmente antimicrobianos.....	100
FIGURA 33 Secuencia aminoacídica, predicción de la estructura secundaria de las defensinas DefSm1D y DefSm2D.....	101
FIGURA 34 Propiedades de los péptidos diseñados en base al motivo α -core de las defensinas de <i>S. marianum</i>	102
FIGURA 35 Propiedades de los péptidos diseñados en base al motivo γ -core de las defensinas de <i>S. marianum</i>	103
FIGURA 36 Gráficos de carga neta (z) en función del pH de los péptidos diseñados.....	105
FIGURA 37 Propiedades de las variantes diseñadas en base a los péptidos derivados del α -core de DefSm2D.....	106
FIGURA 38 Espectroscopía de dicroísmo circular de los péptidos derivados de la defensina DefSm2D.....	108
FIGURA 39 Espectroscopía de dicroísmo circular de los péptidos con modificaciones, derivados de la defensina DefSm2D.....	109
FIGURA 40 Actividad de los péptidos derivados de DefSm1D sobre la cinética de crecimiento de <i>F. graminearum</i>	111
FIGURA 41 Actividad de los péptidos derivados de DefSm2D sobre la cinética de crecimiento <i>F. graminearum</i>	112
FIGURA 42 Determinación de la CIM de los péptidos derivados de DefSm2D.....	113
FIGURA 43 Crecimiento de <i>F. graminearum</i> en placas de APG incubadas durante 72 h a 25 °C en presencia de los péptidos SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ y SmAP2 $_{\gamma 27-44}$	115
FIGURA 44 Imágenes de campo claro y fluorescencia de conidios de <i>F. graminearum</i> incubados con los péptidos derivados de DefSm2D a su CIM durante 1 h y con el fluoróforo yoduro de propidio.....	116

FIGURA 45 Producción de ROS inducida en conidios de <i>F. graminearum</i> por los péptidos SmAP2 _{α1-21} y SmAP2 _{γ27-44}	117
FIGURA 46 Producción de ROS detectada con la sonda H ₂ DCFDA sobre conidios tratados con los péptidos, H ₂ O ₂ o agua.....	118
FIGURA 47 Cinéticas de inserción de SmAP2 _{α1-21} y SmAP2 _{γ27-44} en una monocapa lipídica compuesta por POPC/Ergosterol en una relación molar 3:1.....	119
FIGURA 48 Cambios en la presión superficial (ΔP) vs. ΠI0 luego de 10 min de interacción de SmAP2 _{α1-21} y SmAP2 _{γ27-44} con una monocapa lipídica POPC/ERG (3:1).....	120
FIGURA 49 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de conidios de <i>F. graminearum</i> incubados con péptidos SmAP2 _{α1-21} y SmAP2 _{γ27-44} a su CIM durante 1 h.....	122
FIGURA 50 Peroxisomas en conidios de <i>F. graminearum</i> tratados con los péptidos SmAP2 _{α1-21} y SmAP2 _{γ27-44}	123
FIGURA 51 Localización subcelular del péptido SmAP2 _{α1-21} en conidios de <i>F. graminearum</i> tratados durante distintos tiempos de incubación a la CIM.....	124
FIGURA 52 Determinación de la CIM de los péptidos modificados derivados de SmAP2 _{α1-21}	126
FIGURA 53 Crecimiento de <i>F. graminearum</i> en placas APG incubadas durante 72 h a 25 °C en presencia de los péptidos SmAP2H19R, SmAP2H19R y cSmAP2C14S.....	127
FIGURA 54 Imágenes de campo claro (abajo) y fluorescencia (arriba) de conidios de <i>F. graminearum</i> incubados con los péptidos con modificaciones derivados de DefSm2D a su CIM durante 1 h.....	128
FIGURA 55 Imágenes de campo claro y fluorescencia de conidios de <i>F. graminearum</i> incubados 60 y 90 minutos con el péptido SmAP2H19A.....	129
FIGURA 56 Producción de ROS inducida en conidios de <i>F. graminearum</i> por los péptidos SmAP2H19R, SmAP2H19A y cSmAP2C14S.....	130
FIGURA 57 Producción de ROS detectada con la sonda H ₂ DCFDA sobre conidios tratados con los péptidos modificados derivados del α-core, H ₂ O ₂ o agua.....	131
FIGURA 58 Cinéticas de inserción de los péptidos con modificaciones derivados de SmAP2 _{α1-21} , SmAP2H19R, SmAP2H19A y cSmAP2C14S en una monocapa lipídica compuesta por POPC/Ergosterol en una relación molar 3:1.....	132
FIGURA 59 Cambios en la presión superficial (ΔP) vs. ΠI0 luego de 10 min de interacción de SmAP2H19R, SmAP2H19A y cSmAP2C14S con una monocapa lipídica POPC/ERG (3:1).....	132
FIGURA 60 Localización subcelular del péptido SmAP2H19R en conidios de <i>F. graminearum</i> tratados durante 2 h a la CIM.....	134

FIGURA 61 | Localización subcelular del péptido SmAP2H19A en conidios de *F. graminearum* tratados durante 2 h a la CIM.....135

Índice de Tablas

TABLA 1 Cepas empleadas en el trabajo experimental.....	41
TABLA 2 Medios de cultivos utilizados en el trabajo experimental.....	42
TABLA 3 Soluciones buffer empleadas en el trabajo experimental.....	42
TABLA 4 Soluciones de antibiótico empleadas.....	43
TABLA 5 Secuencias de los oligonucleótidos utilizados.....	45
TABLA 6 Reactivos empleados en la síntesis peptídica.....	46
TABLA 7 Composición de la mezcla de reacción de la RT.....	51
TABLA 8 Composición de la mezcla de reacción de la PCR para la amplificación de las secuencias codificantes de defensinas a partir de ADNc.....	52
TABLA 9 Programa de termociclado para la amplificación de ADN por PCR.....	53
TABLA 10 Composición de la mezcla de reacción de ligación.....	54
TABLA 11 Composición de la mezcla de reacción utilizada en la digestión de ADN plasmídico empleando enzimas de restricción.....	54
TABLA 12 Porcentaje de agarosa recomendado según los tamaños a separar.....	57
TABLA 13 Términos GO con mayor <i>score</i> para DefSm1D y DefSm2D del análisis con ProFunc.....	97
TABLA 14 Péptidos diseñados empleando como plantilla el péptido SmAP2 _{α1-21}	104
TABLA 15 Principales características de los péptidos sintetizados.....	107
TABLA 16 Efecto inhibitorio de los péptidos modificados sobre el crecimiento de <i>F. graminearum</i> expresados en función de la concentración inhibitoria mínima (CIM).....	125
TABLA 17 Aumento total de presión generada luego de la inserción de los péptidos en monocapas de POPC/Erg (3:1) a una presión inicial de 30 mN/m.....	133



Abreviaturas

15-ADON: 15-acetil- deoxinivalenol
3-ADON: 3-acetil- deoxinivalenol
4MP: 4-metilpiperidina
ABA: Ácido abscísico
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
AMPs: péptidos antimicrobianos
ARN: ácido ribonucleico
Bzl: bencilo
CIM: concentración inhibitoria mínima
CMC: carboximetilcelulosa
CPD: caldo de papa dextrosa
CPPs: *cell penetrating peptides*
DAMPs: patrones moleculares asociados a daños
DIC: N,N'-diisopropilcarbodiimida
DIEA: N,N'-diisopropiletilamina
DMF: N, N-dimetilformamida
dNTPs: dinucleotidotrifosfato
DON: deoxinivalenol
DOT: 2,2- (etilendioxi) dietanetiol
EDTA: ácido etilendiamintetraacético
ETI: inmunidad activada por efectores
Fmoc: 9-fluorenil metoxicarbonilo
HRGPs: glicoproteínas ricas en hidroxiprolina
HPLC-FR: cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
IP: ioduro de propidio
JA: ácido jasmónico
LAR: resistencia local adquirida
NIV: 3-nivalenol
NLR: repeticiones ricas en leucina
ON: overnight
PA: ácido fosfatídico



PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDA: agar papa dextrosa

PDB: Protein Data Bank

PIP: fosfatidil inositol fosfato

PR: proteínas relacionadas con la patogénesis

PRRs: receptores de reconocimiento de patrón

PTI: inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos

RACE: amplificación rápida de extremos de ADNc

ROS: especies reactivas de oxígeno

RT: transcripción reversa

SA: ácido salicílico

SAR: resistencia sistémica adquirida

SPSF: síntesis de péptidos en fase sólida

t-Boc: *ter*-butoxicarbonilo

TBTU: tetrafluoroborato de 2-[(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio

tBu: *ter*-butilo

TFA: ácido trifluoroacético

TIS: triisopropilsilano

WAK: quinasas asociadas a pared

WB: cuerpos de Woronin

ZEA: zearalanona

The background features a large, irregular orange shape on the left side, containing the text. To the right, there is a vertical border with a repeating pattern of overlapping circles in a light orange color. At the bottom, there is a solid orange horizontal bar.

01 Introducción

Capítulo I: Introducción

1.1 Inmunidad innata en plantas

Las plantas están constantemente expuestas al ataque de plagas, patógenos y herbívoros. A diferencia de los mamíferos, carecen de inmunidad adaptativa y de células especializadas por lo que su estrategia de defensa se basa en el fortalecimiento de las barreras físicas o químicas preexistentes o bien en distintas vías de señalización inmunológica (Hou et al., 2019). La denominada inmunidad innata es mucho más antigua que la adaptativa desde el punto de vista evolutivo, se encuentra ampliamente distribuida entre organismos y, a diferencia de esta última, carece de la especificidad de reconocimiento de antígenos.

Para combatir el estrés biótico causado por diferentes patógenos (tales como hongos, bacterias, o insectos) en las plantas han evolucionado mecanismos que les permiten percibir estos ataques y convertir esa percepción en una respuesta. Su estrategia de defensa frente a organismos invasores puede ser clasificada en dos grandes grupos: i) respuestas de defensa pasiva y ii) respuestas de defensa activa. Las primeras comprenden aquellas barreras preformadas que se encuentran presentes previo al ataque del patógeno. Las segundas comprenden la activación de dos tipos de vías de señalización inmunológica: inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos-PAMPs (PTI: *PAMPs Triggered Immunity*) e inmunidad activada por efectores (ETI: *Effector Triggered Immunity*) (Zhang et al., 2010). La inducción local de PTI y ETI a menudo desencadena una inmunidad de amplio espectro frente a los ataques de patógenos posteriores en tejidos distales, un fenómeno conocido como resistencia sistémica adquirida (SAR) (Hou et al., 2019).

En general, la mayoría de las especies vegetales son resistentes a la mayor parte de los potenciales invasores microbianos. Este fenómeno es conocido como resistencia o inmunidad no hospedante. En principio, las plantas se encuentran protegidas por dos barreras físicas preformadas, la cutícula y la pared celular, y por compuestos antimicrobianos expresados en

forma constitutiva. La cutícula se encuentra presente en la superficie externa de las células epidérmicas y está compuesta por cutina y ceras, por lo que constituye una importante barrera contra fitopatógenos y microorganismos invasores. La pared celular, por su composición, proporciona además de sostén estructural a la célula vegetal, protección frente a estreses bióticos y abióticos. La combinación de cutícula y pared celular puede ser permeable para algunos hongos patógenos, pero las bacterias no pueden penetrar la epidermis, a excepción de zonas con aperturas naturales tales como estomas, hidatodos, nectarios, lenticelas, o a menos que se encuentre dañada (Bigeard et al., 2015). Aquellos patógenos que logran superar las barreras preformadas deben enfrentar el sistema inmune de la planta, que está constituido por sofisticados mecanismos de reconocimiento de patógenos y de defensa.

El primer nivel del sistema inmune de la planta incluye el reconocimiento del patógeno en la membrana plasmática de las células vegetales. Una gran cantidad de productos asociados a los microorganismos (los PAMPs o elicitores generales) son los inductores de la respuesta inmune innata en la interacción planta-microorganismo y son reconocidos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) localizados en la membrana celular. Esta respuesta, activada por patógenos virulentos en huéspedes susceptibles, es conocida como resistencia basal u horizontal e involucra a la ya mencionada inmunidad disparada por PAMPs o PTI (Akira et al., 2006; Newman et al., 2013). Por otra parte, las quinasas asociadas a pared (WAK) también son capaces de detectar a los denominados patrones moleculares asociados a daños (DAMPs) que se producen como resultado de daños celulares durante la infección de un patógeno. Los receptores con dominios de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina (NLR) también cumplen un rol clave en los mecanismos de defensa vegetales ya que detectan efectores que los patógenos utilizan para facilitar la infección (Andersen et al., 2018). Los PRR, WAK y NLR inician alguna de las muchas cascadas de señalización que aún en la actualidad continúan siendo estudiadas porque no se conocen con certeza los detalles que subyacen los mecanismos de las mismas.

Existe también otro tipo de resistencia, denominada resistencia específica o vertical, que se da a nivel de subespecie. A lo largo de la evolución, los fitopatógenos han logrado superar la resistencia de las plantas a través de la adquisición de factores de virulencia que les permitieron evadir o suprimir los mecanismos de defensa del huésped. Sin embargo, como resultado de la coevolución, las plantas adquirieron genes de resistencia que permiten el reconocimiento en forma específica de los factores de virulencia del patógeno y evitar entonces la infección. Esto ha sido descrito por la hipótesis “gen a gen”, propuesta por Flor en 1942, que explica que el producto de un gen de avirulencia (Avr) de un patógeno (o elicitor) es reconocido por el producto de un gen de resistencia (R) de la planta (Flor, 1942; Nürnberger et al., 2004). Esta respuesta más específica es la denominada inmunidad disparada por efector o ETI.

En respuesta a un patógeno las plantas son capaces de producir una gran diversidad de factores de defensa dentro de los cuales se incluyen fitoalexinas, fitoanticipinas, fenoles, terpenoides, alcaloides, poliacetilenos y una amplia gama de proteínas y péptidos antimicrobianos (Lacerda et al., 2014). Los mecanismos de resistencia frente a patógenos en las plantas forman parte de un complejo sistema multicomponente que comprende las etapas de i) detección y reconocimiento del patógeno, ii) la transducción de señales y iii) las respuestas de defensa que involucra entre otras cosas la expresión génica (Figura 1). Tal como se ilustra en la Figura 1, en el proceso se encuentran involucrados diversos orgánulos y componentes celulares tales como proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), proteínas G, ubiquitina, calcio, hormonas, factores de transcripción (TF) y modificaciones epigenéticas, que en conjunto regulan la expresión de los denominados genes que codifican proteínas relacionadas con la patogenia (PR). Esto conduce a su vez a varias respuestas que previenen una mayor infección: respuesta de hipersensibilidad (HR), producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), modificación de la pared celular, cierre de estomas o producción de diversas proteínas y compuestos anti-plagas como, por ejemplo, quitinasas, inhibidores de proteasas, defensinas y fitoalexinas, etc.

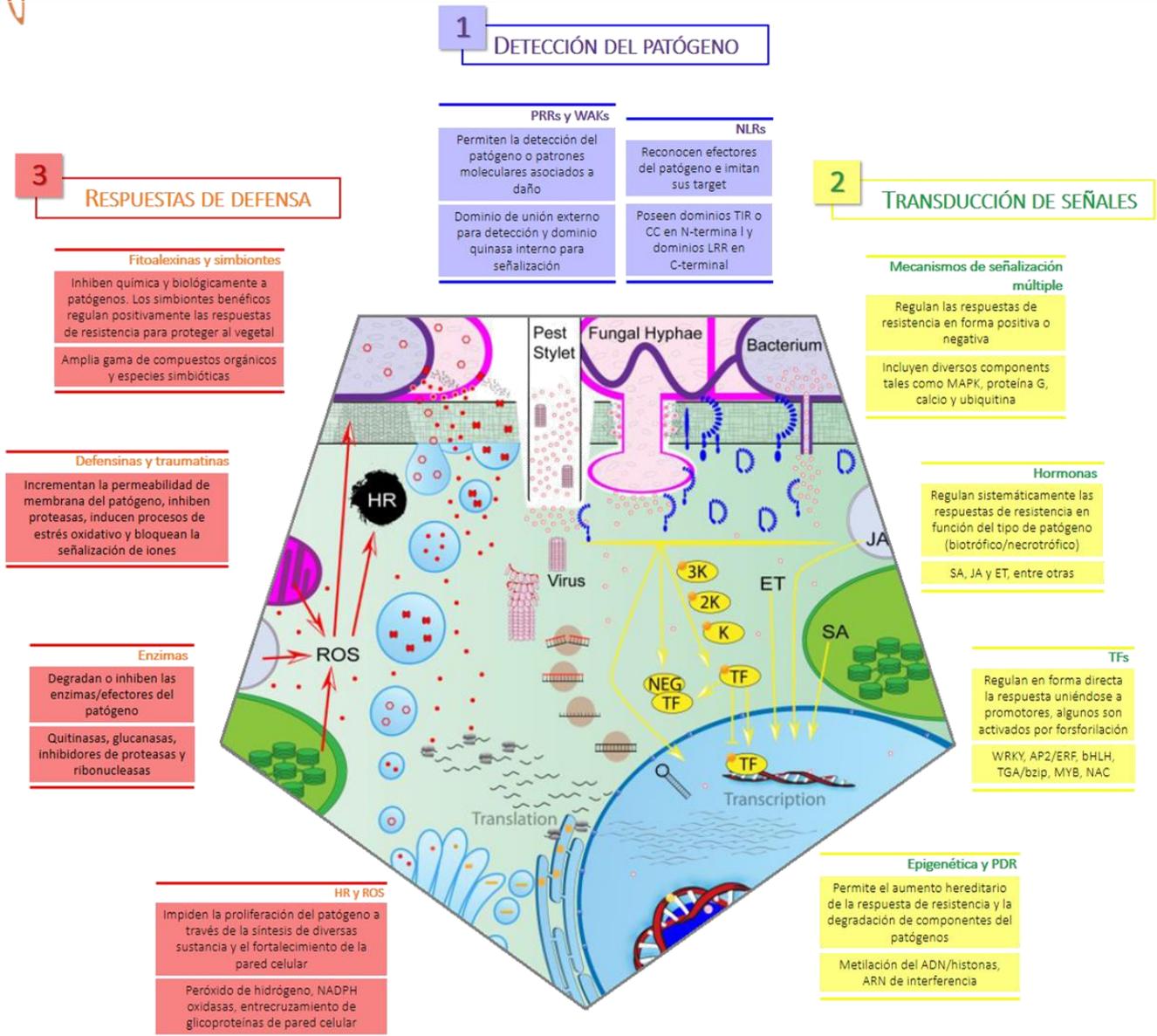


FIGURA 1 | Componentes de los mecanismos de resistencia de las plantas frente a patógenos involucrados en la (1) detección, (2) transducción de señales y (3) respuesta de defensa. (Detección arriba en el centro y progresando en el sentido de las agujas del reloj, terminando en respuestas de defensa a la izquierda). Los elicitores producidos por bacterias, hongos, virus, insectos o nemátodos activan receptores que inician cascadas de señalización. Los receptores activados (color azul) inician alguna de las vías de transducción de señales o bien actúan directamente como factores de transcripción (TF). Las vías de transducción de señales (en amarillo) incluyen cascadas de proteínas quinasa activada por mitógenos (MAPK), señalización mediada por calcio, producción de hormonas, actividad TF y regulación epigenética. Todo esto desencadena la expresión de genes asociados con respuestas de defensa, como aquellos que regulan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), enzimas antimicrobianas, defensinas y fitoalexinas. Estos compuestos relacionados con la respuesta de defensa (en color rojo) inhiben o dificultan la proliferación de patógenos. Múltiples orgánulos celulares se encuentran involucrados en la respuesta de defensa, incluidos los cloroplastos y peroxisomas para la producción de hormonas, así como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi para la producción de proteínas antimicrobianas. Imagen tomada y adaptada de Andersen et. al., 2018.

PRR: receptores de reconocimiento de patrones; **WAK:** quinazas asociadas a la pared; **NLR:** dominios de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina; **PDR:** resistencia derivada de patógenos; **HR:** respuesta hipersensible; **TIR:** Receptor tipo Toll/interleukina-1 N terminal; **CC:** *coiled-coil*; **SA:** ácido salicílico; **JA:** ácido jasmónico; **ET:** etileno.

Las proteínas PR son actores clave de la SAR. La importancia de las mismas durante las interacciones entre patógenos fúngicos y plantas ha sido ampliamente reconocida. Existe una lista creciente de proteínas efectoras patógenas identificadas que interactúan directamente con las proteínas PR durante la infección. Estas proteínas comprenden un grupo diverso y su producción es inducida por fitopatógenos, así como por moléculas de señalización relacionadas con la defensa. Luego de la exposición frente a patógenos, tiene lugar la activación de las vías de señalización de la defensa mediadas por las hormonas ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA). Esto conduce a la acumulación de proteínas PR que minimiza la carga de patógenos y/o la aparición de enfermedades en órganos vegetales no infectados. El ácido salicílico induce SAR y LAR (resistencia local adquirida), mientras que el ácido jasmónico sólo induce LAR. Las características bioquímicas de las proteínas PR difieren en gran medida entre sí, es una gran familia de proteínas constituida por 17 clases estructurales, que presentan diversas funciones. Generalmente son proteínas de bajo peso molecular de aproximadamente 6 a 43 kDa, termoestables, resistentes a las proteasas y permanecen solubles a pH bajo, pudiendo exhibir propiedades ácidas o básicas. Se acumulan en el apoplasto, pero también en la vacuola (Ali et al., 2018) y muchas de ellas tienen estructuras que están estabilizadas por enlaces disulfuro siendo estables frente a enzimas proteolíticas y factores desnaturizantes (Finkina & Ovchinnikova, 2018). Dentro de las proteínas PR se pueden mencionar a las enzimas que hidrolizan la pared celular fúngica como las glucanasas (PR-2), las quitinasas (PR-3,4,8,11) y las endoproteasas (PR-7); inhibidores de enzimas proteolíticas (PR-6); proteínas de transferencia de lípidos (LTP, PR-14), peroxidasas (PR-9); proteínas que bloquean la síntesis proteica (PR-10), defensinas (PR-12), oxalato oxidasas (PR-15,16); proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana, incluidas las proteínas antifúngicas PR-1, proteínas tipo taumatina (PR-5) y tioninas (PR-13), así como proteínas poco caracterizadas de la clase PR-17 (A. Kaur et al., 2017).

1.2 Péptidos antimicrobianos

Todos los organismos han desarrollado estrategias de supervivencia para evadir la infección por patógenos. Las plantas tienen una serie de mecanismos de defensa únicos que incluyen barreras físicas a la invasión de patógenos, así como una amplia gama de metabolitos secundarios y péptidos antimicrobianos (AMPs). Los AMPs comprenden un conjunto estructuralmente diverso, producidos por distintos tipos de células, se expresan de manera constitutiva o inducible según el organismo y el tejido en el que se encuentren al momento de la infección y son capaces de inhibir el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos patógenos a través de múltiples mecanismos de acción (Téllez & Castaño, 2010). Si bien no reconocen un antígeno específico, se producen simplemente por transcripción y traducción de un gen y se liberan relativamente rápido luego de una infección con un gasto reducido de energía y biomasa (Thomma et al., 2002).

La mayor parte de los péptidos antimicrobianos son catiónicos, es decir, poseen carga neta positiva a un pH fisiológico debido al gran contenido de arginina y lisina en relación con el ácido aspártico y ácido glutámico (Téllez & Castaño, 2010). A pesar de su diversidad estructural, una característica común entre ellos es que presentan anfipaticidad, característica que les posibilita la interacción con membranas celulares por la presencia de residuos cargados e hidrófobos. De hecho, existe evidencia de que uno de los blancos de los AMPs es la bicapa fosfolipídica de la membrana plasmática (Yount & Yeaman, 2004). Estos péptidos se han identificado preferentemente en zonas del organismo potencialmente expuestas a patógenos. En las plantas, se producen en los primordios foliares, en las células que recubren la cavidad subestomática, en la epidermis y en los estomas (García-Olmedo et al., 1998).

Los AMPs de plantas son péptidos ricos en cisteína y pertenecen a distintas familias (Figura 2) incluyendo tioninas, péptidos tipo heveína, ciclótidos, proteínas de transferencia de lípidos y

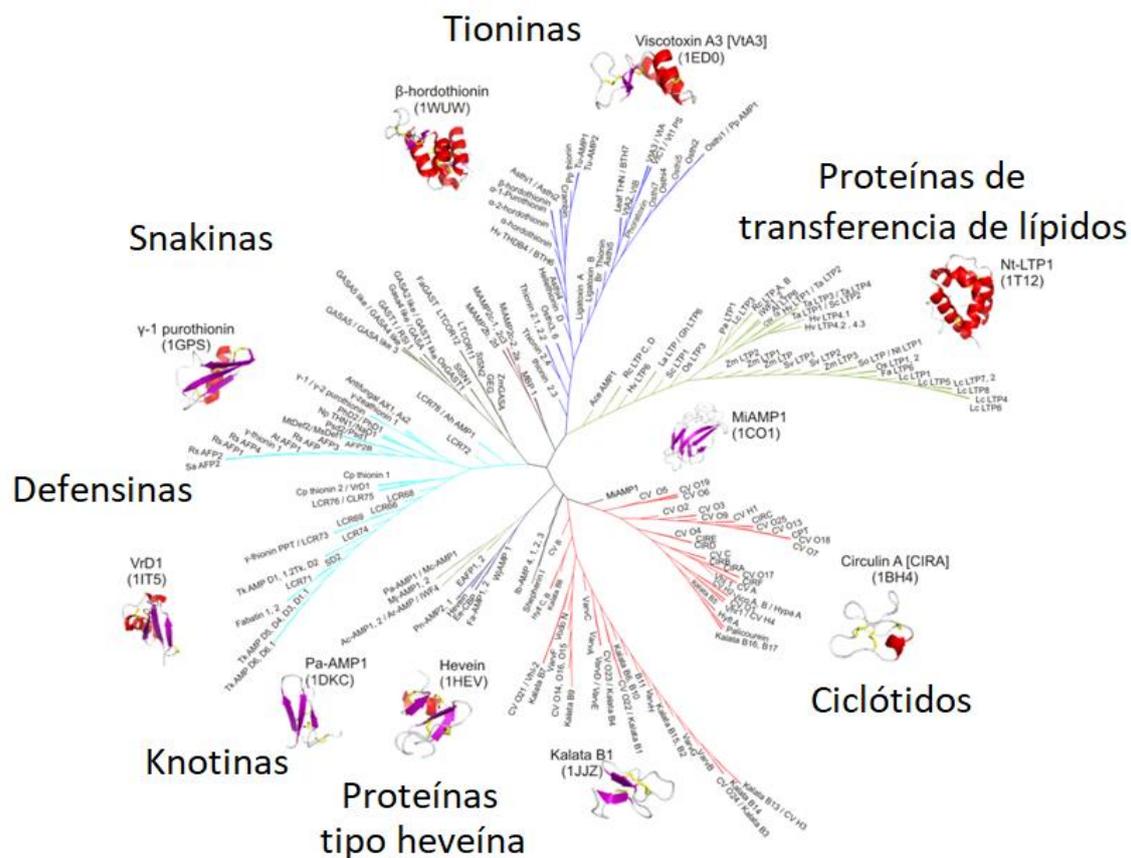


FIGURA 2 | Árbol filogenético no enraizado de las distintas familias de péptidos antimicrobianos de plantas. Los AMPs empleados para construir el árbol se encuentran disponibles en la base de datos PhytAMP. Imagen adaptada de Hammami et al., 2009.

defensinas (Astafieva et al., 2012; Hammami et al., 2009). Los AMPs en las plantas a menudo se expresan en semillas y tejidos reproductivos y también están regulados positivamente por el estrés inducido por la sequía, altas concentraciones salinas, bajas temperaturas, la invasión de patógenos o las heridas (Parisi et al., 2018). Las plantas silvestres y las hierbas, cuya perfecta adaptación a los cambios del entorno se traduce en una mayor resistencia a las enfermedades, proporcionan una valiosa, aunque poco explorada, fuente de antimicrobianos naturales. Las flores también constituyen una fuente relativamente inexplorada de AMPs con potenciales propiedades biotecnológicas. Actualmente es un área de creciente investigación para el mejoramiento potencial de la defensa de plantas de cultivos a través de la aplicación de tecnologías transgénicas (Lacerda et al., 2014).

1.2.1 Mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos

En general, se acepta que la unión del AMP catiónico a la superficie de una célula microbiana es el paso inicial promovido a través de interacciones electrostáticas entre el péptido con carga positiva y la superficie de la célula microbiana con carga negativa, seguida de fuertes interacciones hidrófobas entre los dominios anfipáticos del péptido y la envoltura celular (pared celular y/o membrana plasmática). Tal unión conduce a alteraciones en los gradientes electroquímicos transmembrana, permeabilización de la membrana, formación de canales e incluso fragmentación de la membrana (Struyfs et al., 2021). Han sido descritos al menos cuatro mecanismos distintos a través de los cuales los AMPs exhiben su actividad: i) interactuando directamente con las membranas celulares produciendo un cambio en sus propiedades, formando poros y/o conduciendo a su despolarización lo que lleva a su disrupción, ii) impidiendo la biosíntesis de biomoléculas extra o intracelulares alterando el metabolismo normal, iii) desregulando el flujo de iones en las células y produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) llevando a la apoptosis celular y iv) inhibiendo la síntesis de ATP afectando a los procesos celulares dependientes de ATP (Figura 3) (Su et al., 2020).

El mecanismo de acción de un AMP y su forma de interactuar con la membrana y/o pared dependerá de las características físico-químicas del mismo y de la composición de las envolturas celulares (Pirtskhalava et al., 2021). Dentro de los AMPs de plantas existen múltiples mecanismos de acción que dependen justamente de la naturaleza fisicoquímica del péptido. Las tioninas, LPT y ciclótidos, por ejemplo, son proteínas antifúngicas de naturaleza hidrofóbica que producen un flujo de iones desde la célula y la lisis de la membrana celular luego de la unión a fosfolípidos de membrana (Iqbal et al., 2019). En el caso de las proteínas tipo heveína, se ha reportado que son capaces de inhibir la síntesis de pared celular en hongos, uniéndose a la quitina, componente mayoritario de la pared celular de las hifas en crecimiento, y deteniendo la síntesis de pared (Koo et al., 2009). Algunos AMPs no interactúan a través de la unión a fosfolípidos de membrana, sino que se unen a otros componentes como las glucosilceramidas

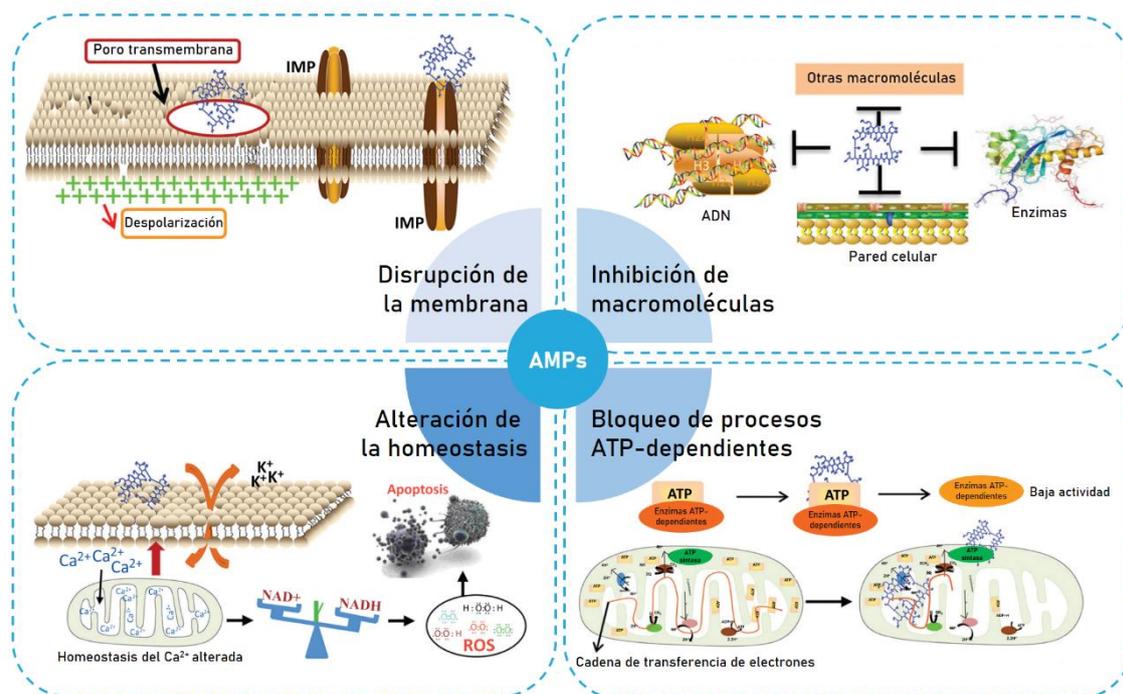


FIGURA 3 | Mecanismos de acción de los AMPs frente a patógenos microbianos. Los AMP pueden unirse directamente a la membrana celular, conduciendo a su alteración, despolarización y/o formación de poros transmembrana. También pueden interactuar a nivel de membrana con importantes proteínas de membrana. IMP: proteína importante de membrana. Los AMP también pueden inhibir macromoléculas tanto intra como extracelulares, incluyendo la síntesis de ADN, enzimas, componentes de pared celular y otras macromoléculas. Otro de los posibles mecanismos implica un aumento en la concentración citoplasmática y mitocondrial de Ca^{2+} , aumentando la relación de $NAD^+/NADH$ e induciendo luego la generación de ROS que lleva a la apoptosis celular. Por último, los AMP también pueden ejercer su acción produciendo el bloqueo de procesos dependientes de ATP. Esto puede ocurrir en forma directa a través de la interacción con el ATP, disminuyendo la actividad de las enzimas dependientes de ATP; o a través de la inhibición de la síntesis de ATP como consecuencia del bloqueo de la ATP sintasa o la cadena de transferencia de electrones. Imagen tomada y adaptada de Zhang et al. (2019).

produciendo luego la permeabilización de la membrana fúngica seguido de la muerte, lo que ha sido descrito para algunas defensinas (Karin Thevissen et al., 2000, 2004). Para RsAFP2, una defensina de *Raphanus sativus*, el mecanismo de acción sobre *Candida albicans* implica un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), deteniendo el crecimiento de las células fúngicas y aumentando la permeabilidad de la membrana (Aerts et al., 2009).

1.3 Defensinas vegetales

Diversos factores de defensa como distintas proteínas PR y una amplia gama de AMPs son producidos por las plantas como consecuencia del ataque de un patógeno (Lacerda et al., 2014). Los AMPs de plantas son ricos en cisteína y pertenecen a distintas familias, una de las cuales está constituida por las defensinas (Astafieva et al., 2012). Las defensinas vegetales son pequeñas proteínas catiónicas que se expresan de forma ubicua en el reino vegetal y se encuentran involucradas en la defensa inmune innata. Pertenecen a un grupo evolutivo muy amplio y diverso denominado superfamilia *cis*-defensinas (Figura 4), compartiendo características estructurales con defensinas de hongos e invertebrados.

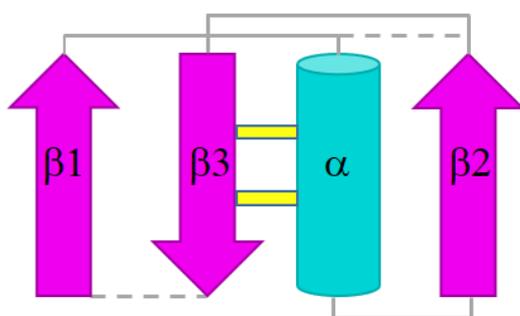


FIGURA 4 | Representación esquemática de una *cis*-defensina. Los puentes disulfuro más conservados (en amarillo) conectan la hoja β central con la α -hélice en una orientación '*cis*'. En líneas discontinuas se muestran los enlaces disulfuro no conservados.

Las estructuras son variables, pero todas comparten una estructura α/β común, estabilizada por al menos tres puentes disulfuro, conocido como motivo $C\alpha/\beta$. Un par de cisteínas dispuestas como CXC (donde X es cualquier aminoácido) ubicadas hacia el final de la hoja β antiparalela forman dos enlaces disulfuro con cisteínas ubicadas en la hélice α , dando origen a la nomenclatura *cis*. Las defensinas provenientes de los distintos grupos que conforman esta superfamilia presentan dicho *fold*ing básico pero con un número de enlaces disulfuro y una longitud de *loops* variables (Parisi et al., 2018). Las defensinas vegetales poseen un patrón conservado de 6 a 8 residuos de cisteína que pueden formar de tres a cuatro puentes disulfuro, lo que les otorga una gran estabilidad estructural y termodinámica frente a proteasas, y condiciones extremas de pH y temperatura (Lay and Anderson 2005).

1.3.1 Características generales

Las características de las defensinas de plantas incluyen (i) una estructura genética similar, normalmente un gen de dos exones con un intrón posicionado entre el péptido señal y la proteína madura (Giacomelli et al., 2012); (ii) una proteína pequeña (<5 kDa), siendo la proteína madura muy cargada o polar; (iii) una secuencia primaria muy divergente con la excepción de las cisteínas conservadas y algunos residuos aminoacídicos (Carvalho & Gomes, 2009); (iv) la presencia del motivo CS $\alpha\beta$, y los motivos γ -core común a todas las proteínas antimicrobianas que contienen cisteína y α -core, descrito sólo para las defensinas vegetales (Lacerda et al., 2014; Sagaram et al., 2011); y (v) pueden expresarse en forma constitutiva o inducible (Graham et al., 2008). En las defensinas vegetales existe una clara, aunque muy limitada, conservación de secuencia (Figura 5). La secuencia variada y la longitud de los segmentos inter-cisteína que presentan las defensinas determinan típicamente la función de la proteína (Shafee et al., 2016). Además de las cisteínas, los residuos conservados en las defensinas son dos residuos de glicina, un residuo aromático (posición 10 relativo a la defensina Nad1) y un glutamato (posición 28) todos los cuales contribuyen en el plegamiento de la defensina (Figuras 5 y 6A) (Parisi et al., 2018). La estructura secundaria típica de las defensinas vegetales consta de tres hojas β y una α -hélice (Figura 6B) cuya configuración espacial corresponde al motivo anteriormente mencionado CS $\alpha\beta$ (Figura 6C).

Las defensinas de plantas exhiben a su vez dos motivos conservados denominados γ -core y α -core (Figura 6C). El primero de ellos ha sido extensamente estudiado y conecta dos hojas β antiparalelas, comprende una región de giro interpuesta y puede ser representado como: [X₁₋₃]-[GXC]-[X₃₋₉]-[C]. Se ha descrito que este motivo es importante para la actividad antimicrobiana que exhiben las defensinas y los AMPs en general, no sólo por su alto contenido de cisteína sino especialmente por la presencia de residuos cargados positivamente en la región de giro (Yount & Yeaman, 2004). En el caso de las defensinas MsDef1 de *Medicago sativa* y MtDef4 de *Medicago truncatula*, se demostró que este motivo es sumamente importante en

relación con su actividad antifúngica. Sagaram et al. (2011) demostraron que el γ -core de la defensina MtDef4 resultó imprescindible para inhibir el crecimiento de una cepa de *Fusarium graminearum*, mientras que el γ -core de MsDef1 posee aminoácidos involucrados en la inducción de cambios morfológicos en el hongo (ramificación de las hifas). Por otra parte, la defensina RsAFP2 (de *Raphanus sativus*) presenta siete de los diez aminoácidos esenciales para

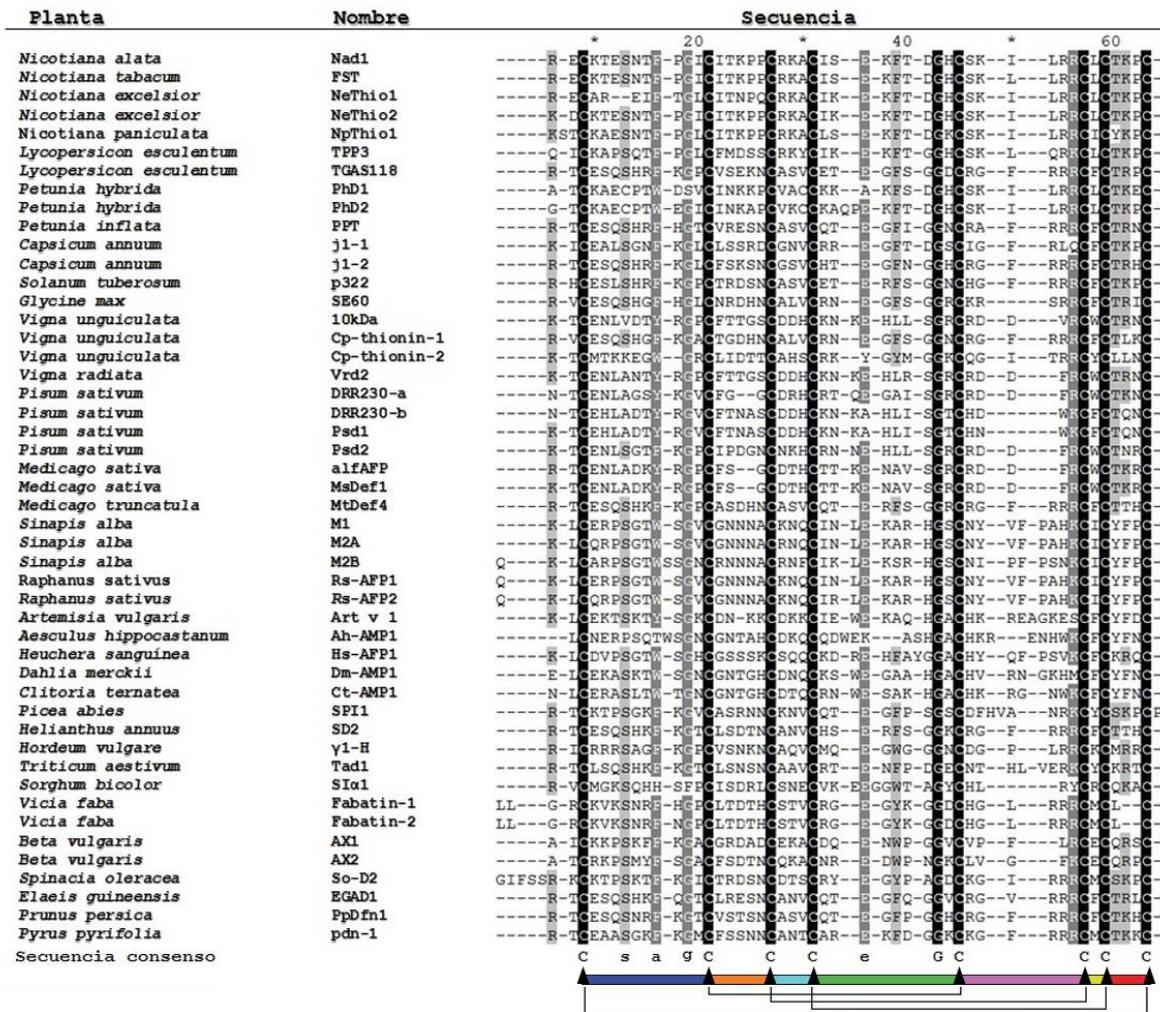


FIGURA 5 | Alineamiento de la secuencia aminoacídica de defensinas maduras de distintas plantas. En los casos correspondientes, se omitieron las secuencias N- y C-terminal. El alineamiento se realizó con el servidor T-coffee y fue editado con el programa GeneDoc. Se indican cuatro niveles de conservación para los residuos: 100% de conservación con fondo negro; 80% de conservación con fondo gris y letra blanca; 60% de conservación con fondo gris y letra negra; y menor al 60% de conservación con fondo blanco. Los residuos cisteína que se encuentran conservados en todas las secuencias se muestran en la secuencia consenso, junto con un residuo de serina (s), un residuo aromático (a), dos glicinas (g y G) y un residuo de glutamato (e) que se encuentran conservados en la mayoría de las secuencias. Debajo se muestra la conectividad disulfuro y en colores los 7 segmentos intercisteína.

su actividad antifúngica localizados dentro de este motivo (Van der Weerden & Anderson, 2013). La secuencia del segmento intercisteína 5 que contiene al γ -core, se puede utilizar para predecir la especificidad de unión a lípidos de una defensina, aunque se ha reportado que defensinas con diferentes secuencias de dicho segmento pueden unirse al mismo lípido (Parisi et al., 2018). Por su parte, el motivo α -core presenta la secuencia consenso $[GXC]-[X_{3-5}]-[C]$ y se trata de un motivo no conservado en todos los AMPs ricos en cisteína. Este motivo fue descrito en el caso de las defensinas vegetales y reside en los segmentos intercisteína 1 y 2 entre la hoja $\beta 1$ y la

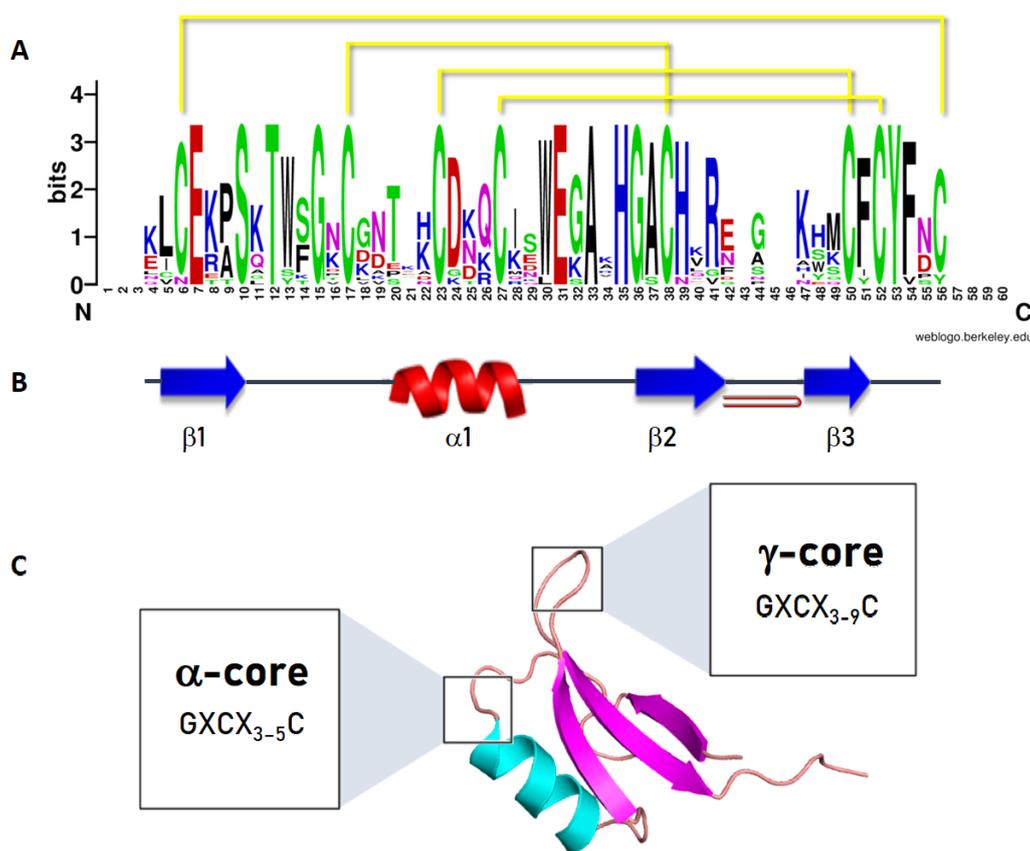


FIGURA 6 | Características de la estructura primaria, secundaria y terciaria de las defensinas vegetales. (A) Logotipo generado utilizando alineamientos de secuencias aminoacídicas de defensinas vegetales. Se observan con mayor tamaño los residuos más conservados que incluyen las cisteínas, dos glicinas, dos ácidos glutámicos y un residuo aromático. En el eje de las abscisas se muestran las posiciones de los residuos aminoacídicos desde el N- al C-terminal. Fue creado con el servidor WebLogo (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) **(B) Estructura secundaria típica de las defensinas vegetales.** Se muestran con flechas azules la posición de las hojas β y en rojo la hélice α . Se simboliza en rojo la estructura de β -hairpin correspondiente al γ -core, una región de giro interpuesta entre las hojas $\beta 2$ y $\beta 3$. **(C) Estructura tridimensional típica de una defensina vegetal (motivo CS α β).** Se observa la estructura tridimensional típica de una defensina de planta y la ubicación de los motivos α - y γ -core así con sus respectivas secuencias consenso. En celeste se muestra la α -hélice y en fucsia las hojas β .

hélice α ; sin embargo, carece de la estructura de *hairpin* presente en el caso del γ -core (De Beer & Vivier, 2011; Sagaram et al., 2011).

Las funciones de las defensinas de planta incluyen la actividad antifúngica, actividad antibacteriana, inhibición de tripsina y α -amilasa que interfieren con la digestión de fitófagos, roles en la tolerancia a metales pesados, entre otras. Existen también una gran gama de proteínas tipo defensina vinculadas al desarrollo de las plantas y reproducción sexual. Una sola defensina puede proporcionar resistencia a múltiples patógenos. Por ejemplo, la defensina floral NaD1 inhibe el crecimiento de patógenos fúngicos *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* e insectos patógenos *Helicoverpa armigera* y *Helicoverpa punctigera* (Graham et al., 2008). Pueden actuar sobre patógenos humanos como bacterias y hongos, tal es el caso de la levadura *Candida albicans* cuyo crecimiento es inhibido por varias defensinas vegetales. Además, se ha demostrado que algunas defensinas de plantas pueden inhibir canales iónicos mientras que otras inhiben la síntesis de proteínas y pueden producir necrosis en células tumorales (Baxter et al., 2017).

1.3.2 Clasificación

Una de las primeras clasificaciones de defensinas vegetales fue propuesta en 1995 por Broekaert et al. y planteó la división en dos grupos según el efecto morfogénico causado sobre hifas de hongos tratadas con estas proteínas. Las defensinas morfogénicas causan una reducción en la elongación de las hifas con un aumento concomitante de la ramificación de las mismas. Dentro de este grupo, se pueden mencionar las defensinas de las familias Brassicaceae (que incluye a Rs-AFP1 y Rs-AFP2 de *Raphanus sativus*) y Saxifragaceae (incluye a Hs-AFP1 de semillas de *Heuchera sanguinea*). Por otro lado, las llamadas defensinas no morfogénicas reducen el crecimiento de las hifas sin inducir una distorsión morfológica marcada. En este grupo se pueden mencionar las defensinas de las familias Asteraceae (como Dm-AMP1 de semillas de *Dahlia merckii*), Fabaceae (como Ct-AMP1 de semillas de *Clitoria ternatea*) e Hippocastanaceae (como

Ah-AMP1 de semillas de *Aesculus hippocastanum*). Estas dos clases de defensinas también difieren con respecto a su espectro de actividad antifúngica (Broekaert et al., 1995). Esta clasificación fue realizada teniendo en cuenta sólo 12 secuencias disponibles en ese momento y sólo se basó en características relacionadas con la actividad antifúngica con lo cual no es representativa de otras actividades identificadas en defensinas. En la clasificación propuesta por Van der Weerden et al. (2013) (Figura 7), se agrupan estas proteínas en función de un análisis de 139 secuencias utilizadas para construir un árbol filogenético, distinguiéndose 18 grupos basados en dicho análisis.

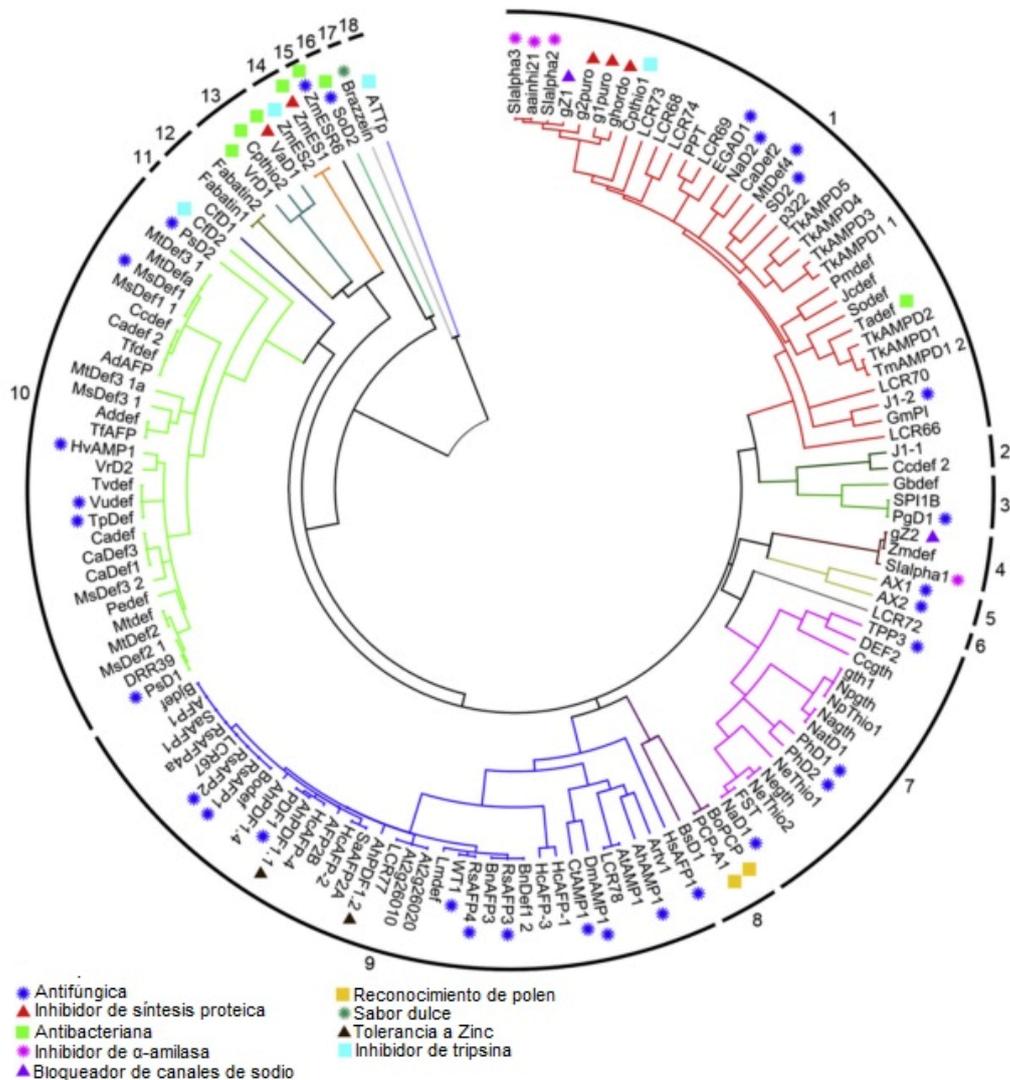


FIGURA 7 | Clasificación de defensinas vegetales en 18 grupos. Se muestra un árbol filogenético circular, las ramas están coloreadas para representar a los distintos grupos que se muestran en el círculo más externo. Las funciones conocidas de péptidos individuales se indican con distintos íconos, según su actividad (Van der Weerden & Anderson, 2013).

También es posible agrupar a las defensinas de plantas en dos clases, en función de la estructura de las proteínas precursoras de las cuales derivan. En la primera clase, que agrupa la mayor cantidad de defensinas, la proteína precursora se compone de una secuencia señal de retículo endoplásmico (o péptido señal) y el dominio defensina maduro. Estas proteínas son secretadas y no presentan señales obvias de modificación postraduccional o localización subcelular (Figura 8A). En la segunda clase (Figura 8B) se agrupa a las defensinas que son producidas como precursores más largos y poseen un prodominio C-terminal de aproximadamente 33 aminoácidos, que es removido proteolíticamente en la maduración del péptido. Estas defensinas sólo fueron encontradas en especies de la familia Solanaceae (por ejemplo NaD1 de *Nicotiana glauca* y PhD1 y PhD2 de *Petunia hybrida*), donde son expresadas en forma constitutiva en tejidos florales y en frutos (Lay and Anderson 2005).

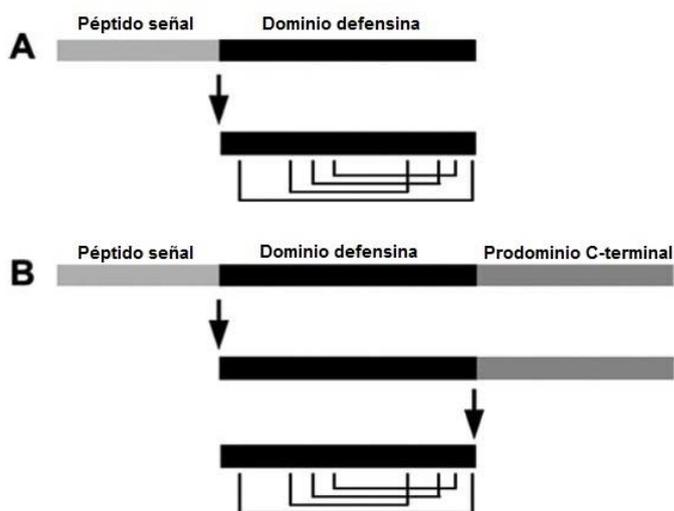


FIGURA 8 | Dos clases de defensinas vegetales. (A) Las defensinas son producidas con un péptido señal además de contar con el dominio defensina. (B) En algunos casos, como en las solanáceas, las defensinas poseen un prodominio C-terminal adicional (Lay and Anderson 2005).

La presencia de una secuencia señal en el extremo N-terminal sugiere que estas proteínas (ambas clases) son secretadas (Thomma et al., 2002). El prodominio C-terminal, por su parte, posee un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos y ácidos que coincide con otros determinantes de la localización vacuolar en plantas. Varias hipótesis han sido propuestas para explicar su función, entre las cuales se pueden mencionar las siguientes: (i) que actúa como una secuencia de localización subcelular con lo cual es importante para el tráfico subcelular normal

y para el procesamiento proteolítico post-traducciona; (ii) que puede actuar como una chaperona intramolecular interviniendo en el proceso de maduración de la defensina; (iii) que puede actuar previniendo interacciones deletéreas entre defensinas y otras proteínas celulares o lípidos de membrana durante la translocación a través de la vía secretoria; y (iv) que puede producir un efecto citoprotector antes de que la defensina sea secretada (Lay and Anderson 2005).

1.3.4 Mecanismos de acción

El modo de acción de las defensinas vegetales es muy variado. Si bien son múltiples las actividades que han sido atribuidas a estas proteínas, la más estudiada y caracterizada hasta el momento es la antifúngica. El primer paso involucra la interacción o reconocimiento a nivel de la membrana y/o pared celular del patógeno. Se han descrito defensinas que se unen preferentemente al lípido II, un precursor de la pared celular anclado a la membrana que es esencial para la biosíntesis de la pared celular bacteriana, a los esfingolípidos fúngicos manosildiinositol fosforilceramida (M(IP)₂C) y glucosilceramida (GlcCer), y a los fosfolípidos ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PI(4,5)P₂) (Parisi et al., 2018). Las defensinas antifúngicas DmAMP1 (*Dahlia merckii* Lehm.), RsAFP2 (*R. sativus*), Psd1 (*Pisum sativum*), MsDef1 (*Medicago sativa*) y Sd5 (*Saccharum officinarum*) interactúan con esfingolípidos de membrana fúngica y glucosilceramidas, lo que resulta en la permeabilización de la membrana (de Medeiros et al. 2010; De Paula et al. 2011; Ramamoorthy et al. 2007; Thevissen et al. 2000; Thevissen et al. 2004). Los esfingolípidos son componentes estructurales importantes de las membranas eucariotas y a su vez cumplen un papel importante como mensajeros secundarios, regulando el equilibrio entre la muerte celular y la supervivencia (De Coninck et al., 2013). Se ha reportado que la defensina MsDef1 de *M. sativa* también es capaz de unirse a un canal de Ca²⁺ y bloquea su actividad (Vriens et al., 2014). Los experimentos llevados a cabo con la defensina VrD1 [*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek] sugieren su unión a la α-

amilasa de *Tenebrio molitor* L. (gusano de la harina) bloqueando su sitio activo y de esta manera impidiendo la digestión del almidón. Curiosamente, VrD1 también puede inhibir la traducción de proteínas en bacterias y hongos, presumiblemente mediante diferentes mecanismos (Graham et al., 2008). Esto evidencia que la divergencia funcional de los AMP y las defensinas en particular puede resultar una fuente interesante como punto de partida para el diseño racional de nuevos agentes antimicrobianos con un mecanismo de acción específico (Schmitt et al., 2016). Incluso una misma defensina puede tener diferentes modos de acción en su actividad antifúngica contra hongos de distinta especie, como fue reportado para MtDef4. El modo en que MtDef4 inhibe el crecimiento de *F. graminearum* difiere de aquel utilizado por esta proteína para inhibir el crecimiento de *N. crassa*, notablemente estos dos hongos ascomicetos pertenecen al mismo subfilo (El-Mounadi et al., 2016a).

1.3.5 Aplicaciones biotecnológicas

Los péptidos antimicrobianos constituyen una importante herramienta biotecnológica en el mejoramiento potencial de la defensa de plantas en cultivos, ya sea a través de la aplicación de tecnologías transgénicas o mediante la producción de biofungicidas. En este contexto, las defensinas vegetales han empezado a probarse como herramientas biotecnológicas para mejorar la producción de cultivos a través de la generación de organismos genéticamente modificados (OGM) resistentes a hongos. Su baja concentración efectiva, entre 0,1 a 10 μM , así como su inocuidad para mamíferos y aves, las convierte en una excelente alternativa para el control de infecciones fúngicas en los cultivos en lugar de los productos químicos (Lacerda et al., 2014). La aplicación de fungicidas de origen sintético ha sido la principal estrategia adoptada por los productores agropecuarios y es utilizada en la actualidad para combatir las enfermedades causadas por hongos en cultivos. Sin embargo, la preocupación relativa a la contaminación ambiental, los riesgos para la salud humana así como las restricciones de uso en varios países

pone de manifiesto la necesidad de buscar nuevos agentes antifúngicos más seguros y eficaces (Leanne-Rialland et al., 2022). Ha sido documentada la efectividad de la sobreexpresión de defensinas en plantas, mejorando significativamente la resistencia frente a varios patógenos fúngicos, tanto en ensayos en invernadero como en ensayos de campo, siendo mayores los reportes del primer tipo de ensayos (J. Kaur et al., 2011). En cultivos transgénicos, pueden conferir resistencia no sólo frente a infecciones fúngicas, sino también frente a bacterias e insectos plaga (Carvalho & Gomes, 2011). Sin embargo, para poder constituirse como una tecnología comercial viable, los cultivos transgénicos que expresen defensinas deben mostrar una resistencia duradera, exhibir un crecimiento y desarrollo normales y no presentar una alteración en sus respuestas frente a otros estímulos de estrés ya sea bióticos o abióticos (J. Kaur et al., 2011).

El potencial de las defensinas vegetales no sólo se restringe a las aplicaciones relacionadas con la protección de cultivos agrícolas; resultan también moléculas interesantes debido a que presentan actividad contra hongos patógenos humanos incluyendo a *Candida* sp. y *Aspergillus* sp. (Hayes et al., 2013; Iqbal et al., 2019). Un ejemplo lo constituye la defensina HXP124, con una potente actividad antifúngica contra hongos dermatofitos y no dermatofitos, que resultó ser efectiva en un ensayo clínico para el tratamiento de la onicomicosis, siendo la formulación estable por 2 años y más eficaz que los fármacos antimicóticos utilizados en la actualidad (Matkawala et al., 2019). El aumento de la resistencia de los patógenos a los antibióticos convencionales ha intensificado el desarrollo de nuevos enfoques de tratamiento para superar estos desafíos. En este escenario, las defensinas de plantas son importantes para diversos fines biotecnológicos y medicinales debido a sus actividades biológicas de amplio espectro. Asimismo, se ha reportado que algunas defensinas vegetales mostraron actividad anti-cáncer frente a líneas celulares de cáncer de colon, mama, leucemia M1 y MCF-17 y no fueron citotóxicas para células normales (Ishaq et al., 2019).

Debido a su gran resistencia frente a enfermedades, las plantas silvestres y las hierbas, constituyen una valiosa fuente de AMPs naturales con potenciales propiedades biotecnológicas; no obstante, son escasos los trabajos que reportan el estudio de defensinas de este tipo de fuentes (Astafieva et al., 2012; Odintsova et al., 2008). En particular, las flores representan una fuente relativamente inexplorada de péptidos antimicrobianos con potencial biotecnológico (Tavares et al., 2008).

1.4 Enfermedades fúngicas de plantas

Las enfermedades fúngicas tienen un impacto muy grande en las plantas, aunque también pueden afectar a los animales y humanos cuando se hallan inmunodeprimidos (Parisi et al., 2018). Los cultivos agrícolas están constantemente amenazados por numerosas enfermedades fúngicas que pueden generar un impacto negativo sobre la disponibilidad y calidad de los productos agrícolas, afectando seriamente la seguridad alimentaria mundial. Cultivos de alto valor económico y agronómico tales como el arroz, el trigo, el maíz, la papa o la soja se enfrentan a una diversidad de enfermedades que representan una pérdida significativa de rendimiento, y a su vez se convierten en una grave amenaza para la salud de los seres humanos y el ganado por la producción de micotoxinas. A nivel mundial, entre los fitopatógenos reconocidos de mayor relevancia económica, se encuentran *Magnaporthe oryzae*, responsable del tizón del arroz que puede ocasionar hasta un 35% de pérdidas de cosecha; *Botrytis cinerea*, un hongo polífago que causa graves daños a una amplia gama de especies vegetales, *Puccinia* y las dos especies de *Fusarium*, *F. graminearum* y *F. oxysporum*, que ocasionan daños importantes a diversos cultivos. Como ejemplos de fitopatógenos productores de micotoxinas pueden mencionarse varias especies de *Fusarium* que infectan cultivos de cereales, así como también especies dentro de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Claviceps* (Leannec-Rialland et al., 2022).

1.4.1 *Fusarium graminearum* Schwabe (telemorfo *Gibberella zeae*)

Los hongos del género *Fusarium* son organismos cosmopolitas que pueden vivir en una amplia variedad de ecosistemas, incluyendo desiertos y regiones heladas. Dentro de las especies de este género se encuentran agentes fitopatógenos causantes de enfermedades en la mayoría de las especies vegetales cultivadas. El patógeno pertenece a un complejo de especies que, en base las secuencias nucleotídicas de 12 genes, se resolvió en 15 especies filogenéticas (Magliano Alconada and Chulze 2013). *Fusarium graminearum* Schwabe es el agente causal más común de la Fusariosis de la espiga (FE) una enfermedad reemergente del trigo (*Triticum aestivum* L.) a nivel mundial.

Las colonias de *F. graminearum* se caracterizan por presentar abundante micelio aéreo rosado-amarillento y una pigmentación rojiza característica en el medio de cultivo agar papa glucosado (Figura 9A). El pigmento es sensible al pH y puede cambiar de rojo a amarillo a medida que desciende el pH. Las especies de este género son capaces de producir tres tipos de esporas asexuales denominadas macroconidios, microconidios y clamidosporas. El primer tipo es el principalmente utilizado en la caracterización, siendo variable en forma y tamaño según la especie. Los macroconidios de *F. graminearum* (Figura 9B) son moderadamente curvados o rectos, con forma de hoz, de 2,5 x 35-63 μm , con paredes gruesas, 5 o 6-septados, presentan una célula apical ahusada y la célula basal en forma de pie, una característica distintiva de esta especie. (Figura 9C). Las clamidosporas poseen forma globosa con un diámetro de 10-12 μm y se forman frecuentemente, en los macroconidios. Los microconidios se encuentran ausentes en esta especie. Es un hongo homotálico y sus peritecios son de color negro, que se forman a partir de un estroma de forma ovoide y papilado. En los peritecios se forman las esporas sexuales denominadas ascosporas. La temperatura óptima para que se forme esta estructura oscila entre

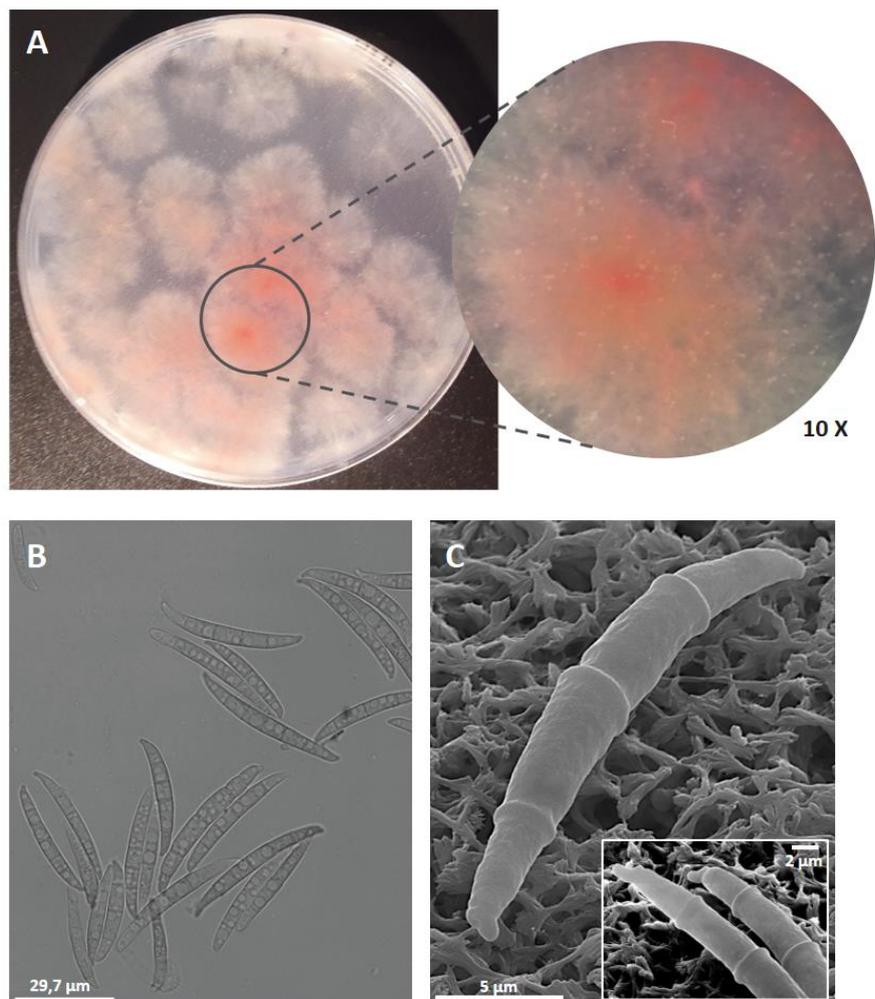


FIGURA 9 | Características morfológicas de *F. graminearum* Schawbe. (A) Crecimiento del hongo en el medio APG. Se observa la coloración rosada característica del micelio. Se muestra una ampliación de una colonia con una fotografía tomada con lupa (aumento 10X). (B) Micrografía óptica de macroconidios. Se observa la forma típica de los conidios, 5-6 septados. (C) Micrografía de microscopía electrónica de barrido de los macroconidios. Se observa la morfología típica de los conidios, con la célula apical ahusada y la basal con forma de pie (detalle en el cuadro inferior derecho). Barras de escala en μm .

22 y 25 °C, requiriendo una alta humedad relativa e incidencia de luz UV y la liberación de las ascosporas se produce en respuesta a la lluvia o la alta humedad a través de mecanismos activos (Leslie & Summerell, 2006).

1.4.1.1 Fusariosis de la espiga

En Argentina, *F. graminearum* es el principal patógeno asociado con la Fusariosis de la espiga (FE) o golpe blanco, una de las patologías económicamente más relevante de los cultivos de trigo, cebada, arroz y otros cereales menores de todo el mundo (Malbrán et al., 2014).

La sintomatología de la enfermedad incluye la desecación prematura de las espigas, que toman la coloración de las espigas maduras. En ataques severos es posible observar coloración salmón en la base de las espiguillas o en los márgenes de las glumas. Los granos afectados toman una coloración blanquecina o “atizada” y se encogen, lo que se traduce en una disminución tanto de la calidad como en el rendimiento del cultivo debido a la disminución del peso hectolítrico y el tenor proteico, afectando seriamente el valor comercial del producto final. No obstante, el principal impacto desde el punto de vista de la seguridad alimentaria es la acumulación de micotoxinas, principalmente deoxinivalenol (DON) y sus derivados acetilados 3 acetil-desoxinivalenol (3-ADON) y 15 acetil-desoxinivalenol (15-ADON), nivalenol (NIV) y zearalenona (ZEA). Por su toxicidad, las normas internacionales limitan estrictamente el contenido de DON en las cadenas alimentarias (Magliano Alconada & Chulze, 2013).

El efecto tóxico del DON está asociado con el rechazo del alimento, vómitos y supresión de las funciones inmunitarias. El NIV resulta ser más tóxico para los seres humanos y los animales domésticos que el DON (T. Van Der Lee et al., 2015) Cabe destacar que los tricotecenos también son potentes fitotoxinas, siendo el DON más fitotóxico que el NIV (Ji et al., 2019).

1.4.1.1 Epidemiología de la FE

El ciclo de la FE en trigo consta de distintas etapas que incluyen la supervivencia del patógeno en los residuos de cosecha, su diseminación y la infección en el huésped (Figura 10). Los residuos de cosecha colonizados por el patógeno constituyen una de las principales fuentes de inóculo, ofreciendo un sitio de esporulación durante la siguiente estación de crecimiento (Pereyra et al., 2004). En las condiciones ambientales de nuestro país se ha detectado la supervivencia del patógeno sobre rastrojos infectados de cereales y de soja durante 18 y 14 meses postcosecha, respectivamente (Mourellos, 2015). La diseminación de esporas es un paso crítico para que los hongos colonicen nuevos sustratos y hábitats. Algunas se liberan independientemente de la velocidad del viento mediante mecanismos activos desde los peritecios. Los macroconidios, sin

embargo, dependen de la velocidad del viento para su liberación. Se ha reportado que ambas formas de *F. graminearum* causan epidemias de la enfermedad; sin embargo, las ascosporas constituyen la principal fuente de inóculo en el aire (Keller et al., 2014).

La FE en el campo inicia cuando las esporas transportadas por el aire se depositan en las espiguillas en antesis, germinan y entran en la planta a través de aberturas naturales (Trail, 2009). Las ascosporas y conidios germinan principalmente en las anteras y a partir de ahí colonizan el ovario, otras estructuras florales y el resto de la espiga. Durante la infección, en un inicio el hongo crece de forma intercelular y de manera asintomática, diseminándose luego a

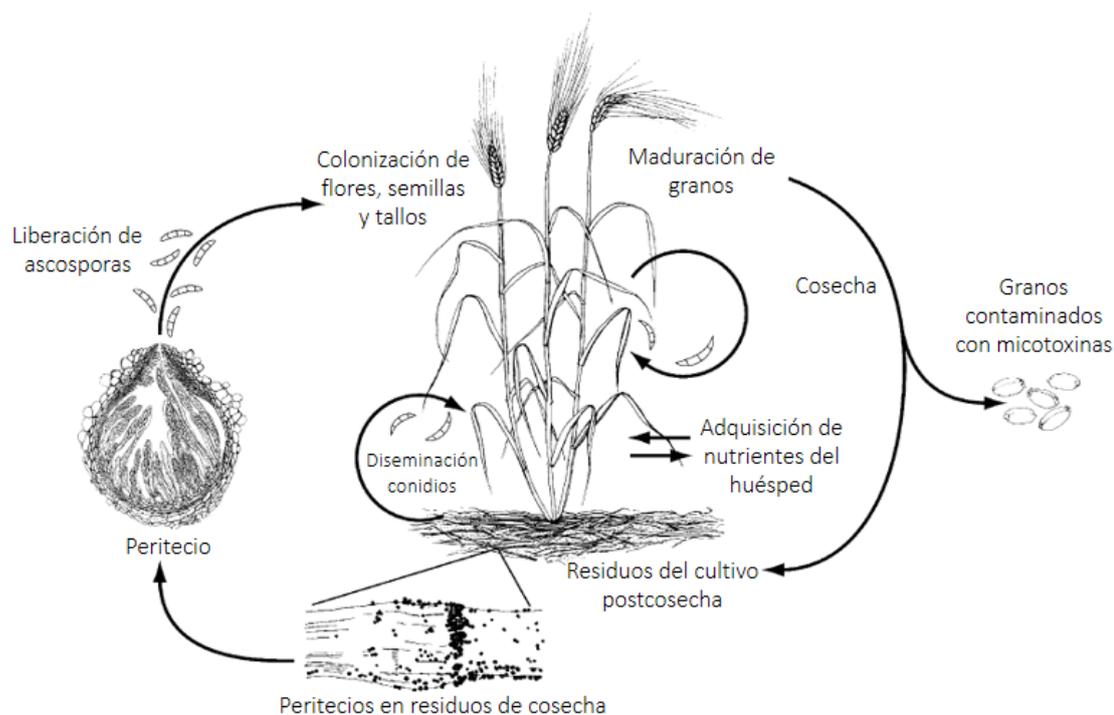


FIGURA 10 | Ciclo de vida de *F. graminearum*, agente causal de la fusariosis de la espiga en trigo. Imagen tomada y adaptada de Trail et al. (2009).

través del xilema. Luego, se propaga en forma radial y comienza a producirse la necrosis de las células a medida que crece intracelularmente colonizando el tejido que finalmente se torna blanquecino. La infección del raquis lleva a la infección de toda la espiga, a la interrupción del transporte de agua y nutrientes a la espiga, produciendo, en consecuencia, la sintomatología típica de granos arrugados con menor peso hectolítrico y por ende menor rendimiento.

1.4.1.2 Impacto de la FE en la Argentina

El trigo representa una de las principales fuentes de hidratos de carbono del mundo occidental. Junto con el maíz y el arroz es uno de los tres granos más ampliamente producidos a nivel global, siendo la base de la alimentación en nuestro país. Se utiliza el grano para elaborar harina, harina integral, sémola, cerveza y una amplia variedad de productos alimenticios. Históricamente, Argentina ha tenido un papel destacado en la producción de trigo, siendo en el año 2020 el séptimo exportador a nivel mundial. Según datos de la campaña 2021/2022, la producción total de trigo alcanzó las 22.150.287 toneladas, con 6.751.729 hectáreas sembradas y un rendimiento promedio de 3.383 kg/ha (Ministerio de Agricultura, Ganadera y Pesca, 2022). La producción se concentra en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba con un 38, 18,84 y 17,89 % de la superficie total sembrada en la campaña 2021/2022, respectivamente (Sistema de Información Simplificado Agrícola, Instituto Nacional de Semillas, 2022). Estos datos ponen de manifiesto la relevancia de este cultivo en nuestro país. De las enfermedades de los cereales de invierno y el trigo en particular, la fusariosis de la espiga es la que presenta las mayores dificultades para su control y por lo tanto es un permanente desafío tanto para productores agropecuarios como para fitomejoradores. La frecuencia de las epidemias de FE en Argentina se encuentra actualmente en aumento, causando pérdidas de rendimiento y descuentos en los precios debido a la reducción de la calidad del grano, con daños reportados que van del 20 al 70% (De Galich, 1997; Díaz de Ackermann, Kohli, 2013). El aumento de la frecuencia y de los daños directos ocasionados puede asociarse a una combinación de factores tales como el cambio climático regional incluyendo mayores precipitaciones, el aumento del área de monocultivo y de especies susceptibles, el sistema de siembra directa sin rotación, la baja eficiencia del control químico, sumado a la inexistencia de cultivares tolerantes o resistentes (Moschini, Bischoff & Martínez, 2008). La metodología más comúnmente utilizada para el manejo de la FE es la aplicación de fungicidas. Sin embargo, este método no siempre resulta efectivo (Nicholson et al., 2003). Algunos fungicidas no permiten un control completo de la

enfermedad a la vez que otros pueden incrementar los niveles de DON en los granos (Wegulo et al., 2015). A esto se suma la floración desuniforme del trigo; la estrecha ventana de aplicación y la dificultad para lograr una adecuada cobertura y retención de los fungicidas en las espigas lo que dificulta aún más el control de la enfermedad (Wegulo et al., 2015; Yuen & Schoneweis, 2007). En este contexto, la posibilidad de inducir la aparición de resistencia en los aislamientos de *F. graminearum* como consecuencia de la exposición prolongada a los fungicidas; también podría limitar seriamente su utilización. Este escenario exige una búsqueda inmediata de una solución para este problema teniendo en cuenta el marcado interés que existe en el desarrollo de alternativas de manejo de la FE.

1.5 Tecnologías de producción de péptidos

1.5.1 Generalidades

Tanto proteínas como péptidos juegan un rol clave en numerosos procesos biológicos y fisiológicos que tienen lugar en los seres vivos. Las proteínas desempeñan múltiples funciones en las células de todos los organismos vivos, cumplen funciones metabólicas y de regulación, están involucradas en la organización estructural básica celular y en el transporte de diversas sustancias a través de las membranas celulares, pueden actuar como hormonas o neurotransmisores en la comunicación intercelular o como anticuerpos en el sistema inmune, entre muchas otras funciones. Los péptidos por sí mismos pueden funcionar como hormonas, factores de crecimiento, neuropéptidos, toxinas y antibióticos. Dada la importancia de estas moléculas y el gran número de funciones atribuidas, el estudio de los mecanismos y los principios que regulan sus propiedades funcionales y estructurales ha constituido un importante objetivo en el marco de la investigación biológica y médica (Kimmerlin & Seebach, 2005). Los péptidos son heteropolímeros compuestos por aminoácidos unidos a través de enlaces de tipo amida (enlace peptídico) entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo α -amino del aminoácido siguiente. La definición de péptido es limitada porque no es específica en lo que

refiere a longitud de la secuencia aminoacídica, pero se asume que presentan desde dos a varias docenas de aminoácidos, estableciendo en forma arbitraria el límite de 6000 Dalton, por encima del cual se trataría de una proteína (Guzmán 2013). Como ejemplos de los límites inferior y superior pueden citarse el edulcorante no calórico aspartamo, un dipéptido constituido por ácido aspártico y fenilalanina esterificada, y la hormona insulina de 51 residuos con un peso molecular de 5773 Da., respectivamente (Guzmán et al., 2007).

Las características funcionales de los péptidos estarán determinadas en gran medida por su estructura primaria y secundaria. La estructura primaria refiere al orden y composición de la cadena peptídica, es decir, la secuencia aminoacídica y es posible determinarla a través del método de secuenciación de Edman (Ba et al., 2013; Edman, 1950) o bien por espectrometría de masas (Cologna et al., 2010). La estructura secundaria, por su parte, está determinada por la configuración espacial que adopta la molécula y queda definida por los puentes de hidrógeno establecidos entre los grupos CO y NH de los enlaces amida de la cadena peptídica, siendo los ángulos de torsión determinantes para la formación de estas estructuras. Las principales estructuras secundarias son las hélices α , las hojas β y los giros β . Para la determinación de la estructura secundaria, la metodología empleada es la espectroscopia de dicroísmo circular (Whitmore & Wallace, 2007).

1.5.2 Síntesis de péptidos

Para el estudio tanto de péptidos como de proteínas es necesario contar con disponibilidad de la molécula en términos de pureza y cantidad. Para ello, existen actualmente distintas tecnologías que permiten la obtención de péptidos y proteínas tales como la extracción a partir de fuentes naturales, la producción a través de tecnología de ADN recombinante, la producción en sistemas de expresión acelulares, la producción en plantas y animales transgénicos, la producción a través de la síntesis enzimática con proteasas en medios no acuosos y la síntesis química (Guzmán 2013). Cada una de estas metodologías tienen sus ventajas y desventajas

asociadas, pero únicamente la síntesis química permite la incorporación de aminoácidos no naturales en la producción de grandes cantidades de péptidos (Kimmerlin & Seebach, 2005). El mayor determinante para la elección de la tecnología de producción más apropiada será el tamaño molecular del péptido a sintetizar. De esta manera, la tecnología del ADN recombinante es apropiada para la síntesis de péptidos grandes o proteínas, tales como la insulina (Baeshen et al., 2014). La síntesis enzimática es la más restringida porque ha sido empleada en forma exitosa sólo en el caso de dipéptidos o tripéptidos (Kumar & Bhalla, 2005). Para péptidos de tamaño pequeño o medio de entre 5-80 residuos aminoacídicos, la síntesis química es la más adecuada. En la mayoría de los casos, las tecnologías de producción de estas moléculas no compiten entre sí, aunque como la mayoría de los péptidos con aplicación tecnológica resultan ser de tamaño medio, la síntesis química aparece como una alternativa tecnológica sólida (Guzmán 2013).

1.5.3 Síntesis química de péptidos

La síntesis química de péptidos fue desarrollada originalmente por Emil Fisher en 1901 que logró sintetizar el dipéptido glicil-glicina bajo el supuesto de que el proceso era análogo a sintetizar una amida. A partir de este avance, la evolución de la técnica fue lenta y recién en el año 1932 Max Bergman y Leonidas Zervas introdujeron el grupo carboxibenzoilo como protector del grupo amino fácilmente removible lo que permitió la síntesis de numerosos péptidos. En 1953, Vincent Du Vigneaud sintetizó el primer polipéptido funcional, la hormona oxitocina (Kimmerlin & Seebach, 2005). Un notable avance en el campo de la síntesis peptídica fue logrado unos años después cuando Bruce Merrifield introdujo la estrategia de síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) (Merrifield, 1986). Hasta ese momento, la síntesis peptídica se realizaba en solución, por lo que en cada etapa del proceso se debían aislar y purificar los productos antes del siguiente paso. Con la metodología desarrollada por Merrifield, el péptido creciente se vincula a través de un *linker* o espaciador a un soporte sólido inerte e insoluble y, por lo tanto, luego de cada etapa

los subproductos pueden ser removidos por filtración y lavado. La naturaleza repetitiva de la síntesis y la utilización de un soporte insoluble permitieron que el proceso pueda ser automatizado; además ofrecía la ventaja de que la solubilidad del péptido no representaba un problema debido a que permanece unido al soporte sólido. Esta tecnología adquirió gran relevancia debido a sus grandes ventajas y se han registrado importantes avances en el desarrollo de soportes sólidos, grupos protectores y espaciadores además de metodologías de activación para la formación del enlace peptídico (Albericio, 2004; Isidro-Ilobet et al., 2009).

1.5.3.1 Síntesis química de péptidos en fase sólida (SPFS)

La SPFS consiste en la elongación de una cadena peptídica que se encuentra anclada a un soporte sólido mediante la adición sucesiva de aminoácidos que se unen a través del enlace peptídico establecido entre el grupo amino del aminoácido ligado al soporte y el grupo carboxilo del aminoácido entrante (Figura 11). La síntesis progresa hasta que se logra el péptido con la secuencia y largo deseados (Nilsson et al., 2005). El proceso de síntesis involucra el acoplamiento del aminoácido C-terminal del péptido a sintetizar al soporte sólido con su grupo α -amino protegido. Seguidamente el grupo protector será removido y se acoplará luego el siguiente aminoácido protegido en su grupo α -amino, desprotegiéndose una vez unido. Este ciclo de acople-desprotección se repite hasta que la secuencia peptídica llega a la longitud deseada. Cabe destacar que durante la síntesis deben protegerse también los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos con grupos protectores que sean estables frente a las condiciones de desprotección de los grupos α -amino. Finalmente, se procede a separar el complejo formado por el péptido unido al soporte sólido y se remueven los grupos protectores de las cadenas laterales, liberando de esa forma el péptido. Para lograr una síntesis exitosa se deben tener en cuenta una serie de consideraciones tales como i) la estrategia general de síntesis en función del grupo protector del grupo amino ($N\alpha$) elegido; ii) la elección de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos; iii) la elección del soporte sólido; iv) el

linker empleado según el extremo C-terminal deseado y v) la elección de los reactivos de acoplamiento adecuados a fin de lograr una eficiente formación del enlace amida (Mäde et al.,

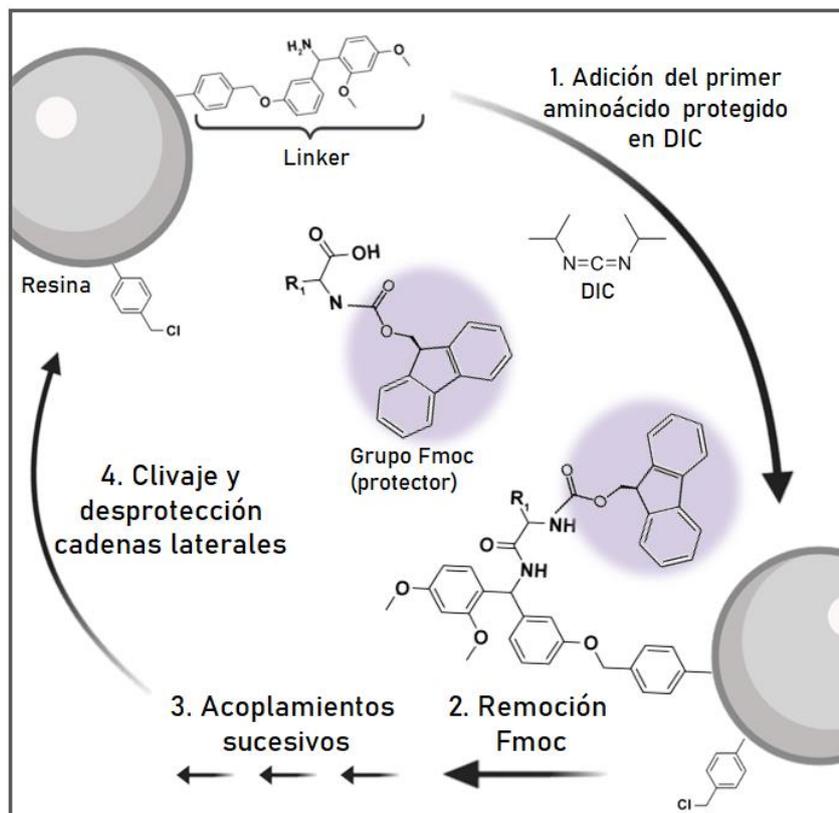


FIGURA 11 | Representación esquemática de la síntesis de péptidos en fase sólida. La síntesis de péptidos en fase sólida incluye las etapas de 1) acople del primer residuo aminoacídico, 2) Desprotección para remover el grupo Fmoc, 3) acoplamiento sucesivos de los siguientes residuos (ciclo iterativo) y 4) clivaje del péptido de la resina y desprotección de las cadenas laterales.

2014).

Los grupos funcionales de los aminoácidos deben ser protegidos para evitar la formación de un enlace amida no deseado, impidiendo que el grupo carboxilo reaccione con el grupo amino de un aminoácido análogo. A su vez, es necesario proteger también las cadenas laterales de los aminoácidos para evitar que reaccionen con los grupos funcionales de otros aminoácidos. Las características fundamentales que debe reunir las moléculas empleadas como grupo protector incluyen facilidad de incorporación a las moléculas deseadas, una alta estabilidad en distintas condiciones y una remoción sencilla y segura (Wut, 2014).

Se han propuesto un gran número de grupos protectores para ser empleados en SPFS, pero la investigación y desarrollo ha conducido a dos estrategias principales de protección que son

conocidas como t-Boc/Bzl y Fmoc/tBu. La primera de ellas emplea el *ter*-butoxicarbonilo (t-Boc) para la protección de los grupos α -amino y el grupo bencilo (Bzl) para la protección de las cadenas laterales de los aminoácidos. En la segunda estrategia, por su parte, se emplea el grupo 9-fluorenil metoxycarbonilo (Fmoc) para la protección de los grupos α -amino y el grupo *ter*-butilo (tBu) para proteger las cadenas laterales. El grupo t-Boc es removido empleando TFA, mientras que el grupo Bzl requiere un ácido fuerte como el ácido fluorhídrico (HF) para ser removido. Para la remoción del grupo Fmoc se emplean condiciones básicas utilizando normalmente piperidina y para la remoción del grupo tBu se emplea TFA. Ambas estrategias de síntesis pueden ser adaptadas a la síntesis automática (Mäde et al., 2014).

En cuanto al soporte sólido que se emplea para la SPFS, existe en la actualidad un gran número de resinas disponibles, su elección dependerá de la funcionalidad deseada en el extremo C-terminal del péptido, pudiendo ser carboxilo, amida, tioéster o alcohol (Kimmerlin & Seebach, 2005).

1.5.4 Diseño racional de péptidos antimicrobianos

Los péptidos sintéticos poseen un amplio campo de aplicación y en investigación existen muchas áreas en las cuales se constituyen como valiosas herramientas. El diseño de una secuencia adecuada para una aplicación determinada es una etapa clave. Aunque existe la posibilidad de diseñar secuencias *de novo*, es más común utilizar secuencias derivadas de proteínas que se presentan de manera natural, ya sea como parte de una proteína de interés o modificada a partir de otras secuencias para mejorar una actividad determinada. La bioinformática es una disciplina muy potente que realiza un aporte significativo en esta tarea y actualmente es posible realizar una amplia variedad de análisis *in silico*, los cuales representan un ahorro tanto en tiempo como en inversión cuando se realiza un estudio que involucra péptidos (Fjell et al., 2012). Existen actualmente muchos recursos bioinformáticos en la red, desde bases de datos (Genbank, EMBL), hasta software para diversos análisis. El uso adecuado y eficiente de estos recursos se vuelve

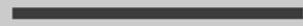
una parte importante en la fase inicial de diseño de péptidos como herramientas en investigación (Guzmán 2013).

El diseño racional de péptidos antimicrobianos abarca principalmente tres enfoques: diseño *de novo*, diseño basado en secuencias de AMPs preexistentes realizando modificaciones y diseños sustentados en aproximaciones fisicoquímicas. Los determinantes estructurales relevantes para tener en consideración en el diseño son la secuencia de aminoácidos, el tamaño, la carga, la hidrofobicidad y la conformación. El diseño basado en plantillas naturales es una potente herramienta que permite realizar modificaciones a una secuencia, ya sea acortando la cadena, sustituyendo aminoácidos y/o realizando ciclaciones lo que puede dar origen a nuevos péptidos más potentes (Ajingi & Jongruja, 2020). También permite evaluar en el caso de las sustituciones aminoacídicas la relevancia de la identidad de un residuo dado en una posición en relación con la actividad exhibida. Bajo este enfoque han sido utilizados numerosos AMPs como plantillas tales como cecropina, magainina, protegrina y lactoferrina, y en todos los casos los diseños han sido realizados partiendo de la base de que la carga y el carácter anfifílico de los péptidos son cruciales para su actividad (Fjell et al., 2012).



02

Objetivos e Hipótesis





Capítulo II: Objetivos e hipótesis

2.1 Objetivos

2.1.1 *Objetivos generales*

El objetivo general del plan de trabajo se orienta hacia el estudio de nuevas proteínas relacionadas con procesos de defensa de especies vegetales silvestres que crecen en Argentina que puedan resultar moléculas atractivas para su potencial aplicación en procesos biotecnológicos o en el tratamiento de algunas enfermedades. El conocimiento de las relaciones estructura-función permitirá concebir y realizar cambios en la estructura de estas moléculas que modifiquen su comportamiento. El presente trabajo de tesis intenta abordar la caracterización de defensinas pertenecientes a una planta silvestre de la familia Asteraceae con actividad antifúngica y realizar una aproximación a su mecanismo de acción.

2.1.2 *Objetivos específicos*

1. Clonar defensinas de plantas de la familia Asteraceae.
2. Estudiar mediante herramientas bioinformáticas las defensinas clonadas.
3. Diseñar y sintetizar péptidos derivados de las secuencias de defensinas de *Silybum marianum*. que incluyan regiones relacionadas con la actividad antifúngica en estas proteínas.
4. Ensayar actividad antifúngica de los péptidos sintetizados en el objetivo 3.
5. Introducir modificaciones en los péptidos que por su actividad resulten más interesantes.
6. Estudiar el mecanismo de acción de los péptidos con actividad antifúngica.

2.2 Hipótesis

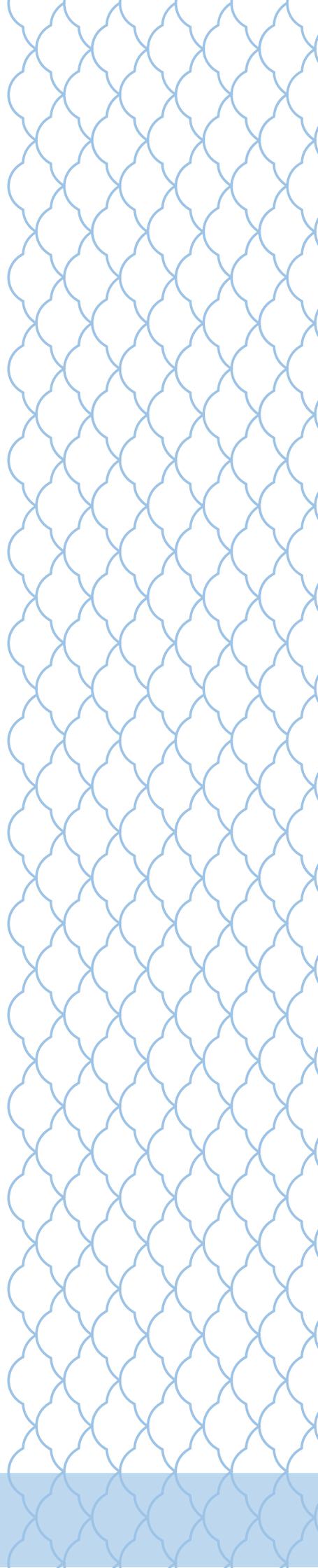
En base a los antecedentes descriptos en el Capítulo I, se plantean las siguientes hipótesis:



- ✓ Las flores del cardo *Silybum marianum*, una especie silvestre de la familia Asteraceae que crece en la provincia de Bs. As., constituyen una valiosa fuente natural de defensinas.
- ✓ La determinación de la actividad antifúngica de péptidos derivados de las secuencias de las defensinas del cardo *S. marianum* permiten identificar motivos antifúngicos presentes en las mismas.
- ✓ Los motivos α - y γ -core funcionan como determinantes de la actividad antifúngica de las defensinas y los péptidos sintéticos obtenidos a partir de sus secuencias aminoacídicas son activos frente a conidios del hongo fitopatógeno *Fusarium graminearum*.
- ✓ La modificación racional de las secuencias identificadas como motivos antifúngicos en sitios puntuales permite obtener péptidos con una actividad antifúngica diferenciada respecto del péptido base, así como también profundizar el estudio del mecanismo de acción de dichos péptidos, contribuyendo en un futuro al desarrollo de nuevos AMPs.

03

Materialles & Métodos





Capítulo III: Materiales & Métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

- Material vegetal

Inflorescencias de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. fueron recolectadas en primavera a partir de plantas localizadas en La Plata y Olavarría. Una de las muestras fue depositada en el herbario LPE, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, número de voucher LPE 1162.

- Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas, su genotipo, así como el objetivo de su utilización se detallan en la Tabla

1.

TABLA 1 | Cepas empleadas en el trabajo experimental.

Cepa	Genotipo	Utilización
XL1-Blue (Stratagene)	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	
DH5α (Promega)	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻	Cepas de clonado
TOP10 (Invitrogen)	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	

Para los ensayos biológicos de actividad in vitro de los péptidos derivados de las secuencias de las defensinas se realizó un *screening* empleando dos especies de hongos fitopatógenos filamentosos y una levadura. Se utilizó la cepa SP1 de *Fusarium graminearum*, aislado a partir de una muestra de granos obtenida en San Pedro, Buenos Aires, Argentina. La cepa fue caracterizada como altamente patogénica y toxigénica *in vivo* e *in vitro* (I. Malbrán et al., 2012, 2014). También se empleó la levadura *Candida albicans* ATCC 645448, obtenida de la *American Type Culture Collection*.



3.1.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados, su composición y aplicación se detallan en la Tabla 2.

TABLA 2 | Medios de cultivos utilizados en el trabajo experimental.

Medio	Componentes	Aplicación
Luria-Bertani (LB)	Triptona 10 g/L (Biokar) Extracto de levadura 5 g/L (Britania) NaCl 10 g/L (Biopack) Para medio sólido: Agar bacteriológico 15 g/L (Sigma)	Crecimiento y mantenimiento de cepas bacterianas. Expresión de proteínas recombinantes.
SOC	Bactotripton 20 g/L Extracto de levaduras 5 g/L NaCl 0,6 g/L KCl 1,86 g/L MgCl2 2,03 g/L MgSO4 1,2g/L Glucosa 3,6 g/L	Crecimiento de células competentes transformadas mediante choque térmico
Caldo de papa glucosado (CPD)	Papa 200 g/L Glucosa 20 g/L Para medio sólido (APG, agar papa glucosado): Agar bacteriológico 15 g/L (Sigma)	Crecimiento de hongos y levaduras.
Sabouraud (Britania)	Peptona 5 g/L Tripteína 5 g/L Glucosa 40 g/L Cloranfenicol 0,05 g/L Para medio sólido: Agar bacteriológico 15 g/L (Sigma)	Crecimiento de levaduras.

3.1.3 Soluciones buffers

Las soluciones buffer empleadas, su composición y aplicación de detallan en la Tabla 3.

TABLA 3 | Soluciones buffer empleadas en el trabajo experimental.

Buffer	Composición	Aplicación
TAE	Tris 40 mM pH 7,6 (Biopack) Ácido acético 20 mM (Cicarelli) EDTA 1mM (Invitrogen).	Preparación de geles de agarosa y como buffer de corrida en las electroforesis de ADN.
TE	Tris-Cl 10 mM pH 7,5 EDTA 1mM	Utilizado para resuspender cebadores.
Buffer de muestra 1X	Azul de bromofenol 0,25% Glicerol 30%	Preparación de muestras de ADN para electroforesis.



TBFI	Cloruro de Rubidio 100 mM (Sigma) Cloruro de Manganeso 50 mM (Sigma) Acetato de Potasio 30 mM (Sigma) Cloruro de Calcio 10 mM (Cicarelli) Glicerol 15% pH 5,8	Preparación de células competentes químicas.
TBFII	MOPS 10 mM (Sigma) Cloruro de Rubidio 10 mM Cloruro de Calcio 75 mM Glicerol 15% pH 6,5	
PBS	Cloruro de sodio 8,0 g/L Cloruro de potasio 0,2 g/L Fosfato ácido de sodio 1,44 g/L Fosfato diácido de potasio 0,24 g/L pH 7,4	Buffer de uso general.

3.1.4 Soluciones de antibiótico

Para la selección de bacterias, la concentración de stock y la concentración a la que se llevaron los antibióticos en el medio de crecimiento (ya sea líquido o sólido) se detalla en la tabla 4.

TABLA 4 | Soluciones de antibiótico empleadas.

Nombre	Stock (mg/mL)	Concentración final para <i>E.Coli</i> (µg/mL)
Ampicilina (Bagó)	200	100
Kanamicina (Sigma)	100	50
Estreptomicina (Sigma)	100	25-100
Cloranfenicol (Sigma)	100	30

3.1.5 Vectores plasmídicos

pGEMTeasy

El vector de clonación pGEM-T Easy (Promega Corporation) se encuentra linealizado y presenta una timina 3' terminal en ambos extremos del sitio de clonación (Figura 12), lo que previene la recircularización del vector y permite la unión con cualquier producto de PCR obtenido utilizando la polimerasa Taq. Esta característica aumenta la eficiencia de ligación de los



productos de PCR al vector. El sitio de inserción en el vector pGEM-T Easy interrumpe el marco de lectura abierto de la enzima β -galactosidasa, por lo tanto, los clones que incorporaron el vector conteniendo el inserto a clonar, pueden ser identificados como colonias blancas resistentes a ampicilina en la placa de crecimiento. Cuando el gen de la enzima β -galactosidasa no es interrumpido, las colonias tienen una coloración azul.

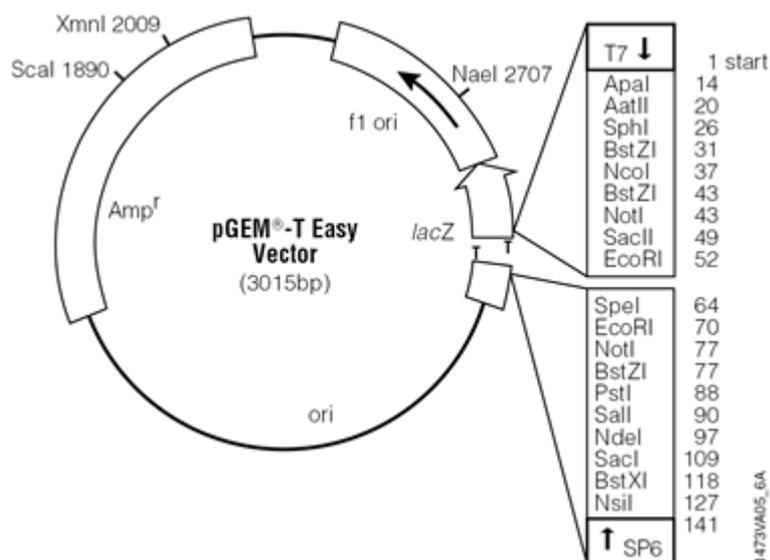


FIGURA 12 | Mapa del vector pGEMT-Easy

pTZ57R/T

Este vector de clonación de 2886 pb (Figura 13) se encuentra linealizado y presenta también timina 3' terminal en ambos extremos del sitio de clonación para uso directo en la clonación de

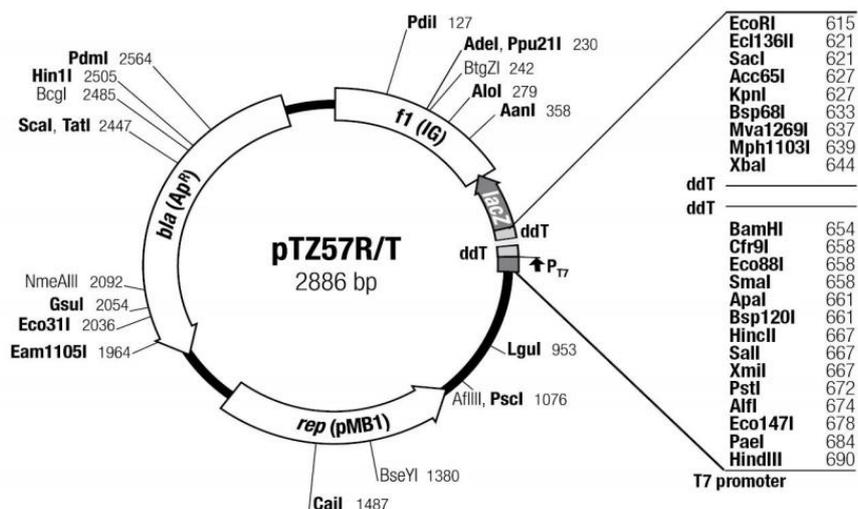


FIGURA 13 | Mapa del vector pTZ57R/T



productos de PCR, generados con Taq, Tth, Tfl u otras ADN polimerasas o mezclas de polimerasas, que añaden adeninas.

3.1.6 Cebadores

La tabla 5 muestra las secuencia, nombre y características de los cebadores empleados en las reacciones de amplificación por PCR.

TABLA 5 | Secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Tm*	Aplicación
A9	TGYGARAARCCGAGCAAAACCTGG	61,0 °C	Amplificación de cDNA
L1F	ATGGCWAAGAGATCRGTTGYTTTC	55,4 °C	
DefD-F	AAATTATGTGAAAGCCAAGC	59,5 °C	
Def3-F	AARATHHTGYGARGAACCAAGC	61,1 °C	
DefL1-F	AARAAAYATHHTGTGAAAAGCCAAGC	62,9 °C	
R0	CCGGAATTCACCTGCAG	50,1 °C	
R0R1Oligo(dT)18	CCGGAATTCACCTGCAGGGTACCCAATACGACTCAC TATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT	67,2 °C	RT-PCR

*La Tm fue calculada a través de la herramienta Oligoanalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron a partir de secuencias altamente conservadas de defensas cuya secuencia se encuentra en base de datos o a partir de los N-terminales de las proteínas nativas determinadas por secuenciación de Edman.

3.1.7 Enzimas recombinantes

- **Transcriptasa reversa M-MuLV RT** (virus de la leucemia murina de Moloney, Fermentas Life Sciences): La transcriptasa reversa M-MuLV RT es una enzima de tipo ADN-polimerasa, que posee como función sintetizar ADN de doble cadena utilizando como molde ARN monocatenario o ADN de cadena simple, es decir, cataliza la retrotranscripción o transcripción inversa. Carece de actividad 3'→5' exonucleasa.

- **ADN polimerasa GoTaq** (Promega): esta enzima posee además actividad transferasa terminal 3'→5' incorporando en los extremos de las secuencias amplificadas nucleótidos de timidina adicionales.



- **T4 DNA Ligasa** (PB-L, Productos Bio-Lógicos): esta enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un grupo 5'-fosforilo y un grupo 3'-hidroxilo adyacente de un dúplex de ADN o ARN o ADN/ARN, ya sea en una configuración de extremos romos o cohesivos. La reacción requiere ATP como cofactor.
- **EcoRI** (Fermentas Life Sciences): enzima de restricción comúnmente empleada en clonado, reconoce la secuencia G[▼]AATTC (sitio de corte indicado con un triángulo), produciendo extremos cohesivos.

3.1.8 Reactivos empleados para la síntesis peptídica

La Tabla 6 muestra los reactivos empleados para la síntesis química de los péptidos.

TABLA 6 | Reactivos empleados en la síntesis peptídica.

Reactivo	Aplicación
Resina Fmoc-Rink Amide AM (Iris Biotech GmbH)	Resina funcionalizada con el grupo protector Fmoc.
DMF (N, N-dimetilformamida)	Solvente orgánico usado en la reacción de síntesis de péptidos en fase sólida.
2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato OxymaPure® (Iris Biotech GmbH)	Aditivo de acoplamiento que minimiza la racemización durante la formación del enlace peptídico.
DIC (Iris Biotech)	Carbodiimida empleada para la activación del grupo carboxilo.
4MP (4-metilpiperidina)	Base débil empleada para efectuar la remoción del grupo protector Fmoc.
TFA (ácido trifluoroacético)	Clivaje del péptido de la resina y remoción de los grupos protectores de las cadenas laterales.
TIS (triisopropilsilano)	Scavenger utilizado como quencher de los carbocationes formados durante la desprotección.
DOT (2,2'-(etilendioxi)dietanolol)	Scavenger utilizado como quencher de los carbocationes formados durante la desprotección. Además, previene la oxidación de las cadenas laterales que contienen azufre.



3.1.9 Herramientas bioinformáticas

3.1.9.1 Herramientas generales

- **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool). Servidor que permite realizar búsquedas de similitud secuencial. encuentra regiones de similitud entre las secuencias locales. El programa compara las secuencias de nucleótidos o de proteína de bases de datos de secuencia y calcula el significado estadístico de los emparejamientos. BLAST puede utilizarse para inferir las relaciones funcionales y evolutivas entre las secuencias, así como a identificar los miembros de las familias génicas. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.
- **ClustalW**: Servidor empleado para realizar alineamientos de proteínas. Disponible en: <http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>.
- **T-coffee**: Servidor utilizado para realizar alineamientos múltiples. Disponible en: <http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>.
- **Plant CARE** (Plant *Cis* Acting Regulatory Elements). Es una base de datos de elementos *cis*-reguladores de plantas y un posee herramientas para el análisis *in silico* de secuencias promotoras. Disponible en: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>.
- **ProDom** (Protein Domain Database) (<http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/form.php>). Base de datos de dominio de familias de proteínas generados a partir de la comparación global de todas las secuencias de proteínas disponibles (Kahn, Rezvoy, & Vivien, 2008). Disponible en <http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/form.php>.
- **Pfam** (Protein Families Database). Base de datos de familias de proteínas, cada una representada por alineamientos múltiples de secuencias y modelos HMMs (hidden Markov models) cubriendo dominios proteicos y familias comunes (Finn et al., 2014). Disponible en: <http://pfam.xfam.org>.
- **iHyd-PseAAC**. Servidor que permite predecir sitios de hidroxilación de prolina y lisina en las proteínas. Disponible en: <http://app.aporc.org/iHyd-PseAAC/>



3.1.9.2 Herramientas empleadas para el modelado molecular por homología de las defensinas de *S. marianum*

- **HHPred**: Servidor utilizado para realizar la asignación de plegamiento (*fold assignment*). Permite la detección de proteínas homólogas remotas y la predicción estructural a partir de una secuencia problema empleando un método de comparación HMM-HMM (Söding et al. 2005).

Disponible en: <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>.

- **Gene Doc Multiple Sequence Alignment Editor and Shading Utility** (versión 2.7.000): Este programa fue utilizado para analizar y editar alineamientos.

- **MODELLER**, versión 9.24: Modelado por homología o comparativo de proteínas, utilizado para modelar una proteína cuya estructura molecular no es conocida empleando como molde una proteína homóloga cuya estructura ya ha sido resuelta (Šali & L. 1993). Realiza el modelado por satisfacción de restricciones espaciales/estructurales siendo el mejor modelo calculado aquel que viola el menor número de restricciones estructurales (teniendo en cuenta distancias de enlace, ángulos de torsión: psi phi, etc.).

- **ProSA-web**: Servidor *on line* que permite la evaluación energética de modelos tridimensionales de proteínas (Wiederstein & Sippl 2007). Disponible en: <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>.

- **PROCHECK**: Programa empleado para evaluar la calidad estructural del modelo tridimensional (Laskowski et al. 1993).

- **ProFunc**: Servidor que permite la identificación de la función bioquímica más probable de una proteína a partir de su estructura tridimensional a través de métodos de análisis de tipo secuenciales y estructurales. Combina una serie de métodos de predicción de función proteica y proporciona una presentación simplificada de los resultados, devueltos en un formato fácil de interpretar. ProFunc realiza una evaluación general de los términos funcionales más comunes, empleando los términos GO (Gene Ontology), estos términos permiten caracterizar proteínas en base a tres aspectos: proceso biológico en el que participan (*biological process*), componente



celular donde se localiza (*cellular component*) y función bioquímica (*biochemical function*). Aquellos términos que posean un *score* mayor a 10 son los que se consideran significativos y que poseen más probabilidades de ser correctos (Laskowski et al., 2005). Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/profunc/>.

- **APBS-PDB2PQR**: Es un software que permite resolver el cálculo de potencial electrostático de Poisson-Boltzmann de superficie. Disponible en: <https://server.poissonboltzmann.org/>.

- **PyMOL**, versión 2.2.3 (Delano Scientific LLC): Es una herramienta de visualización molecular de código abierto.

3.1.9.3 Herramientas empleadas para el análisis filogenético

- **HyPhy**. Es un paquete de software de código abierto para el análisis de secuencias genéticas que utilizan técnicas de filogenia y evolución molecular. Cuenta con una completa interfaz gráfica de usuario y un lenguaje de programación rico para la personalización ilimitada de análisis. (Kosakovsky Pond, Frost, & Muse, 2005).

- **PhyML**. Software que permite estimar grandes filogenias en forma precisa, rápida y sencilla, usando el método de máxima verosimilitud a partir de secuencias de ADN y proteínas. (Guindon et al., 2010). Disponible en: <http://atgc.lirmm.fr/phyml>.

3.1.9.4 Herramientas empleadas para el diseño y caracterización de péptidos

- **C-PAMP** (<http://bioserver-2.bioacademy.gr/Bioserver/C-PAMP/>): Es una base de datos de péptidos antimicrobianos de plantas predichos computacionalmente. Contiene las secuencias de un total de 15174905 péptidos, con una longitud de secuencia de entre 5-100 aminoácidos, derivados de 33877 proteínas de 2112 especies de plantas disponibles en UniProtKB/Swiss-Prot. Su interfaz web permite consultas basadas en la secuencia de péptidos/proteínas, el número de acceso de proteínas y la especie. El software produce una lista de péptidos predichos a partir de las secuencias de las distintas proteínas junto con su *score*.



- **PeptideCalculator** (BACHEM): es una herramienta útil para realizar cálculos de peso molecular de péptidos, así como distintos parámetros tales como hidrofobicidad, carga neta a diferentes pH, punto isoeléctrico y relación de hidrofilia, entre otros. Disponible en:

<https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>

- **PepCalc** (Innovagen): permite realizar cálculos y estimaciones sobre distintas propiedades fisicoquímicas de péptidos. Disponible en: <https://pepcalc.com/>

3.2 Metodologías

3.2.1 Clonación de defensinas de flores de *Silybum marianum*

3.2.1.1 Extracción de ARN total de flores

Se realizó la extracción total de ARN empleando como material vegetal flores inmaduras de *S. marianum*, cosechadas en primavera-verano en la ciudad de La Plata. El material se molió en un mortero agregando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. De este polvo se tomaron aproximadamente 100 mg y se realizó la extracción de ARN empleando un kit comercial específico para vegetales (RNeasy® Plant Mini Kit de QIAGEN, Hilden Germany).

El ARN eluido de las microcolumnas con membranas de sílice se cuantificó por absorbancia a 260 nm y su integridad se evaluó en gel de agarosa 1% (p/v).

3.2.1.2 Determinación de la concentración y pureza del ARN total

La cuantificación y estimación de la pureza del ARN total y el ADN de las distintas muestras utilizadas fue realizada a través de medidas espectrofotométricas (UV-visible Agilent 8453E, Agilent Technologies Inc., o NanoDrop, NanoDrop™, Thermo Scientific). Para ello se midió la absorbancia a 260 y 280 nm y en función de los valores obtenidos se calculó la concentración de ARN y ADN mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Concentración de ARN/ADNsc} \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right) = \text{Abs}_{260} \times \text{Dilución} \times \frac{40 \mu\text{g ARN/ADNsc}}{1 \text{ unidad de OD}_{260}}$$



$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Abs}_{260} \times \text{Dilución} \times \frac{50 \mu\text{g ADNdc}}{1 \text{ unidad de OD}_{260}}$$

Donde ADNsc es ADN de simple cadena y ADN dc es ADN de doble cadena.

Para la determinación de la pureza se calculó la relación Abs260/Abs280. Para el caso del ADN, se consideró que una relación óptima se encuentra entre 1,7-2. Una relación inferior a 1,7 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos tales como fenoles o proteínas, mientras que una relación mayor a 2 podría corresponderse con la presencia de ARN en la muestra. Para el ARN, un valor de pureza óptima se corresponde con una relación cercana a 2, mientras que si es mayor a 1,7 es aceptable. De ser inferior a 1,7 podría indicar contaminación por presencia de compuestos aromáticos.

3.2.1.3 Síntesis de ADN complementario

El ADNc se sintetizó a partir del ARN total obtenido a partir de las inflorescencias de *S. marianum*, por medio de la transcripción reversa (RT) con la enzima M-MuLV RT (Fermentas) y el primer R₀R₁Oligo(dT)18. El control de la síntesis de ADNc se llevó a cabo con cebadores para genes constitutivos de actina. Diferentes cantidades del ADNc obtenido fueron empleados como molde en ensayos de PCR. La RT se realizó en dos etapas. En la primera (tabla 7), la mezcla de reacción se sometió a un ciclo de desnaturalización a 55-60 °C por 10 min en un termociclador (Techne, Ramsey, MN, EEUU), transcurrido este tiempo el tubo conteniendo la mezcla se puso en hielo para evitar su re-naturalización y se continuó con la Etapa 2 que consistió en agregar los reactivos enumerados en la Tabla 7 (Etapa 2).

TABLA 7 | Composición de la mezcla de reacción de la RT.

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Etapa 1			
ARN molde	2,3 μg/μl*		2
Primer R ₀ R ₁ Oligo(Dt)18	100 mM		2
Agua estéril	-	-	c.s.p. 11

Etapa 2			
Buffer RT 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8,3 a 25°C, KCl 220 mM y MgCl ₂ 20mM, DTT 50 mM).	5X	1X	4
Mezcla de dNTPs [10mM de cada uno, adeninatrifosfato (dATP), citosina trifosfato (dCTP), guanidinatrifosfato (dGTP), y timina trifosfato (dTTP) con NaOH 10 mM, pH 7,0 (Fermentas Life Sciences)]	2	1 mM	2
Inhibidor RiboLock™ RNase Inhibitor (ThermoScientific Inc.)	20 U	0,5 U	0,5
Agua estéril	-	-	1,5

*Dicha concentración de ARN molde correspondía al ARN de DefSm1, mientras que para el ARN molde correspondiente a DefSm2 fue de 2,2 µg/µl.

La mezcla se sometió a un ciclo de calentamiento a 37 °C durante 5 min. Luego de lo cual se adicionó 1,0 µl de Transcriptasa reversa M-MuLV RT (virus de la leucemia murina de Moloney, *Fermentas Life Sciences*). Esta mezcla se sometió a un ciclo de síntesis del ADNc a 42 °C por 60 min y a un ciclo final de desnaturalización de la enzima a 70 °C por 10 min en el termociclador. El ADNc se almacenó a -20 °C.

3.2.1.4 Amplificación por PCR

La amplificación de regiones determinadas de ADNc se llevó a cabo mediante la técnica de PCR bajo condiciones estándar (Mullis, 1990) en termociclador (Techne). La mezcla de reacción que se utilizó para la amplificación se describe en la Tabla 8.

TABLA 8 | Composición de la mezcla de reacción de la PCR para la amplificación de las secuencias codificantes de defensinas a partir de ADNc.

Componente	Volumen (µL)
Agua	13,84
Buffer 5X	4
dNTPs (10 mM)	0,4



Primer <i>forward</i> (10 μ M)	0,4
Primer <i>reverse</i> R ₀ (25 μ M)	0,16
ADNc	1
Taq polimerasa	0,2

Se emplearon para la amplificación del ADNc los cebadores *forward* detallados en la tabla 5. La reacción de PCR para la amplificación de las defensinas se realizó con el programa de termociclado que se detalla en la Tabla 9.

TABLA 9 | Programa de termociclado para la amplificación de ADN por PCR.

Paso	Etapas	N° ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Desnaturalización inicial	1	94	5
2	Desnaturalización	30	94	0,5
	Hibridación		52	0,5
	Extensión		72	0,5
3	Extensión final	1	94	5
4	Mantenimiento	1	10	10

Después de la amplificación, los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% (p/v).

3.2.1.5 Ligación

Los productos de amplificación por PCR se purificaron a partir del gel de agarosa con el kit comercial GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific), se cuantificó la concentración de ADN empleando un ladder de masas (PB-L Productos Bio-Lógicos) y se ligaron al vector pGEM-Teasy (Promega) empleando la enzima T4 DNA ligasa (PB-L Productos Bio-Lógicos), según el protocolo detallado en la tabla 10. La mezcla de reacción se incubó overnight (ON) a 16 °C y luego se procedió a transformar la cepa *E. coli* XL1-blue. Finalmente, se purificaron los plásmidos provenientes de colonias positivas seleccionadas al azar.



TABLA 10 | Composición de la mezcla de reacción de ligación.

Componente	Volumen (µL)
10x T4 ADN Ligasa Buffer	1
pGEM-Teasy (50 ng)	1,3
Inserto	6,5
T4 ADN Ligasa (Promega, 3 U/µl)	0,5
Agua estéril	c.s.p 10 µL

De esta forma se obtuvieron las construcciones denominadas: pGEM-DefSm1 y pGEM-DefSm2.

3.2.1.6 Digestión enzimática de ADN

La digestión de ADN se llevó a cabo con endonucleasas de restricción que reconocen secuencias nucleotídicas específicas. Se realizó un análisis de restricción con NotI y EcoRI, sometiendo a la digestión con estas enzimas a aquellos plásmidos sobre los que se pretendía deducir la presencia/ausencia de una determinada secuencia mediante la escisión del fragmento de interés o por generación del perfil de bandas electroforéticas resultante (análisis de restricción). La digestión de plásmidos aislados como minipreparaciones de ADN (sección 2.2.1.12) con una o más enzimas de restricción fue llevada a cabo durante 3-4 hs a 37 °C y finalizado este tiempo se procedió a la inactivación enzimática incubando a 65 °C por 20 minutos. La mezcla de reacción se detalla en la Tabla 11. Se utilizaron los buffers recomendados por el proveedor de cada una de las endonucleasas empleadas.

TABLA 11 | Composición de la mezcla de reacción utilizada en la digestión de ADN plasmídico empleando enzimas de restricción.

Componente	Volumen (µL)
Buffer compatible con la enzima (10X)	2
Enzima de restricción	1
ADN plasmídico	3
Agua	c.s.p 20

Transcurrido el tiempo de reacción, el perfil de bandas generado, así como el grado de digestión del ADN fueron analizados en un gel de agarosa 1% (p/v).



3.2.1.7 Crecimiento y mantenimiento de cepas bacterianas

El crecimiento de las distintas cepas bacterianas se realizó en medio LB líquido a 37 °C con agitación a 250 rpm en un incubador orbital. Para la selección y mantenimiento de la presión selectiva de clones recombinantes se añadieron diferentes antibióticos. La concentración a la que se llevaron los antibióticos en el medio de crecimiento ya sea líquido o sólido se detalla en la tabla 4.

Para el repique en medio líquido se tomaron tubos de 15 mL estériles. Se colocaron 5 mL de medio con el antibiótico de selección correspondiente. Se picaron tres o cuatro colonias de cada placa y se colocaron en sendos tubos con el rótulo correspondiente. Se incubaron en agitador orbital a 37 °C y 250-280 rpm.

El mantenimiento de las distintas cepas bacterianas y clones recombinantes se realizó en medio LB, en presencia de glicerol 15%, manteniéndose a -70 °C.

3.2.1.8 Obtención de células competentes químicas

3.2.1.8.1 Método de cloruro de calcio

Para la preparación de bacterias competentes se partió de un stock glicerolado, se realizaron estrías en una placa LB sin antibiótico. Se dejó crecer a 37 °C ON. Se repicaron dos colonias en tubos Falcon con 5 ml de LB. Se dejó crecer durante toda la noche a 37 °C y con agitación (250-280 rpm). Se tomaron 500 µl del cultivo saturado y se realizó una dilución de este 1:200 en medio LB fresco en un Erlenmeyer. Se incubó a 37 °C con agitación durante dos horas aproximadamente hasta alcanzar una DO (600nm) de 0,6. Se dejó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 3000 × g por 5 minutos y 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 25 ml de CaCl₂ 0,05 M (estéril y enfriado a 4 °C). Se homogeneizó usando vortex y se dejó reposar 10 minutos en baño de hielo. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se resuspendió en 5 ml de CaCl₂. Se agregaron 0,8 ml de glicerol y se homogeneizó usando vortex.



Finalmente se fraccionó de a 100 μ l en eppendorfs estériles y se almacenó inmediatamente a -80 °C.

3.2.1.8.2 Método de cloruro de rubidio

Para la preparación de bacterias competentes se partió de un stock glicerolado, se realizaron estrías en una placa LB sin antibiótico. Se dejó crecer a 37 °C ON. Se repicó una colonia en tubo Falcon con 5 ml de LB. Se dejó crecer durante toda la noche a 37 °C y con agitación (250-280 rpm). Se tomaron 250 μ l del cultivo saturado y se realizó una dilución del mismo 1:100 en medio LB fresco en un Erlenmeyer. Se incubó a 37 °C con agitación durante dos horas aproximadamente hasta alcanzar una DO (600nm) de 0,4-0,6. Se dejó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 3000 \times g por 10 minutos y 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se lavó suavemente el precipitado con una pequeña alícuota de buffer TBFI para eliminar trazas del medio y se resuspendió el precipitado en 10 ml de buffer TBFI. Se incubó en hielo por 5 minutos y se centrifugó a 3000 \times g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de buffer TBFI y se incubó en hielo durante 60 minutos. Finalmente se fraccionó de a 50 μ l en eppendorfs estériles y se almacenó inmediatamente a -80 °C. Este método resultó ser más eficiente que el de cloruro de calcio, y fue utilizado en aquellos casos en que no se obtuvieron transformantes.

3.2.1.9 Transformación por shock térmico

Para realizar la transformación por shock térmico se descongelaron las cepas a utilizar lentamente en baño de hielo, se adicionaron 25 ng de DNA (o 1 μ l de plásmido obtenido por minipreparación) a 100 o 50 μ l de bacterias competentes. Se adicionó 1 μ l de DMSO y se dejó en hielo por 30 minutos. Luego se realizó un shock térmico durante 45 segundos a 42 °C y rápidamente se pasó al baño de hielo por 5 minutos más. A la mezcla de bacterias con el plásmido se le adicionó 250 μ l de LB o SOC fresco a temperatura ambiente (sin antibióticos) y se incubó a 37 °C con agitación durante dos horas a 220-250 rpm. Luego fue volcado sobre una



placa Agar-LB/SOC suplementado con el antibiótico de selección correspondiente y plaqueado con espátula de Drigalsky. Luego de incubar toda la noche a 37 °C se pudieron obtener las colonias transformadas.

3.2.1.10 Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de ADN plasmídico, productos de digestión enzimática y los fragmentos de amplificación de PCR fueron analizados en geles de agarosa en un rango entre 1% y 2% p/v, según los tamaños de los fragmentos a separar, siendo mayor el porcentaje cuanto más chico es el fragmento, tal como muestra la tabla 12. La agarosa se disolvió en buffer TAE 1X. Se mezclaron 5,0 µl de la muestra de ADN con 5 µl de colorante GelRed™ 10.000 X (Genbiotech). La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante (80 V) durante 30-60 minutos con buffer TAE a en un sistema Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad). Los ácidos nucleicos se observaron en un transiluminador (Vilber Lourmat) con luz ultravioleta a 260 nm.

TABLA 12 | Porcentaje de agarosa recomendado según los tamaños a separar.

Porcentaje (%p/v) agarosa	Rango de tamaños (kb)
0,5	1 – 30
0,7	0,8 – 12
1	0,5 – 10
1,2	0,4 – 7
1,5	0,2 – 3
2	0,05 – 2

3.2.1.11 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Para la purificación de los fragmentos amplificados por PCR se utilizó el kit de purificación GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) procediendo según lo recomendado por el fabricante. Se cortaron las bandas del gel de agarosa que poseían los fragmentos relevantes de ADN y se colocaron en un tubo de 1,5 ml adicionando posteriormente el volumen correspondiente de buffer de unión. Las muestras se incubaron a 55 °C durante 10 o 15 minutos y luego transfirieron a las columnas de purificación donde fueron sometidas a sucesivos pasos



de lavado. Finalmente, el ADN fue eluído de la columna con agua bidestilada estéril y recuperado en un tubo de 1,5 ml estéril. Las muestras de DNA recuperadas fueron, en todos los casos, almacenadas a -20 °C.

3.2.1.12 Purificación de ADN plasmídico

El aislamiento de ADN plasmídico en forma de minipreparaciones con elevado grado de pureza y calidad para los procedimientos de biología molecular, se realizó mediante el método de lisis alcalina con unión a sílica o el uso del kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific).

3.2.1.12.1 Método de lisis alcalina con unión a sílica

Luego de la centrifugación del cultivo se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 200 µl de una solución 50mM Tris, 10 mM EDTA y pH 8,0. Se agitó con vortex y se añadió 200 µl de una mezcla de 0,2 M de NaOH y SDS 1% (preparada en el momento), se mezcló suavemente por inversión y se agregaron 200 µl de solución de KAc 3 M con pH 5,5. Se mezcló nuevamente por inversión y se centrifugó durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se procedió con la unión del ADN a la sílica. Para esto se agregaron 10 µl de suspensión de sílica y se mezcló. Se sedimentó la sílica por centrifugación, 10 segundos a 9000 × g en microcentrífuga. Se descartó el sobrenadante y se procedió a realizar tres lavados con 300 µl de una solución 50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 2,5 mM EDTA y 50% Etanol. Luego de los lavados, se centrifugó a 9000 × g por 10 segundos para remover el líquido residual y se secó al aire para eliminar el etanol residual. Se resuspendió la sílica en 40 µl de agua mili Q, se mezcló con vortex y se calentó por 5 minutos a 65 °C. Finalmente, se centrifugó por 2 minutos a 9000 × g y se tomó el sobrenadante conteniendo en ADN.

3.2.1.12.2 Kit comercial



El kit comercial utilizado, GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), combina la liberación del ADN plasmídico por el método de lisis alcalina, con la unión selectiva del mismo a columnas de fibra de vidrio en las condiciones usadas en el procedimiento. Para la obtención de las minipreparaciones se partió de un cultivo bacteriano proveniente de una única colonia de transformada siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.1.13 Secuenciación y análisis de datos

Las reacciones de secuenciación fueron preparadas en un volumen final de 10 μL (incluyendo 50 ng/ μL para producto de PCR o 100 ng/ μL para plásmidos). Fueron remitidas al servicio de secuenciación de Macrogen Inc. (Seul, Corea del Sur) o al servicio de secuenciación de ADN del INTA-Castelar. Para el análisis de los cromatogramas y el procesamiento de las distintas secuencias se utilizaron a las herramientas DNASTart y BioEdit. El análisis de las secuencias se realizó mediante programas de búsqueda en bases de datos como HHPred o BLASTn.

3.2.2 Estudio bioinformático

3.2.2.1 Modelado molecular por homología de los dominios defensina

El modelo tridimensional del dominio defensina se obtuvo a partir de un método de modelado por homología. Los métodos incluidos dentro de esta categoría se basan en el hecho de que aquellas proteínas con un origen común (homólogas) tienden a plegarse en forma similar. Por lo tanto, empleando una proteína homóloga con estructura conocida (molde o *template*) es posible construir modelos tridimensionales utilizando esa información estructural.

Para obtener el modelo tridimensional del dominio defensina, en primer lugar, se realizó la asignación de plegamiento o *fold assignment* que permite encontrar la proteína homóloga (ya cristalizada) más adecuada para emplear como molde. El *fold assignment* se llevó a cabo empleando el servidor HHPred (Söding et al. 2005) que permite la detección de proteínas homólogas remotas y la predicción estructural a partir de una secuencia problema empleando



un método de comparación HMM-HMM. Luego se realizó el alineamiento entre la secuencia del dominio defensina y el molde con el servidor ClustalW (EMBnet) y se editó con el programa GeneDoc Multiple Sequence Alignment Editor and Shading Utility. Este alineamiento, junto con el archivo PDB de la proteína elegida como molde, así como también el script correspondiente, fueron los archivos que se utilizaron como *input* para ejecutar el cálculo con el programa Modeller, versión 9.14 (Šali & L. 1993). Este programa constituye un método de modelado comparativo diseñado para encontrar la estructura más probable de una secuencia determinada, en función de su alineamiento con una proteína homóloga con estructura conocida. El modelo tridimensional se obtiene por satisfacción de restricciones espaciales. El programa toma las distancias entre residuos a partir del template, que se complementan con datos estereoquímicos, distancias de enlaces, ángulos dihedros, distancias de interacciones débiles, etc. y todos esos datos se combinan para dar una función objetivo (*objective function*). El modelado consiste en optimizar esta *objective function*. El mejor modelo es aquel que viola el menor número de restricciones espaciales y será el que posea el menor valor de *objective function*.

3.2.2.1.1 Evaluación y validación de los modelos obtenidos

La calidad del modelo estructural obtenido fue evaluada a través de dos tipos de criterios: energéticos y estructurales/geométricos.

La evaluación energética del modelo se llevó a cabo empleando el servidor ProSA-web (Wiederstein & Sippl, 2007), que permitió realizar un análisis global y local. En el caso del análisis global, se comparó la energía del modelo obtenido con la de todas las proteínas ya cristalizadas (a través del parámetro denominado *Z-score*); mientras que el análisis local permitió evaluar la energía para cada residuo del modelo de la proteína en cuestión. En el caso de tratarse de un buen modelo, deben esperarse valores de energía negativos. También se usó como criterio energético el potencial estadístico DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) llevado a cabo a

través del programa Modeller, que es similar a la evaluación local mencionada previamente, ya que permite analizar la energía de cada residuo, siendo un modelo de buena calidad aquel que presenta la mayor cantidad de residuos con un *DOPE score* menor a cero.

La evaluación estructural/geométrica, se realizó a través del programa PROCHECK (R. a. Laskowski et al., 1993). Este programa permitió construir el denominado diagrama de Ramachandran que permite visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos diédricos Ψ (psi) contra Φ (phi) en los aminoácidos de un polipéptido, que contribuyen a la conformación de la estructura de las proteínas. Sobre este diagrama, el programa PROCHECK ubica a los residuos de la proteína modelada que estarán en distintas regiones dependiendo la calidad estereoquímica del modelo. La cadena polipeptídica puede ser entendida como una sucesión de planos conectados por los vértices, relacionados a través de las torsiones phi y psi. Los pares Φ/Ψ adoptan sólo valores característicos que definen los diferentes tipos de estructura secundaria: alfa, beta y otras. No pueden adoptar cualquier valor debido al impedimento estérico que involucra la cadena principal y las cadenas laterales.

3.2.2.2 Predicción funcional

El modelo tridimensional obtenido fue cargado en el servidor ProFunc, que permite realizar predicciones en relación con la función de la proteína introducida como *input* en base a métodos de análisis de tipo secuenciales y estructurales. Este servidor combina una serie de métodos de predicción de función proteica y proporciona una presentación simplificada de los resultados, devueltos en un formato fácil de interpretar. ProFunc realiza una evaluación general de los términos funcionales más comunes, empleando los términos GO (*Gene Ontology*), que son términos que permiten caracterizar proteínas en base a tres aspectos: proceso biológico en el que participan (*biological process*), componente celular donde se localiza (*cellular component*) y función molecular (*molecular function*).



Luego de cargar el modelo estructural en formato PDB al servidor, el mismo proporciona una página de resumen general que ilustra los resultados de los distintos métodos utilizados. En la parte superior de la página aparecen los términos GO, que proveen un panorama general de los términos más comunes resultantes de la búsqueda. Aquellos términos que posean un *score* mayor a 10 son los que se consideran significativos y que poseen más probabilidades de ser correctos (Laskowski et al. 2005).

3.2.2.3 Cálculo del potencial de superficie electrostático

Para el cálculo del potencial electrostático de Poisson-Boltzmann de los modelos estructurales construidos para los dominios defensina, se empleó el *software* APBS-PDB2PQR (Jurrus et al., 2018) utilizando el campo de fuerza PARSE y se visualizaron los resultados en PyMOL.

3.2.2.4 Análisis filogenético

Se realizó la estimación filogenética empleando el programa PHYML (Guindon et al., 2010), que hace uso del método de reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud. Esta estimación se realizó usando un modelo de evolución de proteínas WAG con una distribución gamma discreta, basado en el intercambio de aminoácidos estimado a partir de matrices de bases de datos de las alineaciones de proteínas, que incorporan una frecuencia promedio de aminoácidos.

Se emplearon secuencias de defensinas vegetales extraídas de la base de datos NCBI y fueron alineadas a través del programa de alineamientos múltiples T-coffee. Previo a la realización de la inferencia filogenética se determinó a través del programa HyPhy (Kosakovsky Pond, Frost, & Muse, 2005) el modelo que mejor se ajustaba a los datos. Este algoritmo permite estimar grandes filogenias en forma precisa, rápida y sencilla.

La robustez de los resultados fue determinada a partir de un *bootstrap* no paramétrico, que nos informa acerca de la estabilidad de las relaciones filogenética del árbol obtenido. El



bootstrapping no paramétrico es una técnica estadística de remuestreo con reemplazamiento. En este análisis el soporte de *bootstrap* para cada una de las ramas del árbol fue obtenido usando 500 réplicas, de este modo se supone que una rama es significativa si el valor del *bootstrap* del nodo es mayor al 50% (Holmes, 2003).

3.2.2.5 Diseño de péptidos potencialmente antifúngicos a partir de las secuencias de las defensinas de *S. marianum*

A partir de las secuencias de las defensinas clonadas, se diseñaron en forma racional potenciales péptidos antimicrobianos con el fin de identificar motivos antifúngicos putativos. Para ello, se tuvieron en cuenta los alineamientos de secuencia múltiple de DefSm1D y DefSm2D con defensinas de las que se ha reportado la presencia de regiones esenciales para la actividad antimicrobiana, así como la ubicación de estas regiones en los modelos tridimensionales obtenidos previamente a partir de las proteínas clonadas. También se tuvieron en cuenta aquellos péptidos generados a través de la base de datos C-PAMP (Niarchou et al., 2013) a partir de secuencias de defensinas homólogas a DefSm1D y DefSm2D disponibles, como lo son Art v 1 de *Artemisia vulgaris*, AhAMP1 de *Aesculus hippocastanum* y DmAMP1 de *Dahlia merckii* (cuyo γ -core es idéntico al de DefSm2D), así como también los residuos importantes para la actividad antifúngica que ya han sido estudiados para Art v 1 y AhAMP1 (Cools, Struyfs, et al., 2017; Karin Thevissen et al., 2003). Esta base de datos permite la construcción de péptidos antimicrobianos pronosticados computacionalmente con alto puntaje o *score* para todas las especies de plantas disponibles en bases de datos. Los resultados obtenidos por ambos procedimientos se consideraron para el diseño final de los péptidos.

3.2.2.6 Diseño de péptidos modificados

Se diseñaron péptidos modificados respecto a los del punto 3.2.2.5, realizando modificaciones en residuos que podrían alterar la actividad antimicrobiana o, en el caso de péptidos con más

de una cisteína, considerando el diseño de péptidos cíclicos con enlaces disulfuro intramoleculares para promover el plegamiento en estructuras tipo *loop* u horquillas- β , lo cual podría conferirles mayor estabilidad impidiendo su degradación (Garrigues et al., 2017).

3.2.3 Síntesis química en fase sólida, purificación, caracterización y actividad biológica de péptidos derivados de las secuencias de las defensas clonadas

3.2.3.1 Síntesis automática de péptidos en fase sólida Fmoc

Los péptidos se sintetizaron usando un sintetizador de péptidos de microondas automatizado Liberty Blue™ (CEM Corp., Figura 14) siguiendo un protocolo estándar de 9-fluorenil metoxicarbonilo / terc-butilo (Fmoc/tBu).



FIGURA 14 | Sintetizador automático de péptidos por microondas.

Se utilizó la resina Fmoc-Rink Amide 0,74 mmol/g como soporte sólido para la síntesis. Los acoplamientos de aminoácidos se llevaron a cabo en DMF usando activación de DIC/OxymaPure y el aminoácido correspondiente. La remoción del grupo protector Fmoc se realizó con 4MP al 20% v/v en DMF. El clivaje de los péptidos de la resina se realizó con una mezcla de TFA/TIS/DOT/agua ultrapura (95/2,5/2,5/2,5) con agitación suave durante un período de 3 h a temperatura ambiente. Después de la filtración, los péptidos se precipitaron mediante la adición



de éter dietílico frío, se centrifugaron, se lavaron cinco veces con éter dietílico frío y se secaron. Se disolvieron diez miligramos de cada péptido crudo en 1 ml de agua miliQ para la purificación.

3.2.3.2 Síntesis de péptidos cíclicos por formación de puentes disulfuro intramolecular

La técnica de formación de un puente disulfuro intramolecular da lugar a una estructura cíclica a través de una reacción que se produce entre dos cisteínas protegidas por el grupo Acm (acetometilo) que se encuentran lejanas una de la otra mientras el péptido se encuentra adherido a la resina de síntesis, utilizando como agente oxidante $Tl(CF_3CO_2)_3$ [trifluoroacetato de talio (III)] como muestra la Figura 15.

Se realizó la síntesis de péptidos en fase sólida como se detalló previamente empleando residuos de cisteína protegidas por el grupo protector Acm. Luego de la síntesis y antes de realizar el clivaje se adicionó a la resina 2 excesos de trifluoroacetato de talio (III) (2 equivalentes

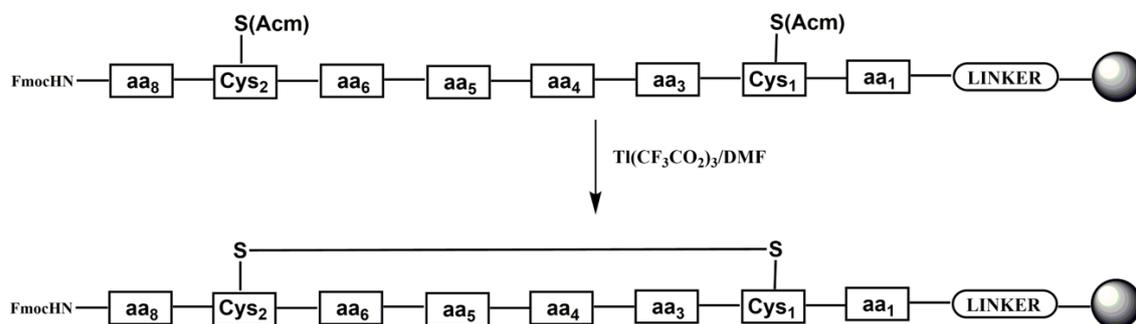


FIGURA 15 | Formación de un puente disulfuro intramolecular entre dos cisteínas de un péptido hipotético de 8 residuos aminoacídicos.

relativos al peso y sustitución de la resina) disuelto en 1 ml de DMF y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Luego de la reacción, se lavó 3 veces con DMF (2 minutos por lavado) y 2 veces con diclorometano (1 minuto por lavado). Se desprotegió seguidamente el grupo protector N-amino Fmoc con 20% piperidina/DMF/tritón X-100. Se secó la resina y se procedió a realizar el clivaje de la resina (como se describió en la sección 2.2.3.1).

3.2.3.3 Purificación de los péptidos

3.2.3.3.1 Cromatografía en fase reversa C18

Para la purificación de los péptidos se emplearon columnas Clean-Up® CEC18153 (United Chemical Technologies) con una fase sólida de C-18. Se activó la columna con 2 ml de metanol con un flujo de 1mL/min, y se lavó con 2 mL de agua MiliQ para eliminar cualquier impureza. Se pasó luego la muestra, al mismo flujo que se realizó la activación con metanol. El volumen recogido de la carga de la muestra volvió a pasarse dos veces por la columna, para asegurar la retención de la muestra en la misma. Para la elución de la muestra se trabajó con soluciones de distintos porcentajes de acetonitrilo [10, 15, 20, 25, 30 y 60% (v/v)]. De cada porcentaje se pasaron por la columna 3 ml, y las fracciones eluidas fueron recogidas en tubos eppendorf de 1,5 ml, comenzando en forma ascendente con relación al porcentaje de acetonitrilo. Al término de cada una de las eluciones se realizó la evaporación del solvente por centrifugación en el equipo concentrador SpeedVac concentrador (Savant SPD1010, Thermo Fisher Scientific) para eliminar todo el acetonitrilo. Finalmente, luego de la evaporación completa del acetonitrilo, se resuspendió la muestra en 500 µl de agua MQ, y fueron congelados a -80 °C para su posterior liofilización. Los péptidos se almacenaron como polvos secos y se disolvieron en agua estéril justo antes de su uso.

3.2.3.3.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (HPLC-FR)

A fin de determinar las principales fracciones que contienen el péptido esperado se realizó un análisis por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-FR) empleando una columna XBridge™ BEH C18 (Waters Corporation, Milford, MA, Estados Unidos). Se utilizó un gradiente de acetonitrilo en agua del 0-70% con 0,05 % de TFA en agua como disolvente A y acetonitrilo con 0,05% de TFA como disolvente B, a un caudal de 1 mL/min durante 8 min.

3.2.3.4 Espectrometría de masas (ESI-MS)

La masa molecular de cada péptido se determinó mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) utilizando un equipo Shimadzu LCMS-2020 (Shimadzu Corporation) acoplado al equipo de HPLC anteriormente descrito. Se empleó un gradiente de acetonitrilo de 0 a 100% durante 20 min.

3.2.3.5 Dicroísmo Circular

Para determinar la estructura secundaria de los péptidos, se realizaron las medidas espectroscópicas en el rango de longitud de onda de 180-250 nm. Los péptidos se disolvieron en agua o en una mezcla de trifluoroetanol (TFE):H₂O 25:75 (%v/v) con una concentración de aproximadamente 0,25 mg/ml. Se colocaron en una cubeta de cuarzo de 1 mm de longitud de paso a 25 °C, y se realizaron las medidas en un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco, Inc.) a una velocidad de exploración de 20 nm/min y una constante de tiempo de 1 segundo. Cada espectro en los gráficos resulta del promedio de tres medidas sucesivas, después de aplicar un algoritmo estándar para suavizar el espectro. Se midió el espectro del solvente de manera similar y luego se restó al de los péptidos. Los datos de elipticidad (mdeg) se convirtieron en elipticidad molar, expresada en grados cm²dmol⁻¹.

3.2.3.6 Derivatización de péptidos con sondas fluorescentes

Una vez finalizada la síntesis y previo al proceso de clivaje y desprotección de grupos laterales, se derivatizaron los péptidos con la sonda fluorescente Fluoresceína. Luego de la desprotección del último aminoácido acoplado a la peptidil-resina se incorporó la sonda correspondiente. El acoplamiento se realizó en dos etapas, la primera empleando HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) en presencia de oxima (OxymaPure®) y DIEA (N,N'-diisopropiletilamina) durante 3 h a 135 rpm y 25 °C, y la segunda con TBTU (tetrafluoroborato de 2-[(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio]), en presencia de oxima

y DIEA durante 4 días en las mismas condiciones de temperatura y agitación. Los reactivos de acoplamiento y las sondas se emplearon con un exceso de tres veces respecto a la funcionalidad de la resina. Una vez incorporada la sonda, se realizó la desprotección de las cadenas laterales y el clivaje del péptido del soporte polimérico empleando una solución de TFA /TIS/DOT/H₂O ultrapura (92,5/2,5/2,5/2,5) como se describió en el punto 2.4.1. Se purificaron los péptidos marcados por cromatografía de fase reversa en columna C18 (Clean-up® CEC18123, UCT) con un gradiente de acetonitrilo de 10-100% y se analizaron por RP-HPLC utilizando una columna XBridge™ BEH C18 con buffer A: agua con 0,05% TFA y buffer B: acetonitrilo con 0,05% TFA empleando un flujo de 1 mL/min.

3.2.3.7 Ensayos biológicos in vitro de los péptidos sintetizados

3.2.3.7.1 Preparación de stock de péptidos

Se prepararon soluciones stock 1 mM de los péptidos en agua destilada estéril. Las soluciones stock obtenidas se esterilizaron por filtración con filtros de 0.22 micrones y fueron almacenadas a -20 °C. Se prepararon diluciones a partir de las soluciones stock con agua estéril en el rango de concentraciones indicado para cada ensayo.

*3.2.3.7.2 Preparación de las suspensiones de conidios de hongos de *Fusarium graminearum**

Los aislamientos de *F. graminearum* se cultivaron durante 5-7 días en Erlenmeyer conteniendo 50 mL de medio de cultivo de esporulación de carboximetilcelulosa (CMC) a 25 °C con agitación a 170 rpm. Los macroconidios se recolectaron centrifugando los cultivos obtenidos a 2500 × g y 4°C durante 15 min. Las esporas decantadas se resuspendieron en agua destilada estéril o en medio CPD según el ensayo correspondiente y se ajustó su concentración empleando un hemocitómetro.

3.2.3.7.3 Preparación de la suspensión de *Candida albicans*

Las levaduras fueron crecidas en SDA a 30°C durante 24 h. Para los ensayos de actividad antifúngica, las colonias fueron resuspendidas en buffer fosfatos salino (PBS) estéril, ajustando su turbidez al 0,5 de la escala de McFarland ($1-5 \times 10^6$ CFU/mL). Se realizó una dilución 1:10 ($1-5 \times 10^5$ CFU/mL) de la suspensión preparada anteriormente. Para los ensayos de actividad la suspensión de levaduras se centrifugó durante 10 min a $2500 \times g$ y se resuspendieron en medio SDB 2X.

3.2.3.7.4 Ensayos de inhibición de crecimiento de *Fusarium graminearum*

Se ensayó la actividad antifúngica de los péptidos frente al hongo filamentoso *F. graminearum* realizando ensayos de inhibición del crecimiento de hifas empleando un método modificado para medir en microplaca a partir del reportado por Bleackley et al. (2017). Se incubaron alícuotas (90 μ L) de la suspensión de esporas con una concentración de 5×10^4 esporas/mL en medio $\frac{1}{2}$ CPD a 25 °C en microplaca de 96 pocillos con soluciones de péptidos esterilizados por filtración (10 μ L) a diferentes concentraciones en agua. La germinación de las esporas se evaluó midiendo la densidad óptica a 595 nm utilizando un lector de microplacas Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf, Suiza) haciendo un seguimiento con lecturas a distintos tiempos entre 0 y 48 h de incubación. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó como la concentración de péptido que inhibe completamente el crecimiento de hongos. Los datos de inhibición se analizaron mediante ANOVA y las diferencias medias se evaluaron con $p < 0,05$ utilizando la prueba de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software InfoStat (Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, 2018).

3.2.3.7.5 Ensayos de inhibición de crecimiento de *Candida albicans*

Se estudió el efecto inhibitorio de los péptidos sobre el crecimiento de levaduras según el método de dilución en caldo, comparándose los resultados con los obtenidos para el surfactante



comercial Cetrimide. Los ensayos fueron llevados a cabo en microplacas estériles de 96 pocillos con fondo plano (Greiner). En cada caso, los pocillos fueron adicionados con 100 μ l de la suspensión de las levaduras y 100 μ l de las soluciones de los péptidos. Se incluyeron cultivos en SDB y controles negativos de todas las soluciones empleadas. Finalmente, las placas fueron incubadas durante 24 h a 30°C. El desarrollo de las levaduras fue monitoreado a través de lecturas de DO₆₀₀, haciendo uso de un lector de microplacas (Tecan Infinite M200 Pro).

3.2.3.7.6 Evaluación de la integridad de membrana por microscopía óptica de fluorescencia

Se estudió el daño producido por los péptidos en la membrana de esporas de *F. graminearum* luego de la exposición a los péptidos a su CIM. La viabilidad celular se evaluó a través de la exclusión de la sonda fluorescente ioduro de propidio (IP). Este colorante no es capaz de atravesar la membrana en células intactas, mientras que en aquellas células en las que se alteró la integridad de la membrana puede ingresar y forma un complejo fluorescente luego de unirse al ADN (λ_{ex} 540 nm; λ_{em} 608 nm) (Mesquita et al., 2013). Para el ensayo, se incubaron 25 μ L de las suspensiones de esporas de *F. graminearum* en agua estéril (1×10^7 esporas/mL) con 25 μ L de péptidos preparados en agua, durante 30 o 60 min a 25 °C. Como control positivo se empleó el surfactante comercial Cetrimide y como control negativo agua destilada. A continuación, se adicionaron 5 μ L de ioduro de propidio (IP, 0,1 mM), observando la captación de la sonda fluorescente después de 30 min de incubación a 25 °C, utilizando un microscopio de fluorescencia. Las esporas que emitieron fluorescencia roja después de la incubación con IP se clasificaron como células dañadas y aquellas no teñidas, como intactas. Cada experimento se realizó dos veces, con dos repeticiones por tratamiento.

3.2.3.7.7 Tiempo de muerte-time to kill

Para determinar el tiempo de muerte, los péptidos se añadieron a la CIM determinada previamente a 5 mL del medio CPD y se lo inoculó con macroconidios de *F. graminearum* SP1 a



una concentración final de 1×10^4 conidios/ml. El medio inoculado con los conidios se incubó durante diferentes períodos a 25°C en oscuridad: 0,5, 1, 3 y 6 h. Se realizó un control de crecimiento incubando los conidios con agua en lugar de péptido en las mismas condiciones. Después de cada período de tiempo, se agregaron 100 μ L del cultivo de 5 mL a 900 μ L de agua esterilizada. Esta dilución se agitó con vórtex durante 10 s se sembraron 100 μ L en tres placas diferentes de agar dextrosa de papa de concentración media (PD Agar) y se incubaron durante 3 días a 25 °C en la oscuridad antes de contar las colonias. Cada tiempo de incubación se repitió dos veces.

3.2.3.7.8 Evaluación de la producción de estrés oxidativo a través de la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se estudió la producción *in situ* de especies reactivas de oxígeno, en conidios expuestos a los péptidos. La producción de ROS intracelular se monitoreó mediante emisión de fluorescencia en lector de placas utilizando el indicador de ROS de permeabilidad celular diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCF-DA). Este compuesto es desacetilado por esterasas celulares y convertido a un producto no fluorescente (H2DCF) que en presencia de especies reactivas de oxígeno se transforma en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), una especie que presenta una fuerte fluorescencia alrededor de 517-527 nm (λ_{ex} 492-495 nm) (Halliwell & Whiteman, 2004). Se emplearon dos metodologías para evaluar la producción de ROS, una de ellas midiendo en lector de placas y la otra a través de Microscopía Confocal. Para los ensayos se preparó un stock concentrado de sonda en DMSO (0,01 M).

3.2.3.7.8.1 Medición fluorimétrica con lector de placas

Se incubaron los conidios (1×10^6 ml⁻¹) en agua con los péptidos a su CIM durante 1 h a 25 °C. Se centrifugó durante 10 minutos a 1500 \times g, se resuspendieron los conidios en buffer PBS y se adicionó la sonda H2DCF-DA preparada a partir del stock concentrado en PBS a una

concentración final de 10 μM . Se incubó durante 30 minutos y se procedió a centrifugar nuevamente en las mismas condiciones, resuspendiendo el pellet en PBS. Finalmente se realizaron medidas puntuales de fluorescencia en un lector de microplacas Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf, Suiza) con λ_{ex} 492 nm y λ_{em} 527 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado, se utilizó como control positivo H_2O_2 y como control negativo agua destilada.

3.2.3.7.8.2 Microscopía Láser Confocal

Se incubaron 50 μl de suspensión de conidios en agua estéril ($1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$) con los péptidos a su CIM durante 1 hora a 25 °C. Luego se adicionó la sonda preparada en PBS a una concentración final de 10 μM y se incubó durante 30 minutos a 25 °C. Finalmente, las muestras fueron observadas utilizando un Microscopio Láser Confocal Espectral (CLSM) Leica TCS SP5, con objetivo de 20 \times (NA 0.70) y 63 \times (NA 1.4) objetivo de inmersión. Se utilizó un láser de excitación de 488 nm y la emisión fue monitoreada con filtro de 510-560 nm. Las imágenes fueron procesadas con Leica Confocal Software (LCS Lite 2.61.15).

3.2.3.7.9 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los ensayos se realizaron sobre suspensiones de macroconidios del hongo *F. graminearum* con una concentración de $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ en agua. Se incubaron los péptidos derivados de la secuencia de la defensina a su CIM durante 1 h a 25 °C. Se realizó un control negativo con agua y se hicieron dos réplicas por cada muestra. El procesamiento de las muestras para ser observadas por Microscopía Electrónica de Transmisión se llevó a cabo a temperatura ambiente y bajo condiciones de vacío suave (1 atm) en las todas las etapas. Se realizó la fijación empleando glutaraldehído al 2,5% en buffer cacodilato de sodio 0,1 M (pH 7,2) durante 3 horas. Luego se realizaron tres lavados de 30 minutos con cacodilato de sodio 0,1 M y se procedió a realizar la posfijación con tetróxido de osmio al 1% en cacodilato de sodio 0,1 M durante 2 horas. Se lavó tres veces (30 minutos) con cacodilato de sodio 0,1 M y se realizó la deshidratación por



incubación con soluciones de etanol de concentración creciente desde 50 a 100%. Finalmente, se descartó el etanol 100 %, reemplazándolo con acetona pura. La infiltración se realizó con mezclas de acetona:resina SPURR en distintas proporciones y la inclusión se hizo en resina SPURR pura. La polimerización se desarrolló a 70 °C. Los cortes ultrafinos obtenidos por ultramicrotomía (Ultramicrotomo Supernova, Reichert-Jung) se contrastaron con acetato de uranilo al 1% y citrato de plomo. Se utilizó un Microscopio electrónico de transmisión JEM 1200EX II, Jeol. Para la adquisición de imágenes se empleó la Cámara Digital ES500W Erlangshen CCD Gatan.

3.2.3.7.10 Estudio de la inserción de los péptidos en monocapas lipídicas

Se llevaron a cabo medidas de presión superficial utilizando un tensiómetro de Langmuir modelo 102A (NIMA Technology, Coventry) a temperatura ambiente ($20\pm 1^\circ\text{C}$) con una placa Wilhelmy de platino como sensor. En los ensayos de inserción se empleó una mezcla de lípidos POPC/ERG (preparada en cloroformo en una relación molar 3:1) que fue sembrada en la superficie de la subfase (350 μl de PBS) de manera de alcanzar la presión inicial (Π_0) deseada. Seguidamente se dejó evaporar el solvente y una vez estabilizada la presión superficial (5 min), se inyectó la solución del péptido haciendo uso de una microjeringa Hamilton en la subfase de manera de alcanzar una concentración final de 20 μM . El incremento en la presión superficial fue monitoreado en función del tiempo hasta alcanzar una señal estable. Los ensayos de adsorción para cada péptido fueron llevados a cabo de manera similar, pero en ausencia de lípidos.

3.2.3.7.11 Localización subcelular de los péptidos modificados

Con el fin de estudiar la localización en los conidios de *F. graminearum* de los péptidos sintetizados se emplearon los mismos derivatizados con fluoresceína (tal como se describe en la sección 3.2.3.6 del presente capítulo) y se utilizó como marcador de pared celular el colorante azul de tripán, que luego de unirse a la quitina y los glucanos exhibe fluorescencia roja que puede ser detectada por microscopía confocal (Liesche et al., 2015). Para los ensayos se incubaron 100

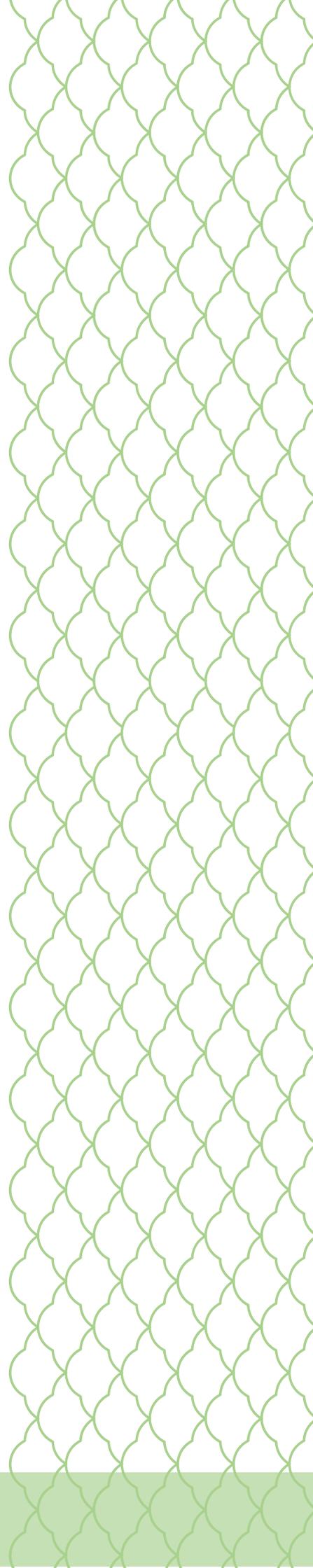
μL de suspensión de conidios en agua ($1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$) con los péptidos a su CIM correspondiente.

Se incubó durante 30, 60, y 120 min a 25°C en oscuridad y luego se adicionó el colorante azul de tripán desde un stock preparado en PBS (1 mg/mL) a fin de llegar a una concentración final de $10 \mu\text{g/mL}$.

La localización de los péptidos se observó por microscopía confocal con un Microscopio Láser Confocal Espectral (CLSM) Leica TCS SP5 empleando un objetivo de $20 \times$ (AN 0.70, distancia de trabajo $590 \mu\text{m}$) y el objetivo de inmersión de $63 \times$ (AN 1.4, distancia de trabajo $100 \mu\text{m}$). Para la fluorescencia verde se utilizó un láser de excitación de argón (100 mW) de 488 nm y la emisión se monitoreó con filtro de 506-556 nm, mientras que para registrar la fluorescencia roja se empleó un láser de excitación de helio-neón (10 mW) 633 nm y un filtro de emisión de 533-700 nm. Las imágenes fueron procesadas con el software Leica Confocal Software (LCS Lite 2.61.15).

04

Resultados



Capítulo IV: Resultados

4.1 Clonación de dos defensinas a partir de flores de *Silybum marianum*

4.1.1 Material vegetal utilizado como fuente de defensinas

Para la clonación de las defensinas, se utilizó como material de partida flores de la especie *Silybum marianum* (L.) Gaertn. conocido como cardo mariano, cardo asnal o cardo blanco (Figura 16). Se trata de una planta que pertenece a la familia Asteraceae (Tribu Carduae).

La especie es originaria de los países que rodean al Mar Mediterráneo (sur y sudoeste de Europa, norte de África, Islas Canarias) y oeste de Asia. Se encuentra naturalizada prácticamente en todo el mundo y es también cultivada en países de Europa central y en Argentina, Venezuela, Ecuador y China con el fin de extraer las sustancias medicinales que contiene.

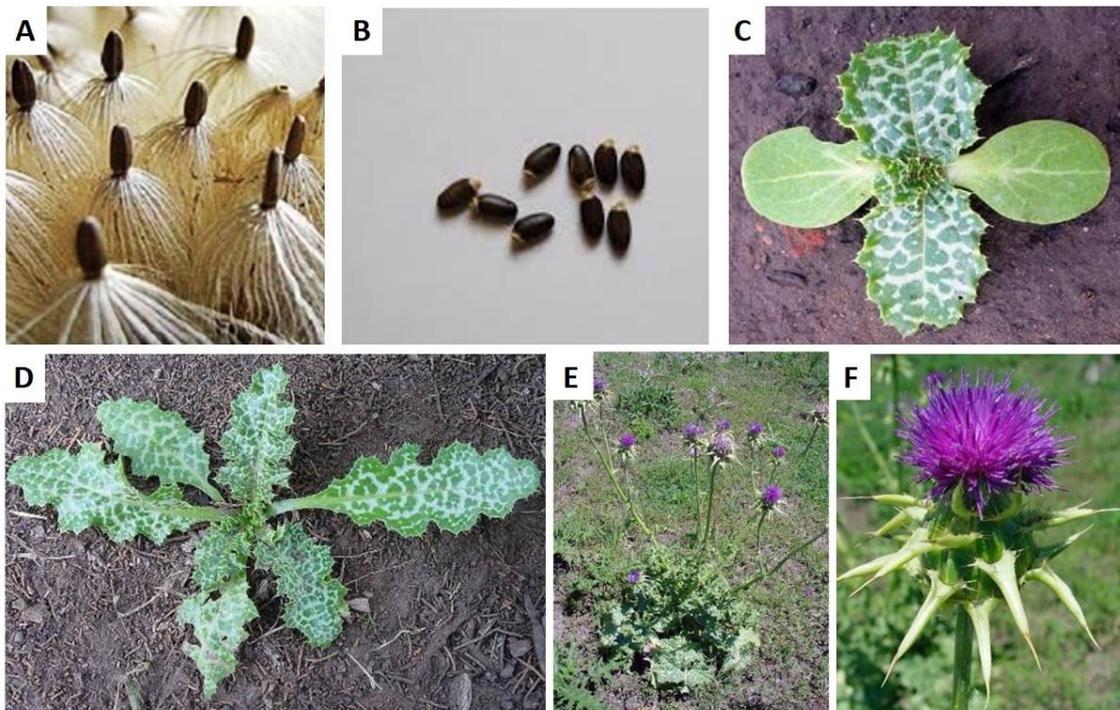


FIGURA 16 | *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (A) Cipselas (aquenios con papus), (B) Aquenios, (C) Cotiledones y primeras hojas de la roseta, (D) Roseta basal, (E) Parte aérea de la planta florecida, y (F) Inflorescencia en capítulo.

4.1.2 Clonación de defensinas a partir de inflorescencias de *Silybum marianum*

Con el objetivo de clonar secuencias de proteínas tipo defensina a partir de flores de *S. marianum*, se diseñaron cebadores degenerados en base a secuencias N-terminales de defensinas de Asteraceae, determinadas por secuenciación de Edman (Figura 17). Dichas defensinas habían sido previamente purificadas en el CIProVe por cromatografía de intercambio iónico a partir de extractos de flores de especies de la familia Asteraceae. Se realizó la extracción del ARN total a partir de inflorescencias de *S. marianum* empleando un kit comercial específico para vegetales. Se emplearon flores recolectadas en dos localidades distintas de la provincia de Buenos Aires, La Plata y Olavarría. El rendimiento medio obtenido luego de la extracción fue de 2,25 µg/µL. Se evaluó en cada caso la calidad del ARN obtenido mediante electroforesis de agarosa al 1% (Figura 18) y luego se sintetizó el ADNc por retrotranscripción.

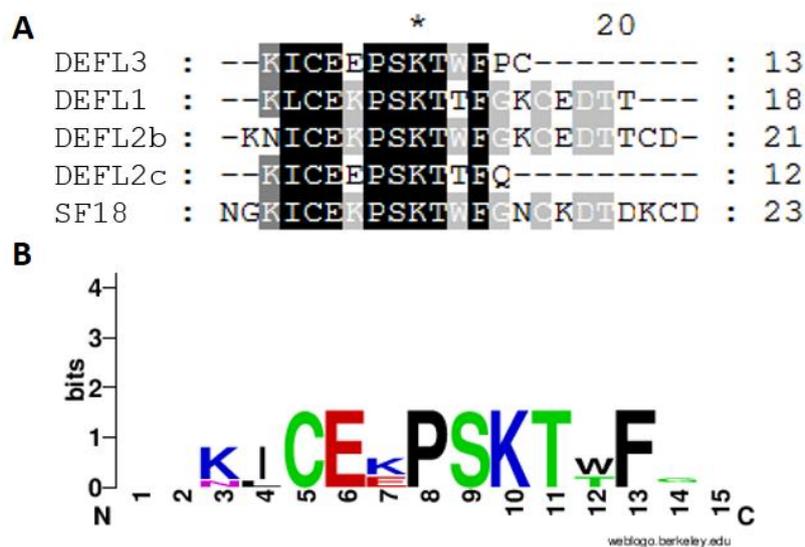


FIGURA 17 | Alineamientos múltiples de secuencias N-terminal de defensinas vegetales (A) Alineamiento múltiple de las secuencias N-terminal de diferentes fracciones proteicas obtenidas por cromatografía y una secuencia de fragmentos de SF18 (residuos 14 a 36), una defensina aislada de *Helianthus annuus* (Nro. de acceso P22357.1). Las secuencias se alinearon usando Clustal W Server y se editaron con el software GeneDoc. Los recuadros negros indican el 100% de la conservación de residuos, los recuadros de color gris oscuro representan el 80% de la conservación de residuos y los recuadros de color gris claro representan el 60% de la conservación de residuos. (B) Logotipo que ilustra el alineamiento de (A). Creado con el servidor WebLogo (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

El ADNc se empleó como molde en una reacción de PCR con cebadores diseñados específicamente a partir de los extremos N-terminales conservados de defensinas de Asteraceae. Los productos de amplificación se lograron en la muestra obtenida en La Plata con

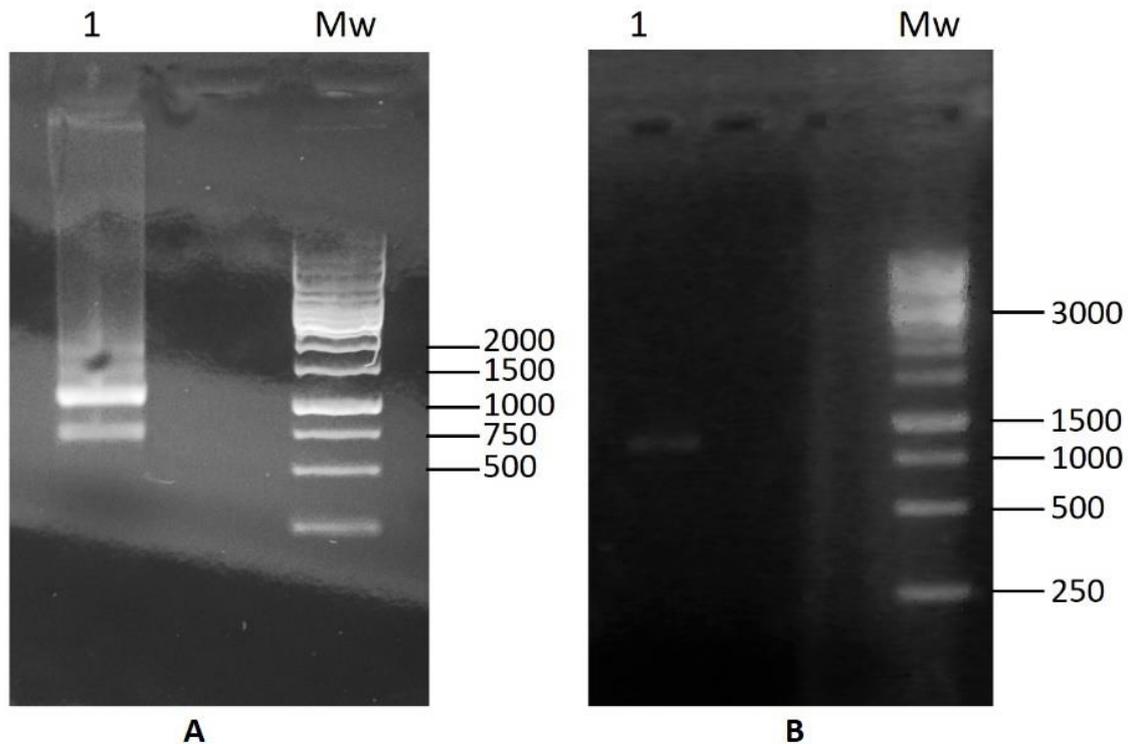


FIGURA 18 | Análisis de la extracción de ARN total por electroforesis en gel de agarosa (1%). (A) Extracción de ARN total. Calle 1: ARN total de *S. marianum* aislado de flores. Se observan las bandas correspondientes a las fracciones de ARN ribosomal. Mw: Marcador de masas moleculares de ADN 1 kb (GeneRuler, Thermo Scientific). **(B) Control de la extracción de ARN.** Amplificación por PCR con un cebador constitutivo de actina para controlar la extracción de ARN. Mw: Marcador de masas moleculares de ADN 1 kb (GeneRuler, Thermo Scientific).

el cebador **A9**: 5'-TGYGARAARCCGAGCAAAACCTGG-3'. Se obtuvo una banda intensa de 750 pb y bandas más tenues de 600, 500 y 200 pb (Figura 19A). En el caso de la muestra de flores recolectadas en Olavarría, la amplificación se logró con el cebador **L1F**: 5'-AARAAAYATHGTGAAAAGCCAAGC-3' obteniéndose en este caso una banda intensa de 500 pb (Figura 19B). Se observaron distintos perfiles de bandas y que la amplificación se haya logrado en cada caso con cebadores distintos es coherente con el hecho de que el material de partida proviene de distintos lugares y momentos de recolección. Se purificaron las bandas más intensas empleando un kit comercial desde un gel de agarosa (1,5%) y se ligaron al vector pGEM-

T Easy. Con el producto de la ligación se transformaron bacterias *E. coli* XL1-Blue químicamente competentes.

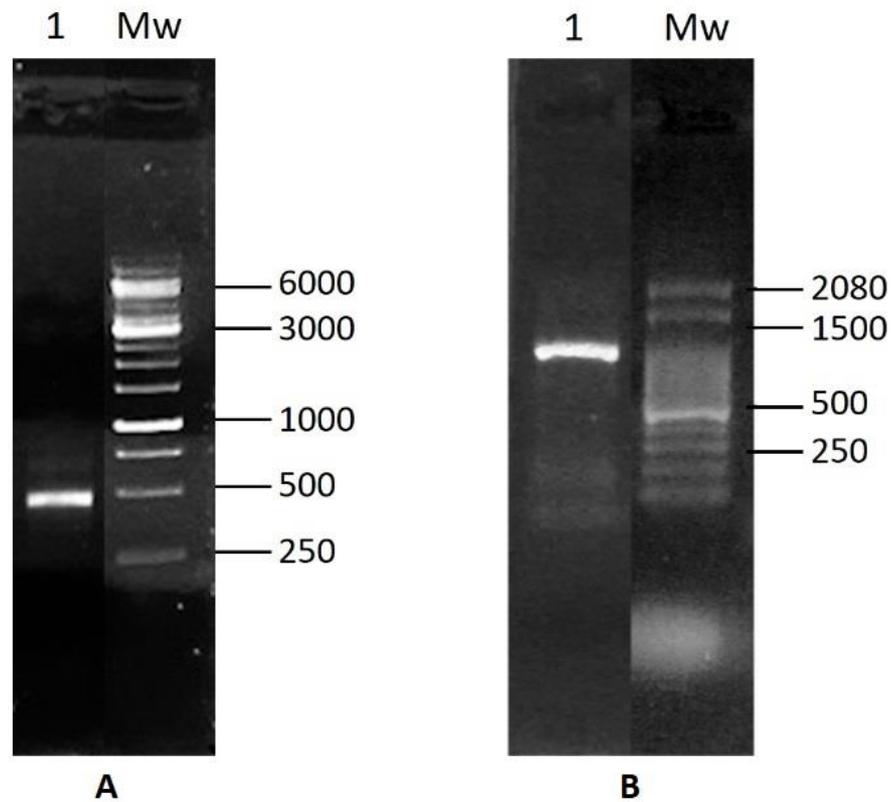


FIGURA 19 | Amplificación de las secuencias correspondiente al marco de lectura abierto de las defensinas de flores de *S. marianum*. La primera cadena de ADNc fue sintetizada a partir del ARN total aislado de flores de *S. marianum* y fue utilizada como molde en la reacción de PCR con cebadores específicamente diseñados a partir de extremos N-terminal conservados de defensinas de Asteraceae. Los productos de la amplificación obtenidos se clonaron y fueron secuenciados en forma automática. Análisis electroforético en gel de agarosa (1,5%) del producto amplificado mediante RT-PCR. **(A) Calle 1:** ADNc correspondiente a la amplificación con el cebador L1F. **Calle 2: MW:** marcadores de masas moleculares de ADN 1 kb (GeneRuler, Thermo Scientific). **(B) Calle 1:** ADNc correspondiente a la amplificación con el cebador A9. **Calle 2: MW:** marcadores de masas moleculares de ADN de 100 pb (*PB-L Productos Bio-Lógicos*).

Finalmente, se purificaron los plásmidos provenientes de varias colonias positivas para cada una de las construcciones. Se realizó un análisis de restricción con la enzima EcoRI que corroboró la presencia del inserto en cada caso. Varios clones positivos fueron secuenciados en forma automática y se realizó el análisis de las secuencias resultantes con el servidor BLAST que permitió la identificación de dos secuencias nucleotídicas distintas. Dichas secuencias exhiben altos niveles de identidad de secuencia entre ellas y con otras secuencias de defensinas de

plantas disponibles en bases de datos públicas como *Cynara cardunculus*, *Artemisia vulgaris*, *Aesculus hippocastanum*, *Dahlia merckii*, *Cirsium vulgare* y *Helianthus annuus* pertenecientes a la familia Asteraceae, entre otras.

Las secuencias nucleotídicas y aminoácidas deducidas se muestran en la Figura 20. Los productos proteicos codificados corresponden a dos proteínas tipo defensina (DEFL) y fueron denominados DefSm1 y DefSm2, con una secuencia nucleotídica de 640 y 257 pares de bases, respectivamente. Ambas secuencias fueron depositadas en la base de datos GenBank con los números de acceso KT207793 y MK533801, respectivamente. El ADNc de DefSm1 codifica para una proteína de 232 aminoácidos que comprende un dominio tipo defensina de 54 aminoácidos que fue denominado DefSm1D y un dominio C-terminal rico en prolina de 178 aminoácidos (Figura 20A). Según el cálculo realizado con la herramienta *Compute pI/Mw* (ExpASY) la proteína tiene una masa molecular predicha de 24 kDa con un pI teórico de 9,79. El dominio defensina posee una masa molecular teórica de 5,9 kDa y un pI de 8,75; mientras que el dominio C-terminal presenta una masa teórica de 18,2 kDa y un pI teórico de 10,07.

Por su parte, el ADNc de DefSm2 codifica para una proteína de 95 aminoácidos que contiene un dominio de defensina N-terminal (DefSm2D) y un dominio C-terminal rico en Arg y Lys, de 54 y 41 aminoácidos, respectivamente (Figura 20B). Para DefSm2, los valores de pesos moleculares predichos de la proteína completa, defensina, y su dominio C-terminal fueron 10,95; 6,10 y 4,87 kDa, respectivamente, y sus correspondientes puntos isoeléctricos fueron 9,01; 8,50 y 9,81.

En el caso del dominio defensina DefSm2D se verificó una disposición de residuos de cisteína coincidente con aquella presente en las defensinas C8: C-X₁₀-C-X₅-C-X₃-CX_[9-10]-CX_[6-8]-CXC-X₃-C (Shafee et al., 2016), lo que determinaría la presencia de cuatro enlaces disulfuro en la estructura tridimensional de la proteína. DefSm1D, en cambio, posee 7 de las 8 cisteínas mencionadas, limitando el número de enlaces disulfuro presentes en la proteína a 3.

A

```

A T P K L C E K P S K T W S G K C D A A
1  gcgactccaaaattatgtgaaaagccaagcaaaacatggtcocgggaaatgtgatgccgca 60
K C D N K C I S W E G A T H G A C H L R
61  aagtgcgacaacaagtgcatactcttgggagggtgcaacccatggagcctgtcatttgcgt 120
E A K S S C F C Y F D Y S K D E K K P P
121  gaagccaaatcaagttgcttttgcactctcgactattccaagacgagaagaaccacct 180
P K H K S P P P K D K K P P P K D K K P
181  ccaaaacataagtgcgccaccaccaccaagacaaaaaaccaccaccaccaagacaaaaagcca 240
P P P K D K S P P P P K A G S P P P A D
241  cctccaaaagacaaatctccacctccacccaaagccgggtctccccacctcctgctgat 300
G G S S P P P K D G S S P P P A D G G S
301  ggtggttcatcgctcctccaaaagacgggtcttccccacctcctgctgacggtggttca 360
S P P P K A G S P P P P K A G S P P P P
361  tcgccacctcccaaagccgggtcgccgcctcccaaagctgggtcgccgcctcctcct 420
K D K S S P P P P K D K S S P P P P K D
421  aaagacaagtcacgcgcgcctcctaaagacaagtcacgcgcgcctcctaaagac 480
K S S P P P P K D K S P S P P P P K D K
481  aagtcacgcgcgcctcctaaagacaagtcgcgcctcgcctcctaaagacaag 540
S P S P P P P K D K S P S P P P P K D K
541  tcgcgctgcctcctcctaaagacaagtcgcgcctcgcctcctcctaaagacaag 600
S P P P P P K D K S S P P P P K H E M
601  tcgcgcgcgcaccgcctcctaaagacaagtcgctgcgcgcctcctccaaacacgaaatg 660
P L S R K S K I K A K S *
661  cctttgtcaagaaaatccaaaataaaggccaaatcc tag 700

```

B

```

K L C E K P S K T W F G N C G N P R H C
1  aaattatgtgaaaagccaagcaagacgtggtttgaaattgtggcaacccaagacattgt 60
G D Q C K S W E G A V H G A C H V R N G
61  ggcgaccagtgcaagtccttgggagggtgcaagtcacgtgcatggcgcacgtccgtaatgga 120
K H M C F C Y F N C P Q A E R L A Q D K
121  aaacacatgtgcttttgcacttcaactgtccacaagctgagaggctcgtcgaagacaag 180
L K A E E L A R H N I E A K K V P H F E
181  ctgaaagctgaagagctcgtctagacacaatattgaagccaaaaaagtaccacattttgaa 240
R P V G S F H D P R I R T Y L *
241  cgtccagtcggatccttccatgatcctcgaataagaacctattta taa 290

```

FIGURA 20 | ADNc que codifica para las proteínas tipo defensina (A) DefSm1 y (B) DefSm2 y sus respectivas secuencias aminoacídicas. Se encuentran indicadas en negrita las regiones correspondientes al dominio defensina y en rojo el codón de stop. La secuencia del ADNc de DefSm1 y DefSm2 fue incorporada en la base de datos GenBank bajo el número de acceso KT207793 y MK533801, respectivamente.

4.1.3 Búsqueda y análisis de los genes que codifican para las defensinas clonadas

Se realizaron búsquedas de similitud secuencial a través de la herramienta BLASTn utilizando como base de datos el conjunto de datos provenientes de la secuenciación del genoma de *S. marianum* disponible en GenBank (project accession number LMWD01) e ingresando las secuencias nucleotídicas de las defensinas clonadas. DefSm1 fue encontrada en el contig 37505

(número de acceso LMWD01037504.1) y DefSm2 se localizó en el contig 25608 (número de acceso LMWD01025607.1). Para las dos secuencias se observó la estructura típica del gen que codifica para las defensinas de dos exones con un intrón posicionado dentro de la secuencia codificante del péptido señal (Figuras 21A y 22A), una característica presente en la mayoría de las defensinas de las plantas. La presencia de un péptido señal sugiere una localización extracelular putativa para las defensinas, que sería consistente con su papel en defensa. Se analizaron las secuencias nucleotídicas posicionadas río arriba (*upstream*) de las secuencias codificantes de DefSm1 y DefSm2, considerando aproximadamente 1000 pb respecto del sitio de inicio de la traducción. Las dos secuencias promotoras fueron analizadas empleando el software PlantCARE para identificar elementos *cis* regulatorios (Figuras 21B y 22B). Estos elementos son motivos cortos, usualmente de longitudes que fluctúan desde los 5 a 20 nucleótidos y regulan la expresión génica (Lareo, 2006). El análisis reveló la presencia de múltiples elementos presentes en genes eucariotas como la TATA-*box* y CAT-*box*. A su vez, fue posible identificar otros elementos vinculados a las respuestas frente a estrés y a diversas hormonas también vinculadas a respuestas de ese tipo. En ambos casos se encontró el elemento iniciador (Inr), con un espaciado apropiado entre el mismo y la caja TATA que produciría un efecto sinérgico y que aumentaría la fuerza del promotor. Los motivos *cis* identificados se agruparon en su mayoría dentro de la categoría funcional de respuestas frente a estrés. Para ambas secuencias, la longitud de dichos motivos osciló entre 5-11 pb. Los elementos regulatorios relacionados con la respuesta al estrés biótico encontrados para ambas secuencias promotoras fueron: el motivo CGTCA, que se encuentra involucrado en la capacidad de respuesta al jasmonato de metilo; las repeticiones ricas en timina y citosina (TC), involucradas en la respuesta de defensa y estrés; motivo ABRE (*ACGT-containing ABA Response Element*), implicado en la respuesta y al ácido abscísico; motivo TCA, implicado en la respuesta frente al ácido salicílico; y motivos ARE implicados en la respuesta frente a estrés oxidativo. Para DefSm1, se encontraron presentes el motivo TCA y el elemento DPBF, el primero implicado en respuesta

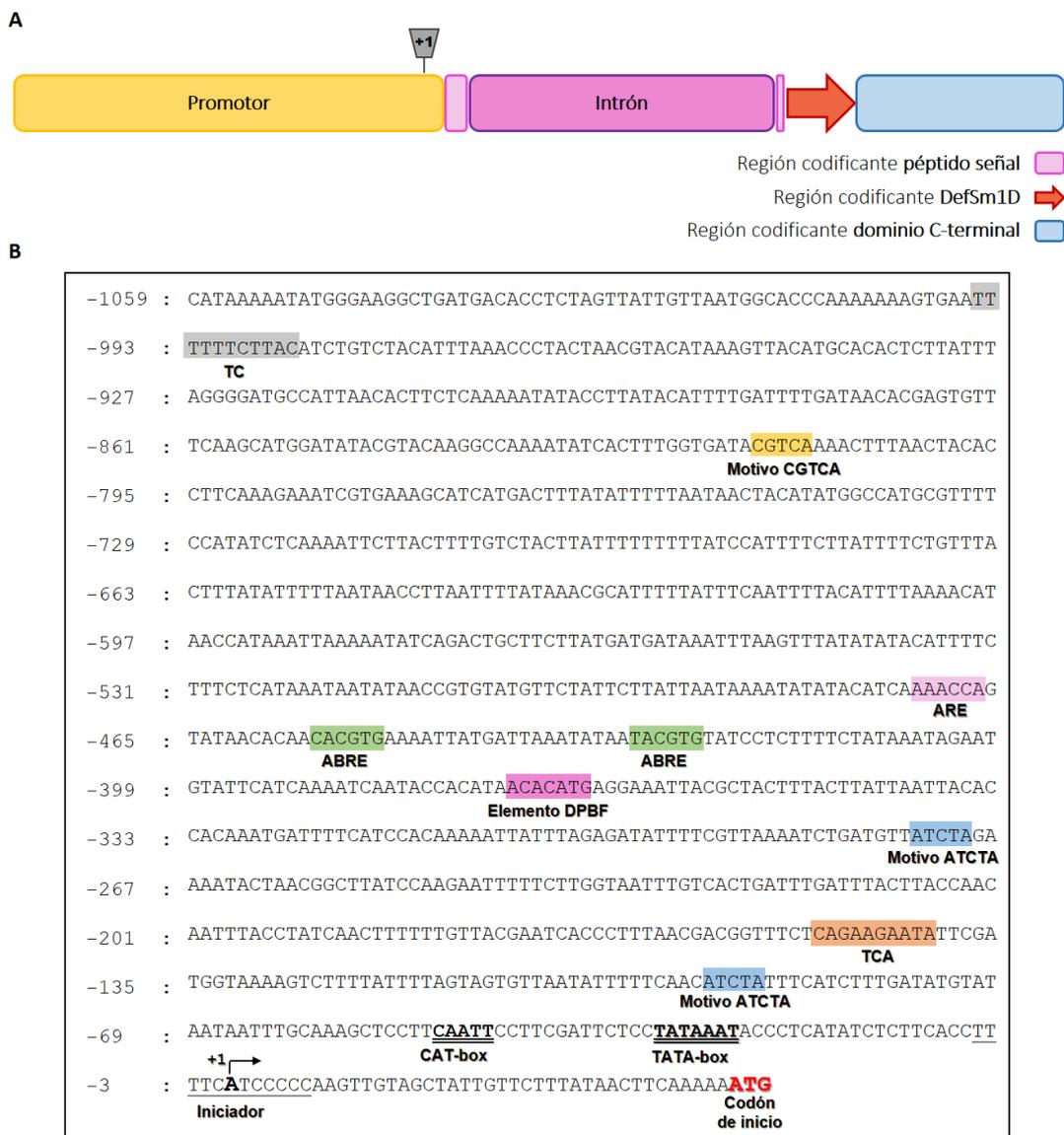


FIGURA 21 | Organización del gen que codifica para DefSm1 (A) Esquema del gen que codifica para DefSm1. El gen que codifica para la proteína DefSm1 presenta dos exones con un intrón ubicado dentro de la secuencia codificante del péptido señal. Se esquematiza el promotor en amarillo, la región codificante del péptido señal en rosa claro, el intrón en rosa oscuro, la región codificante del dominio defensina con una flecha en color rojo y la del dominio C-terminal rico en prolina en celeste. **(B) Secuencia promotora 5' upstream del gen que codifica para DefSm1.** Los números indican las posiciones relativas al elemento iniciador (+1). Se muestra la ubicación de TATA-box (subrayado doble), CAT-box (subrayado doble), el elemento iniciador (subrayado, con el sitio de inicio de la transcripción en negrita) y el codón de inicio (en rojo). Se muestran también varios elementos *cis* regulatorios sensibles a hormonas, como el motivo CGTCA implicado en la respuesta al metil jasmonato, el motivo ATCTA en respuesta al etileno, ABRE (*ACGT-containing ABA Response Element*) y TCA implicados en la respuesta al ácido abscísico y salicílico, respectivamente. También se identificaron repeticiones ricas en TC, involucradas en la defensa y la respuesta al estrés, elementos ARE, involucrados en la respuesta al estrés oxidativo y el elemento DPBF involucrado en la respuesta a ácido abscísico.

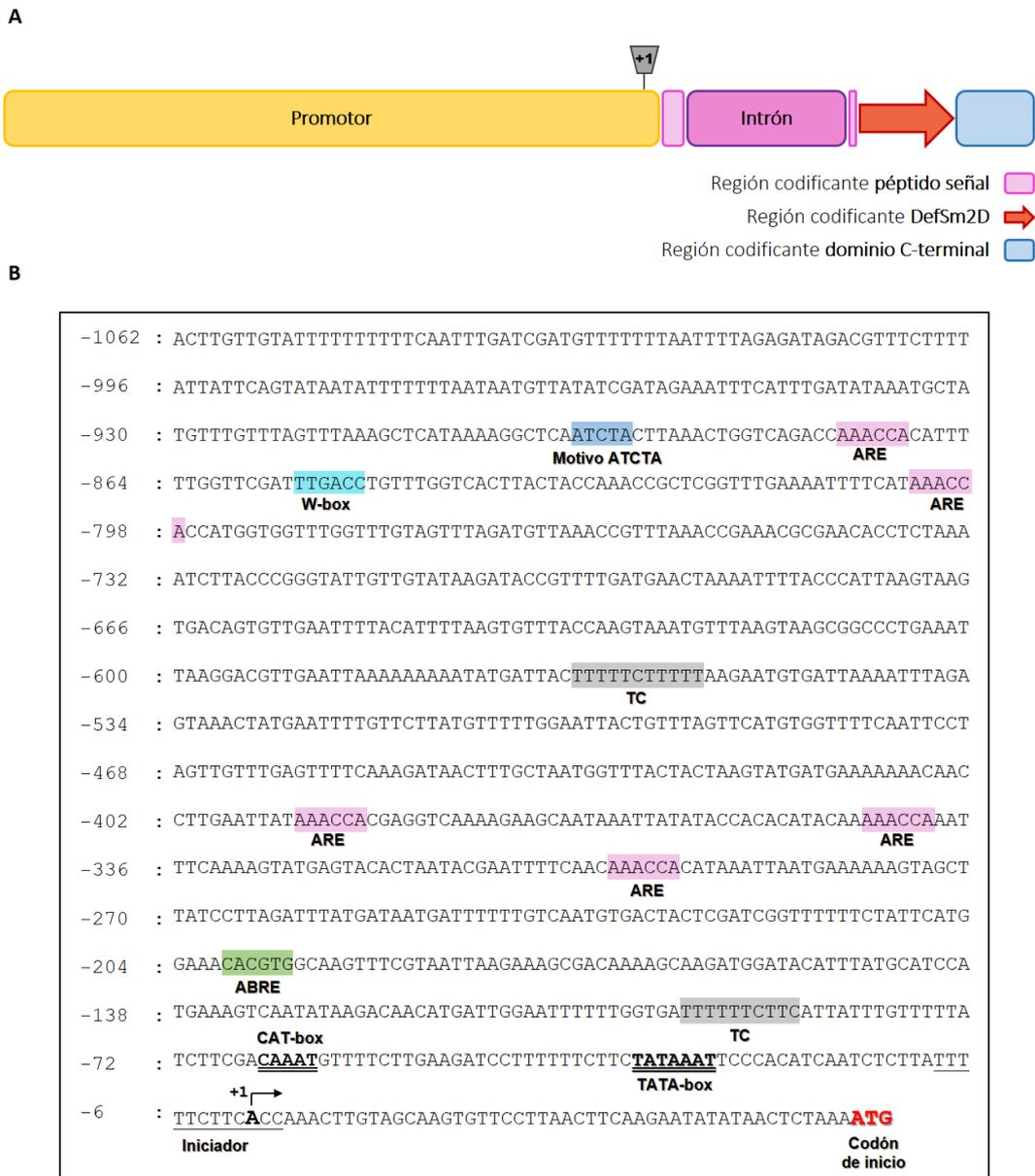


FIGURA 22 | Organización del gen que codifica para DefSm2 (A) Esquema del gen putativo que codifica para DefSm2. El gen putativo que codifica para la proteína DefSm2 presenta dos exones con un intrón ubicado dentro de la secuencia codificante del péptido señal. Se esquematiza el promotor en amarillo, la región codificante del péptido señal en rosa claro, el intrón en rosa oscuro, la región codificante del dominio defensina con una flecha en color rojo y la del dominio C-terminal rico en arginina y lisina en celeste. **(B) Secuencia promotora 5' upstream del gen que codifica para DefSm2.** Los números indican las posiciones relativas al elemento iniciador (+1). Se muestra la ubicación de TATA-box (subrayado doble), CAT-box (subrayado doble), el elemento iniciador (subrayado, con el sitio de inicio de la transcripción en negrita) y el codón de inicio (en rojo). Se muestran también varios elementos *cis* regulatorios sensibles a hormonas, como el motivo CGTCA implicado en la respuesta al metil jasmonato, el motivo ATCTA en respuesta al etileno, ABRE (*ACGT-containing ABA Response Element*), y TCA implicados en la respuesta al ácido abscísico y salicílico, respectivamente. También se indica la posición del W-box señalado como un elemento de respuesta frente a elicitores fúngicos. También se identificaron repeticiones ricas en TC, involucradas en la defensa y la respuesta al estrés y elementos ARE, involucrados en la respuesta al estrés oxidativo.

frente a ácido salicílico y el segundo involucrado en la respuesta a ácido abscísico. En el caso del

promotor del gen de DefSm2, los motivos ARE se encontraron con mayor frecuencia y adicionalmente se encontró el elemento W-box, señalado como un elemento de respuesta frente a elicitores fúngicos y como un elemento de regulación de la expresión de proteínas PR (A. Kaur et al., 2017).

4.2 Análisis bioinformático de DefSm1 y DefSm2

4.2.1 Análisis de la estructura primaria

El análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas de los dominios defensina utilizando el servidor BLASTp reveló que DefSm1D mostró 77% de identidad con Art v 1 de polen de *A. vulgaris* (número de acceso CBK62707), 73% de identidad con SF18 de antera de *H. annuus* (número de acceso P22357.1), 65% de identidad con DmAMP1 de semillas de *D. merckii* (número de acceso POC8Y4) y 51% de identidad con CtAMP de semillas de *Clitoria ternatea* (Q7M1F2.1). Por su parte, el dominio C-terminal de DefSm1 mostró un 57% de identidad con una proteína hipotética de *Solanum tuberosum* que codifica un dominio extensina (número de acceso: KAH0679960) y un 55% de identidad con una extensina de *S. pennellii* (número de acceso XP_015073376). El análisis realizado con el servidor iHyd-PseAAC sobre la secuencia de DefSm1 permitió identificar la presencia de 31 sitios potenciales de hidroxilación sobre residuos de prolina ubicados en su dominio C-terminal (Tabla A1, Anexo).

DefSm2D, por su parte, mostró 84% de identidad con DmAMP1, 82% de identidad con una defensina de hojas de *C. cardunculus* var. *scolymus* (número de acceso XP_024967363.1), 64% con AhAMP1 de semillas de *A. hippocastanum* (número de acceso Q7M1F3), 65% de identidad con CtAMP1 y 64% con Art v 1. Para el dominio C-terminal de esta defensina no se encontraron secuencias homólogas utilizando el servidor BLASTp.

La Figura 23 muestra el alineamiento entre varias de las secuencias que presentaron mayor identidad con DefSm1D y DefSm2D según el análisis con BLASTp. Se observó que en las secuencias de DefSm1D y DefSm2D se encuentran presentes los residuos aminoacídicos

conservados de las defensinas vegetales excepto uno de los 8 residuos de cisteína que no se encuentra presente en DefSm1D. Los demás residuos conservados, además de las cisteínas, son dos glicinas en la posición 12 y 33, un ácido glutámico en la posición 28 y un residuo aromático en la posición 10 (numeración relativa a DefSm2D). A su vez, el análisis de las secuencias reveló, tal como se esperaba, la presencia de los motivos α -core (GKCDAKC para DefSm1D y GNCGNPRHC para DefSm2D, con dos residuos catiónicos cada uno) y γ -core (GACHLREAKSSC para DefSm1D y GACHVRNGKHMC para DefSm2D, con tres residuos catiónicos y uno aniónico en el primer caso y 4 residuos catiónicos en el segundo).

Empleando la base de datos ProDom se realizó la búsqueda de dominios conservados presentes en las secuencias aminoacídicas deducidas de las proteínas clonadas. ProDom es un conjunto completo de familias de dominios de proteínas generadas automáticamente a partir de la base

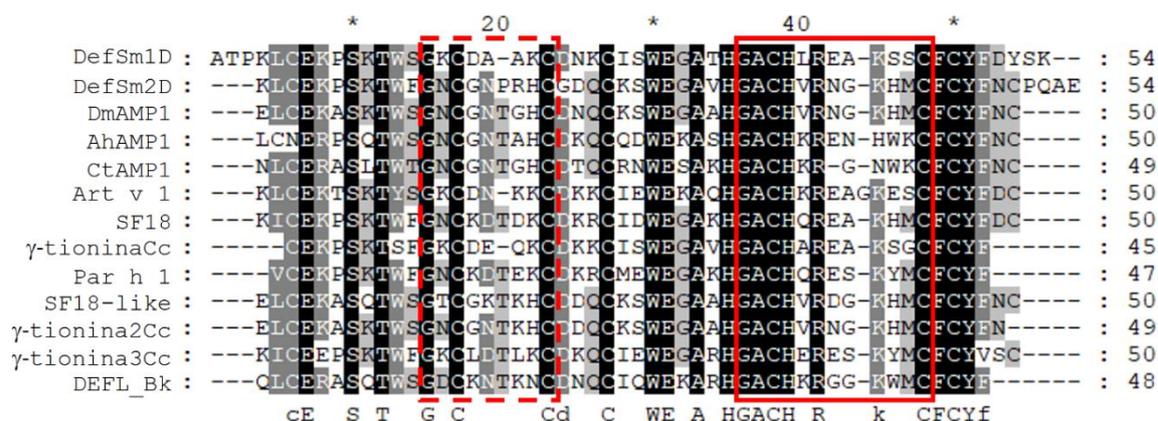


FIGURA 23 | Alineamiento múltiple de secuencia entre los dominios defensina correspondientes a DefSm1D y DefSm2D y defensinas relacionadas según los resultados del análisis con el servidor BLAST.

Se utilizaron las secuencias tomadas de GenBank de las defensinas DmAMP1 (P0C8Y4), AhAMP1 (Q7M1F3), CtAMP1 (Q7M1F2.1), Art v 1 (CBK62707), SF18 (P22357.1), γ -tioninaCc (*C. cardunculus* var. *scolymus*, KVI10700.1), Par h 1 (*Parthenium hysterophorus*, AKF12278.1), SF18-like (*H. annuus* XP_021996674.1), γ -tionina2Cc (*C. cardunculus* var. *scolymus*, XP_024968136.1), γ -tionina3Cc (*C. cardunculus* var. *scolymus*, XP_024978377.1) y DEFL_Bk (*Bupleurum kanoi*, CBJ55934.1). Las secuencias se alinearon utilizando el programa Clustal W-server y se editaron con GeneDoc. Los recuadros negros indican el 100% de conservación de residuos, los gris oscuro representan 80% de conservación de residuos y los de color gris claro representan el 60% de conservación de residuos. La posición del α -core y el γ -core se muestran con un recuadro rojo con línea discontinua y continua, respectivamente. Se muestra debajo la secuencia consenso.

de datos UniProt. La búsqueda reveló que ambas secuencias presentan un dominio perteneciente a la familia PDB019C0, que se corresponde con el dominio tipo defensina identificado con BLAST. El resultado de ProDom reveló que este dominio se encuentra vinculado a los términos GO (*Gene Ontology*) “región extracelular” y “muerte de células de otro organismo”. El término vinculado a espacio extracelular se refiere al espacio externo a la estructura más externa de la célula. El segundo término hace referencia a cualquier proceso en un organismo que resulte en la muerte de células de otro organismo, incluida en algunos casos la muerte del mismo.

Se realizó también la búsqueda en la base de datos Pfam (Protein Families Database), que posee una amplia colección de familias de dominios de proteína. Cada familia se encuentra representada por múltiples alineamientos de secuencias basados en el modelo oculto de Márkov o HMM (Hidden Markov Model). La búsqueda en esta base de datos reveló que las secuencias aminoacídicas deducidas pertenecen a la familia de las Gamma-tioninas (PF00304) y en particular al clan Knottin_1 (CL0054), que corresponde a una superfamilia de proteínas tipo knotinas. Este clan incluye varias familias de proteínas y toxinas que provienen de escorpiones, plantas y artrópodos. La Figura 24 muestra el logotipo del perfil HMM de la familia PF00304 a la que pertenecerían DefSm1D y DefSm2D donde pueden observarse gráficamente la conservación de residuos en las proteínas que pertenecen a esta familia.

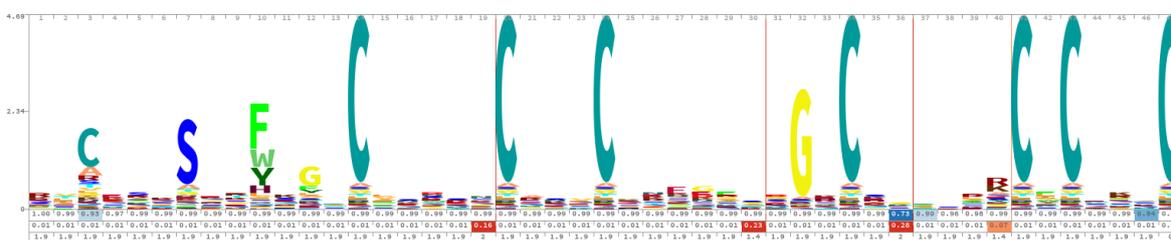


FIGURA 24 | Logotipo correspondiente al perfil HMM de la familia PF00304.

4.2.2 Predicción y análisis de la estructura secundaria

Utilizando el programa ProFunc fue posible predecir los patrones de plegamiento de la estructura secundaria de las defensinas. Los arreglos de la estructura secundaria que pueden estar presentes en una proteína son hojas β , α -hélices, *harpins* β , protuberancias β , hebras β ,

interacciones α -hélice- α -hélice, giros β , giros γ y puentes disulfuro. Según la predicción realizada (Figura 25), puede observarse en ambos casos la estructura secundaria típica presente en las

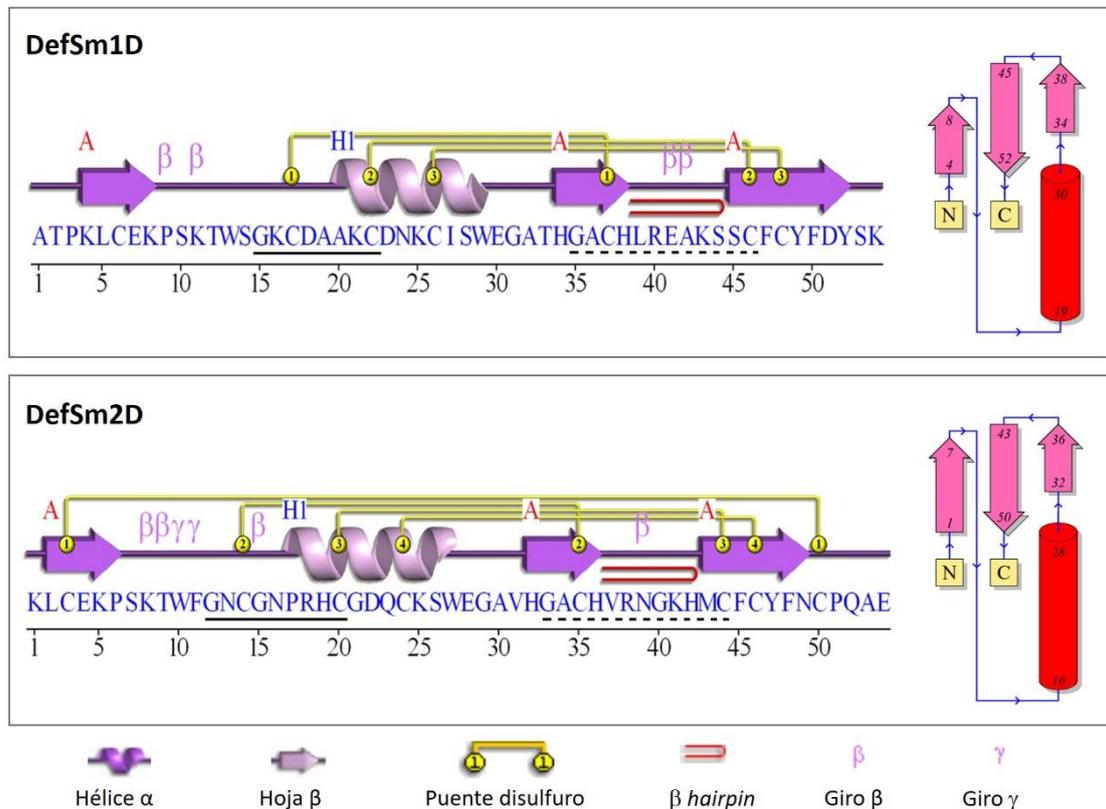


FIGURA 25 | Predicción de la estructura secundaria de las defensinas DefSm1D y DefSm2D. A la izquierda se muestra la predicción de la estructura secundaria con la secuencia aminoacídica debajo. A la derecha se muestra un esquema de la topología de la proteína. La secuencia del motivo α -core está subrayada con una línea continua, mientras que la del γ -core está subrayada con una línea discontinua.

defensinas vegetales que consta de una α -hélice y tres hojas β antiparalelas. DefSm1D presenta tres puentes disulfuro, mientras que DefSm2D posee cuatro puentes disulfuro. Ambas defensinas mostraron la presencia de 4 giros β , un β hairpin y adicionalmente DefSm2D presenta 2 giros γ .

4.2.3 Predicción y análisis de la estructura terciaria

Con el objetivo de predecir la estructura tridimensional de DefSm1D y DefSm2D, se construyeron modelos estructurales mediante modelado molecular por homología (Figura 26).

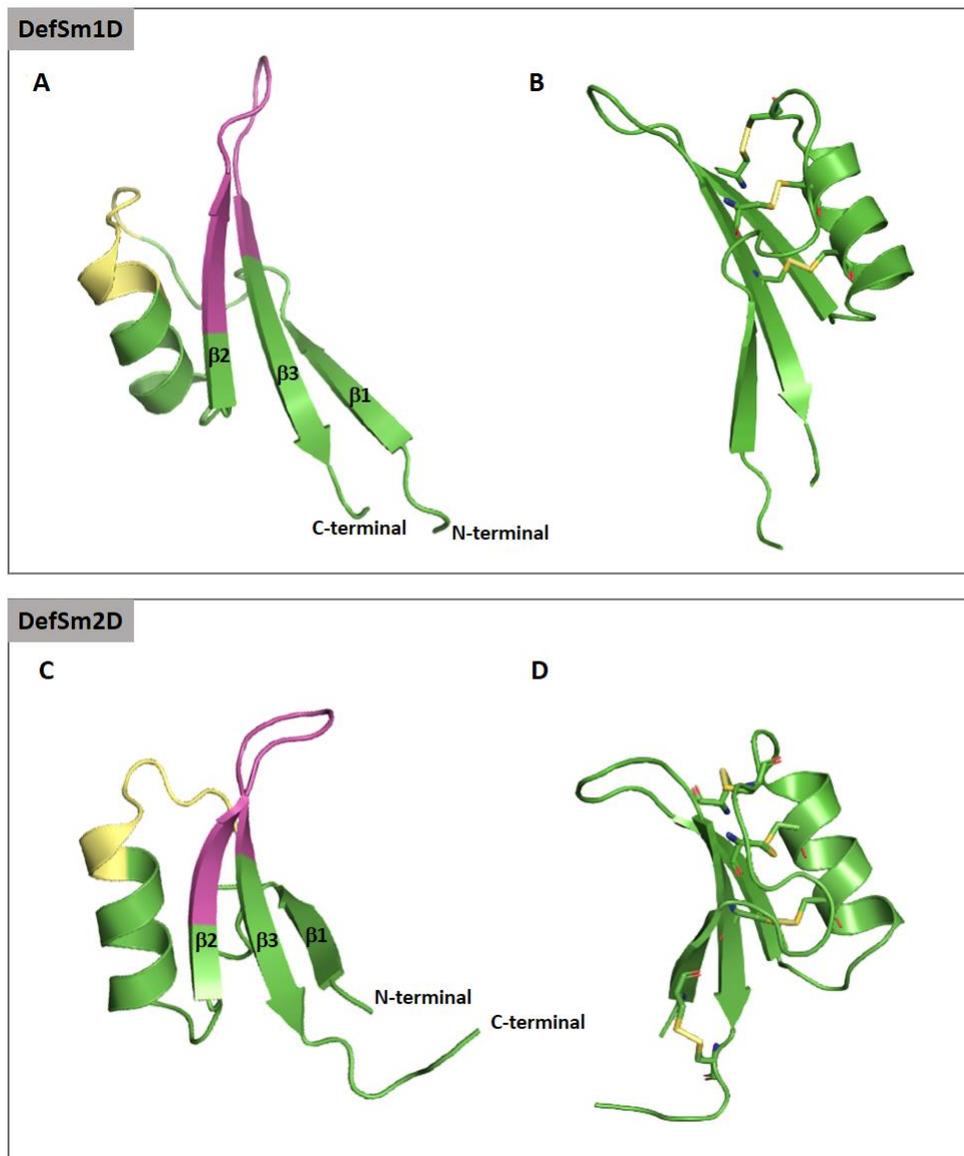


FIGURA 26 | Modelo estructural de las defensinas de *S. marianum* estudiadas. La secuencia de DefSm1D y DefSm2D se modelaron por técnicas de modelado molecular por homología con el programa MODELLER usando la estructura cristalográfica conocida de Artv1 (PDB:2KPY) y RsAFP2 (PDB:1AYJ), respectivamente. **(A) y (C) Estructura tridimensional de DefSm1D y DefSm2D, respectivamente.** Se muestra en amarillo la región correspondiente al α -core y en rosa la región del γ -core. Se indica la numeración de las hojas β y la posición de los extremos N- y C-terminal. **(B) y (D) Estructura tridimensional de DefSm1D y DefSm2D mostrando la disposición y conectividad de los residuos de cisteína en los enlaces disulfuro, respectivamente.** Se encuentran representados los residuos de cisteína involucrados y los enlaces disulfuro se indican en amarillo.

A partir del *fold assignment* se determinó que el molde más adecuado para modelar DefSm1D fue Art v 1 de *Artemisia vulgaris* (PDB: 2KPY), con una identidad del 76% y un *E-value* de $3,1 \times 10^{-25}$. Para DefSm2D, en cambio, se empleó RsAFP2 de *Raphanus sativus* (PDB: 1AYJ), con una

identidad de 65% y un *E-value* de $4,7 \times 10^{-16}$. Utilizando el programa MODELLER se llevó a cabo el modelado molecular por homología, empleando como molde dichas proteínas. Se construyeron 100 modelos, de los cuales se evaluó el valor de la función objetivo (*objective function*) para cada uno a fin de elegir el mejor en cada caso; siendo este el que minimiza el valor de dicho parámetro y se corresponde con el modelo que viola el menor número de restricciones espaciales.

Los modelos mostraron la estructura típica de las defensinas vegetales: una α -hélice y tres hojas β orientadas en forma antiparalela formando el andamiaje estructural característico conocido como α/β estabilizado por cisteína (CS $\alpha\beta$). Asimismo, se observan para DefSm1D tres puentes disulfuro en los cuales hay seis cisteínas involucradas: la cisteína 17 forma un enlace disulfuro con la cisteína 37, la cisteína 22 con la 46 y la 26 con la 48 (Cys-17-37, Cys22-46 y Cys26-48, numeración relativa a DefSm1D). Para el caso de DefSm2D se observaron cuatro puentes disulfuro, siendo la conectividad de los residuos de cisteína: Cys3-50, Cys14-35, Cys20-44 y Cys24-46. El motivo γ -core reside en un *hairpin* localizado entre las hojas β 2 y β 3, mientras que la región del α -core se encuentra comprendida entre la hélice α y la parte proximal del *loop* que lo conecta a la lámina β 1. En el caso de DefSm2D, su α -core presenta un residuo de prolina que formaría un *proline-kink*. Tanto la región del α -core como la del γ -core en ambas defensinas muestran una superficie electrostática predominantemente positiva; sin embargo, la densidad de carga positiva en estas regiones es mayor en los motivos correspondientes a DefSm2D respecto de aquellos presentes en DefSm1D (Figura 27).

4.2.4 Evaluación y validación de los modelos

Los modelos tridimensionales de DefSm1D y DefSm2D obtenidos a través del modelado molecular por homología con MODELLER fueron sometidos a diversos análisis a fin de evaluar su calidad. La precisión estereoquímica de los modelos fue evaluada con el software PROCHECK a través del análisis del gráfico de Ramachandran (Laskowski et al., 1993). En este diagrama, es

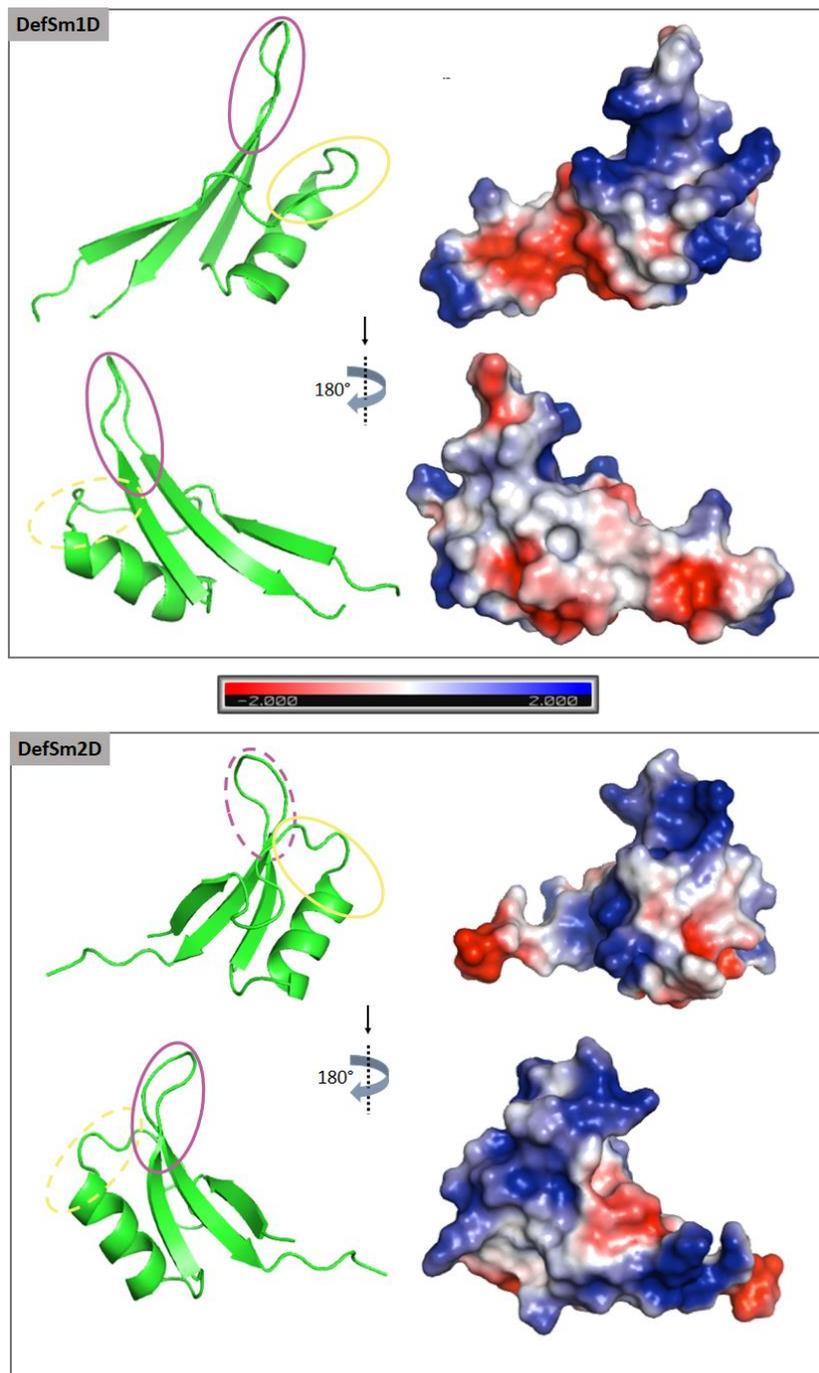
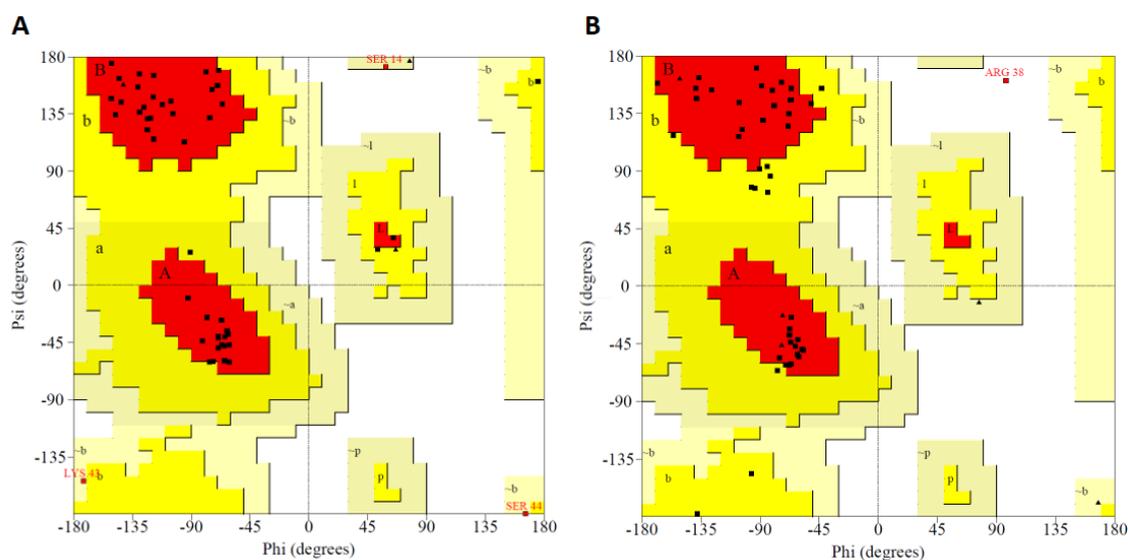


FIGURA 27 | Potencial de superficie electrostática de los modelos tridimensionales de las defensinas visualizados con PyMOL. A la izquierda se muestra la estructura tridimensional de cada defensina, el α -core se encuentra indicado en amarillo y el γ -core en rosa. La carga negativa se indica en rojo, la carga neutra en blanco y la carga positiva en azul como se muestra en la escala (± 2 kT/e).

posible visualizar las combinaciones más probables de ángulos diédricos Ψ (psi) contra Φ (phi), determinadas a partir de estructuras de proteínas ya cristalizadas. Tal como se muestra en la Figura 28A, para DefSm1D el 87,2 % de los residuos se encuentran en regiones favorecidas, un

6,4% en regiones permitidas, un 6,4 % de los residuos se encuentran en regiones generosamente permitidas y no hay residuos localizados en regiones no permitidas. Para DefSm2D, el diagrama de Ramachandran muestra un 72,1 % de los residuos en regiones favorecidas, un 25,6 % en regiones permitidas, un 2,3 % de los residuos se encuentran en regiones no permitidas y no hay residuos presentes en las regiones generosamente permitidas (Figura 28 B). Estos resultados sugieren que los modelos tridimensionales obtenidos a través de MODELLER presentan una calidad aceptable desde el punto de vista estructural.



Estadísticas	DefSm1D	DefSm2D
Residuos en regiones más favorecidas [A,B,L]	87,2%	72,1%
Residuos en regiones adicionalmente permitidas [a,b,l,p]	6,4%	25,6%
Residuos en regiones generosamente permitidas [~a,~b,~l,~p]	6,4%	0,0%
Residuos en regiones no permitidas	0,0%	2,3%

FIGURA 28 | Evaluación estructural del modelo: diagrama de Ramachandran. Diagramas obtenidos a través del programa PROCHECK. (A) DefSm1D, (B) DefSm2D. Los puntos negros representan los residuos posicionados en las regiones favorecidas, mientras que en puntos rojos indican aquellos posicionado en las regiones desfavorecidas. Las zonas correspondientes a las regiones más favorecidas se indican en rojo, las permitidas en amarillo, las generosamente permitidas en beige y las no permitidas en color blanco.

El análisis energético de los modelos se realizó empleando el servidor ProSA-web (Wiederstein & Sippl, 2007). Se obtuvo el parámetro Z-score para cada modelo que da cuenta de su calidad energética global. El valor de este parámetro se muestra en una gráfica que contiene los Z-score de todas las proteínas determinadas experimentalmente que se encuentran en la base de datos PDB (Figura 29A y 29C) y que muestra los grupos de estructuras de diferentes fuentes (rayos X

o RMN) en diferentes colores. Los modelos tridimensionales obtenidos de DefSm1D y DefSm2D presentaron un Z-score de -4,3 y -5,63, respectivamente. Ambos valores se encuentran dentro del rango encontrado típicamente para proteínas nativas de tamaño similar, lo que pone de manifiesto la buena calidad de los modelos obtenidos en términos energéticos.

Se realizó también un análisis energético local empleando el mismo servidor (Figura 29B y 29D) y se observó que el modelo no presenta en general regiones problemáticas. Este gráfico muestra

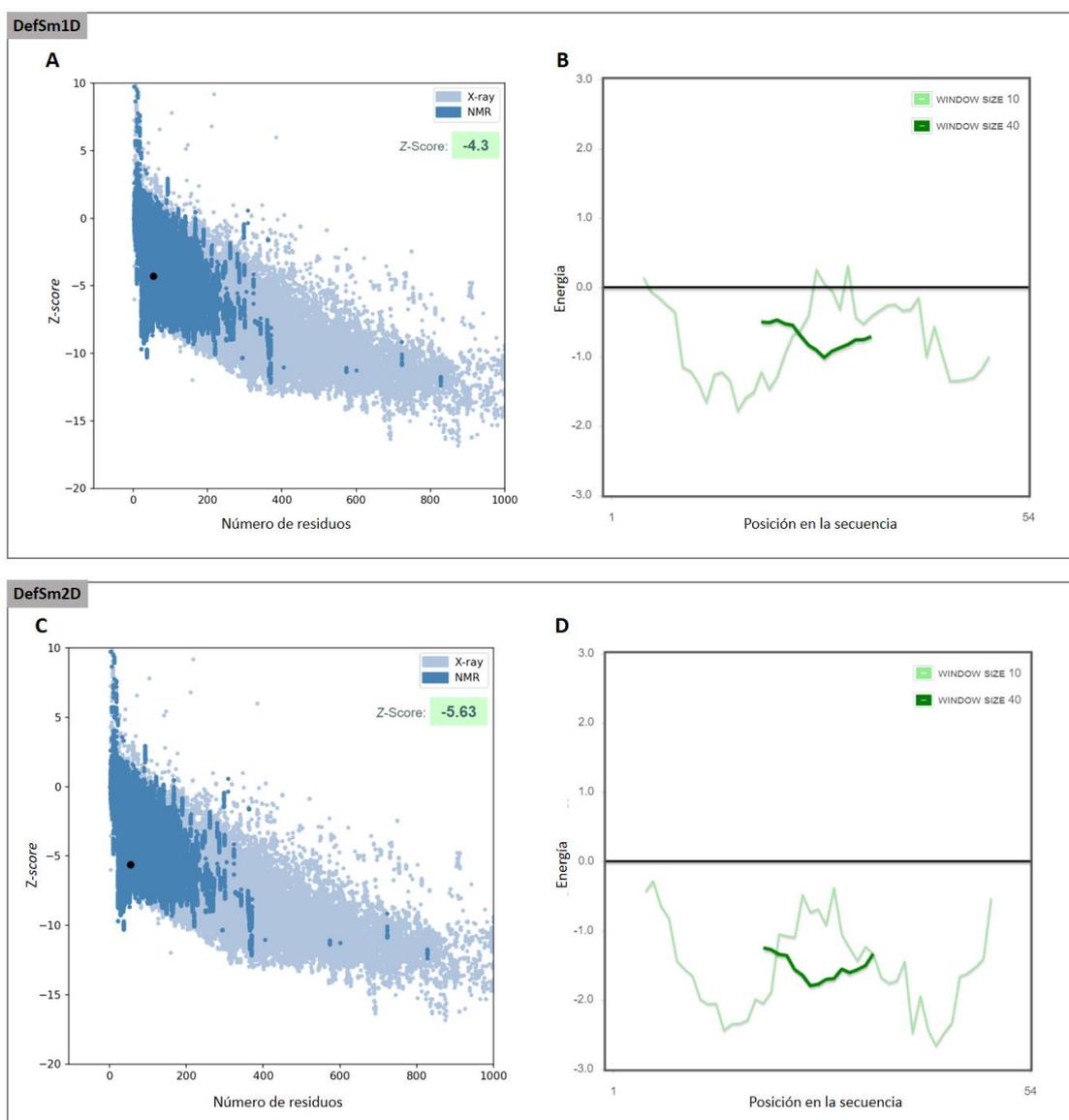


FIGURA 29 | Evaluación energética de los modelos obtenidos. (A) y (C) Evaluación global del modelo de DefSm1D y DefSm2D. Se obtuvieron valores de Z-score de -4,3 y -5,63, respectivamente. (B) y (D) Evaluación energética local del modelo DefSm1D y DefSm2D, respectivamente. Se muestra la energía en función de la posición de cada residuo. El cálculo de la energía se realizó con una ventana de 10 aminoácidos (curva verde claro) y con una ventana de 40 aminoácidos (curva verde oscuro).

la calidad del modelo local en base al trazado de la energía en función de la posición en la secuencia de aminoácidos. Valores de energía positivos corresponden a partes erróneas o problemáticas de la estructura de entrada. En general, un gráfico de energías individuales de residuos puede mostrar grandes fluctuaciones y por lo tanto su utilización es limitante para la evaluación del modelo. Por este motivo, el gráfico es ajustado calculando la energía promedio sobre cada fragmento de 40 residuos (curva verde oscura) o sobre una ventana de 10 aminoácidos (curva verde claro). Tanto DefSm1D como DefSm2D presentan mayormente valores de energía por debajo de cero, con lo cual puede afirmarse que la calidad energética local de ambos modelos es aceptable. Esto también coincide con los resultados del cálculo del potencial DOPE realizado con el programa MODELLER y con el software Verify3D (datos no mostrados).

4.2.5 Predicción funcional

Empleando como *input* los modelos de las defensinas se realizó un análisis de predicción funcional utilizando el servidor ProFunc (Laskowski et al., 2005), que permite realizar predicciones en relación con la función de la proteína introducida en base a métodos de análisis de tipo secuenciales y estructurales. Del análisis se obtuvieron como resultados los términos Gene Ontology (GO) para las defensinas DefSm1D y DefSm2D. Los términos GO con *score* significativo referidos a “componente celular” y “proceso biológico” que se obtuvieron a partir de este análisis fueron iguales para ambas defensinas y se detallan en la Tabla 13.

TABLA 13 | Términos GO con mayor *score* para DefSm1D y DefSm2D del análisis con ProFunc.

Componente celular
Región extracelular
Proceso Biológico
Respuesta de defensa
Respuesta frente a estímulo
Respuesta a estrés
Procesos en los que interactúan múltiples organismos

encuentran agrupadas junto con otras defensinas de especies pertenecientes a la familia Asteraceae, Brassicaceae y Saxifragaceae, descritas como parte de un *cluster* de defensinas antifúngicas (Van der Weerden & Anderson, 2013). El homólogo más cercano a DefSm1D resultó ser Art v 1 de *A. vulgaris* mientras que para DefSm2D, fue DmAMP1 de *D. merckii* (Figura 31).



FIGURA 31 | Detalle del árbol filogenético realizado. Se indica con flechas rojas la posición de las defensinas DefSm1D y DefSm2D. Se observa que DmAMP1 es el homólogo más cercano a DefSm2D, mientras que Artv1 es el más cercano a DefSm1D.

4.3 Estudio de péptidos de síntesis química derivados de las secuencias DefSm1D y DefSm2D

4.3.1 Diseño de péptidos a partir de la secuencia de defensinas de flores de *S. marianum*

Los estudios *in silico* previos llevados a cabo utilizando las secuencias de los dominios defensina DefSm1D y DefSm2D mostraron que la actividad antifúngica sería una potencial actividad exhibida por estas proteínas putativas de *S. marianum*, clonadas en el presente trabajo de tesis.

Con el fin de identificar y analizar motivos relacionados con dicha función, a partir de dichas secuencias se realizó el análisis de la lista de potenciales péptidos antimicrobianos generada con el servidor C-PAmP, utilizando como *input* las secuencias de las defensinas relacionadas Art v 1, AhAMP1 y DmAMP que presentan el mayor porcentaje de identidad con DefSm1D y DefSm2D. En base a este análisis, se observó que los péptidos predichos con mayor *score* se encontraron ubicados en torno a las regiones α - o γ -core de dichas proteínas, tal como se muestra en la Figura 32A. Teniendo en cuenta estos péptidos, la posición homóloga respecto a las secuencias de DefSm1D y DefSm2D (Figura 32B), y su posición en los modelos moleculares predichos se

A

		Score
Art v 1	KLCEKTSKTSW SGKCDNKKCD KKKCIWEKAQH GACHKREAGKES CFYFDCS	
	KLCEKTSKTSW SGKCDNKKCD	0,9744
	WSGKCDNKKCD	0,9589
	KAQH GACHKREAGK	0,9600
	HGACHKREAGKES CFYFDCS	0,9439
	HGACHKREAGKES C	0,9262
	QH GACHKREAGK	0,9408
AhAMP1	LCNERPSQTW SGNCGNTAH CDKQCDWEKASH GACHKREN HWKCFYFNC	
	SGNCGNTAH CDKQC	0,9900
	KASH GAC	0,9936
	WSGNCGNTAH CDK	0,9903
DmAMP1	ELCEKASKTSW SGNCGNTGH CDNQCKSWEAAHGACHVRNGK HMC FCYFNC	
	CEKASKTSW SGNCGN	0,9903
	LCEKASKTSW SGNCGNTGH CD	0,9947
	LCEKASKTSW SGNCGNTGH CDNQCK	0,9948
	HGACHVRNGK HMC	0,9906

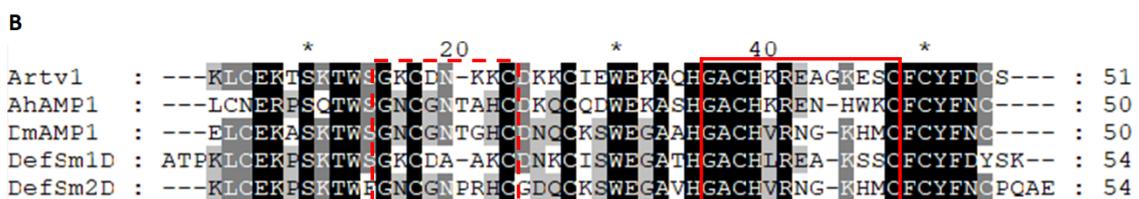


FIGURA 32 | Análisis y diseño de péptidos potencialmente antimicrobianos (A) Lista de péptidos generados por la base de datos C-PAmP con alto *score*, predichos como potenciales péptidos antimicrobianos. Se utilizaron como *input* las secuencias de las defensinas homólogas a DefSm1D y DefSm2D detalladas en la tabla. Se indica en negrita la secuencia correspondiente al α -core y subrayada la secuencia correspondiente al γ -core. (B) Alineamiento múltiple entre las secuencias aminoacídicas de DefSm1D, DefSm2D, AhAMP1 (Q7M1F3.1), DmAMP1 (P0C8Y4.1) y Art v 1 (Q84ZX5.1). Las secuencias fueron alineadas a través del ClustalW e importadas al programa GeneDoc. Se utilizaron cuatro niveles de conservación: 100% de conservación con fondo negro; 80% de conservación con fondo gris y letra blanca; 60% de conservación fondo gris con letra negra y menor al 60% de conservación con fondo blanco. Se indica la región α -core de las defensinas con un recuadro discontinuo rojo y la región γ -core con un recuadro continuo rojo.

procedió a diseñar los péptidos potencialmente antimicrobianos tomando como plantilla a las secuencias de las defensinas de *S. marianum* clonadas.

La Figura 33 muestra el esquema de los péptidos diseñados y su posición respecto a las secuencias de las defensinas empleadas como plantilla. Se diseñaron siete péptidos en total, tres en base a la secuencia de DefSm1D y cuatro a partir de la secuencia de DefSm2D.

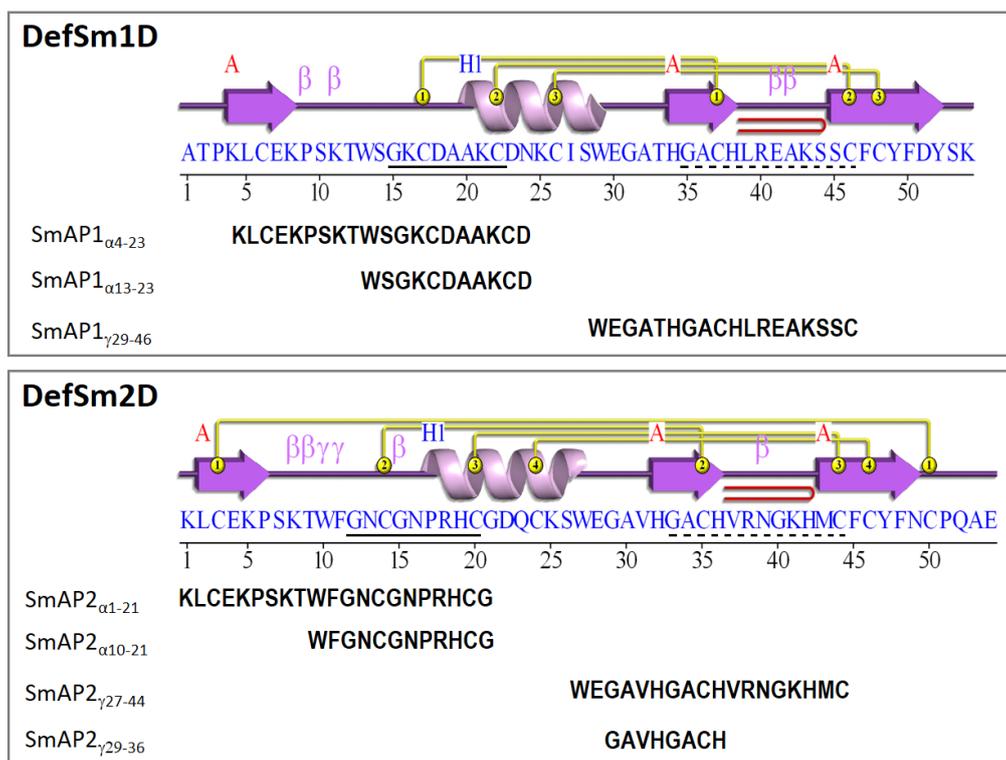


FIGURA 33 | Secuencia aminoacídica, predicción de la estructura secundaria de las defensinas DefSm1D y DefSm2D. Las hojas β se representan con flechas y la hélice α se representa con una hélice. Los enlaces disulfuro se muestran arriba de cada secuencia en amarillo. La secuencia del motivo α -core está subrayada con una línea continua, mientras que la del γ -core está subrayada con una línea discontinua. El nombre y la secuencia de los péptidos sintetizados se muestran debajo de cada secuencia.

Los péptidos diseñados a partir de DefSm1D incluyen dos derivados de la región α -core (llamados SmAP1_{α4-23} y SmAP1_{α13-23}) y un péptido que abarca la región γ -core (llamado SmAP1_{γ29-46}). El péptido SmAP1_{α4-23} incluye cuatro residuos aminoacídicos adicionales cargados en comparación con SmAP1_{α13-23}: tres catiónicos (Lys) y uno aniónico (Glu). Los péptidos diseñados en base a DefSm2D también incluyeron dos derivados de la región α -core (llamados SmAP2_{α1-21} y SmAP2_{α10-21}), uno del γ -core (llamado SmAP2_{γ27-44}) y un péptido más pequeño contenido en

este último (llamado SmAP2₇₂₉₋₃₆). El péptido SmAP2_{α1-21} también incluye cuatro residuos aminoacídicos adicionales cargados en comparación con SmAP2_{α10-21} tres catiónicos (Lys) y uno aniónico (Glu). Con el servidor PepCalc se procedió a realizar el análisis de la hidropatía de los péptidos diseñados en función de sus secuencias (Figuras 34 y 35) y con el *PeptideCalculator* (Bachem) se calculó la carga neta en función del pH (Figura 36).

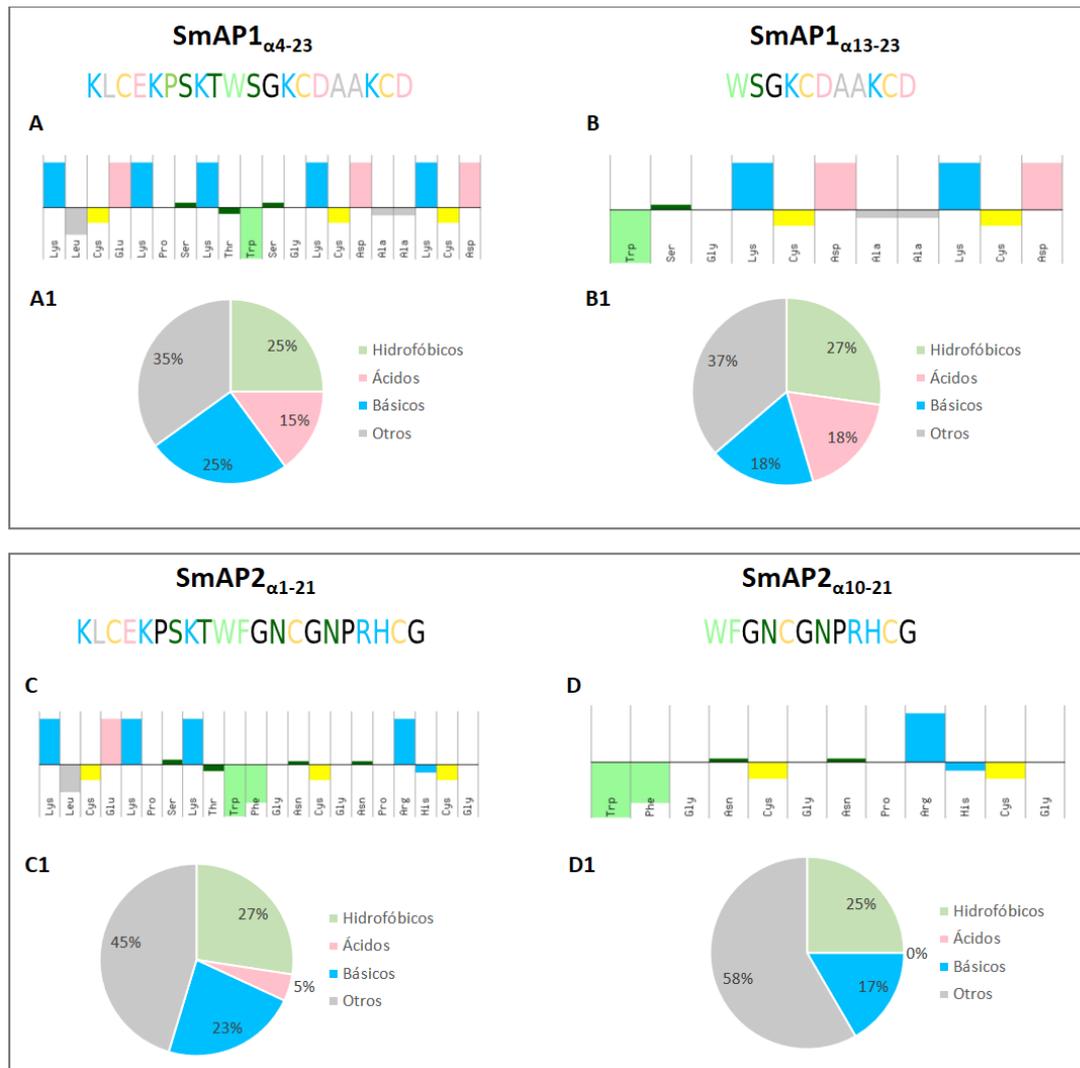


FIGURA 34 | Propiedades de los péptidos diseñados en base al motivo α -core de las defensinas de *S. marianum*. En el recuadro superior se muestran los péptidos derivados del α -core de DefSm1D, mientras que en el inferior se muestran aquellos derivados del α -core de DefSm2D. **(A), (B), (C) y (D) Esquemas de hidropatía de las secuencias en base a la escala de Hopp & Woods.** El análisis fue realizado con PepCalc. La parte superior es hidrofílica mientras que la parte inferior es hidrofóbica. En color rosa se muestran los residuos ácidos, en verde claro los aromáticos, en celeste los básicos, en gris los alifáticos, en verde oscuro los polares y en amarillo las cisteínas. **(A1), (B1), (C1) y (D1) Distribución de la composición aminoacídica para cada péptido.**

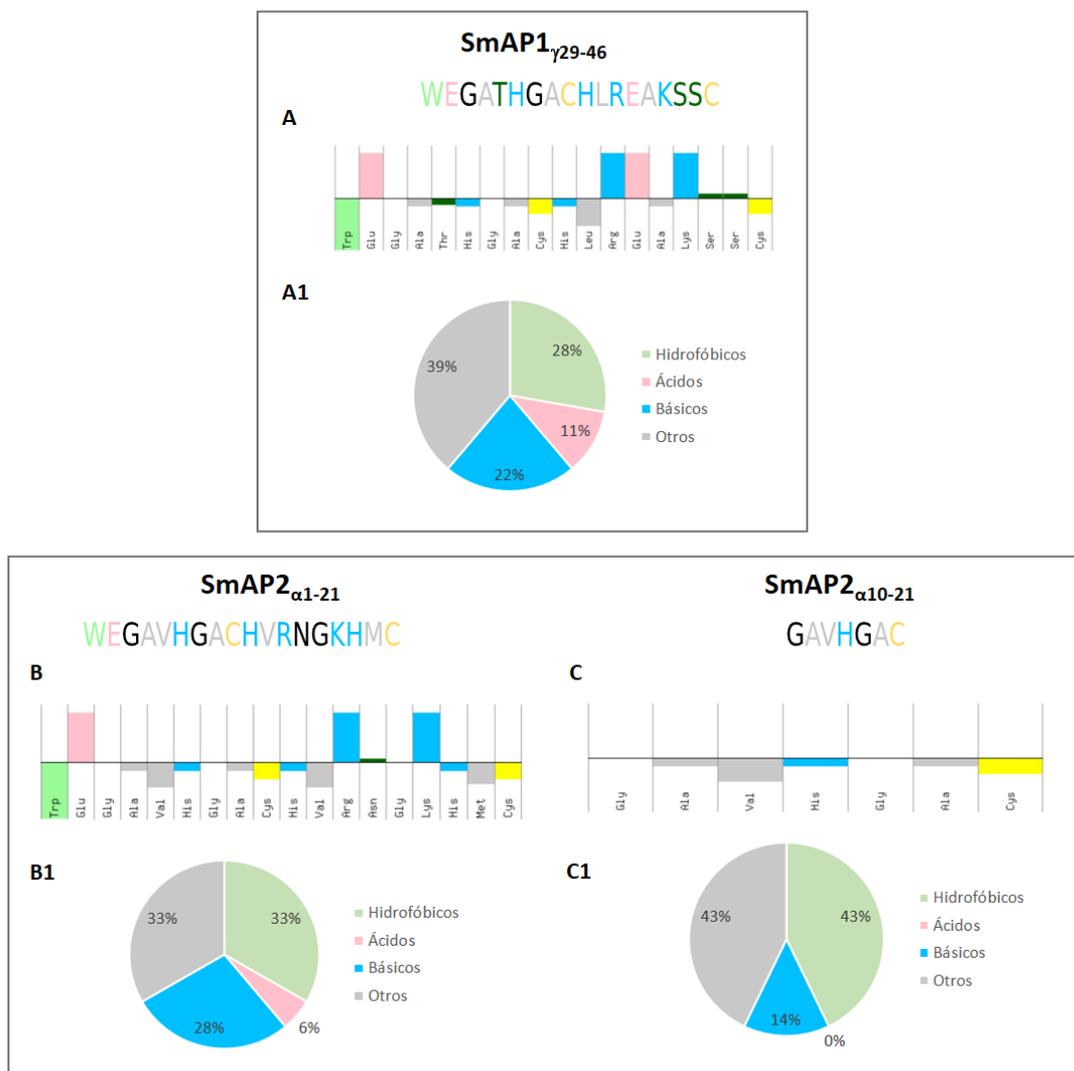


FIGURA 35 | Propiedades de los péptidos diseñados en base al motivo γ -core de las defensinas de *S. marianum*. En el recuadro superior se muestra el péptido derivado del γ -core de DefSm1D, mientras que en el inferior se muestran aquellos derivados del γ -core de DefSm2D. **(A), (B) y (C) Esquemas de hidropatía de las secuencias en base a la escala de Hopp & Woods.** El análisis fue realizado con PepCalc. La parte superior es hidrofílica mientras que la parte inferior es hidrofóbica. En color rosa se muestran los residuos ácidos, en verde claro los aromáticos, en celeste los básicos, en gris los alifáticos, en verde oscuro los polares y en amarillo las cisteínas. **(A1), (B1) y (C1) Distribución de la composición aminoacídica para cada péptido.**

Con respecto a los péptidos derivados del α -core, aquellos diseñados en base a la secuencia de DefSm1D presentan una mayor proporción de residuos ácidos en comparación con aquellos derivados de DefSm2D lo cual se correlaciona con el hecho de que estos últimos presentan una mayor carga neta positiva en función del pH. Este mismo comportamiento se observa en el caso

de los péptidos derivados de la región γ -core. En todos los casos, los residuos hidrofóbicos se encuentran bien representados en las secuencias de los péptidos.

4.3.2 Diseño de péptidos modificados

Teniendo en cuenta aquellos péptidos que fueron activos sobre el hongo *F. graminearum* se realizó un nuevo diseño racional efectuando modificaciones puntuales que pudiesen alterar su actividad y/o mecanismo de acción. Las variaciones propuestas se realizaron sobre el péptido más activo derivado del α -core de DefSm2D, dado que este motivo no ha sido aún estudiado en profundidad. Las modificaciones se introdujeron con el fin de evaluar si la actividad está relacionada únicamente con la carga total o depende de la identidad de los aminoácidos cargados positivamente en una cierta posición. También se diseñó un péptido cíclico asegurando la presencia de un enlace disulfuro intramolecular que pudiese promover el plegamiento en estructuras tipo horquillas- β con la finalidad de evaluar si con ello produce una alteración en la actividad del péptido.

La tabla 14 presenta las modificaciones introducidas empleando como plantilla el péptido SmAP2 $_{\alpha 1-21}$. La Figura 37 muestra las propiedades de dichas variantes.

TABLA 14 | Péptidos diseñados empleando como plantilla el péptido SmAP2 $_{\alpha 1-21}$.

Péptido	Modificación	¿Qué se evalúa?
SmAP2$_{\alpha 1-21}$ (péptido base)	X ₂ CX ₁₀ CGX ₂ RHCX	-
SmAP2H19R	X ₂ CX ₁₀ CGX ₂ R RXCX	Si RR, como ha sido demostrado para otros péptidos, puede otorgarle mayor poder de penetración o actividad antifúngica. Reemplazo de H por R aumenta la carga positiva.
SmAP2H19A	X ₂ CX ₁₀ CGX ₂ R ACX	Efecto del reemplazo por un aminoácido no polar.
cSmAP2C14S	X ₂ C X ₁₀ S GX ₂ RHCX	Si el enlace disulfuro intramolecular puede promover algún tipo de plegamiento secundario que produzca un incremento en la actividad.

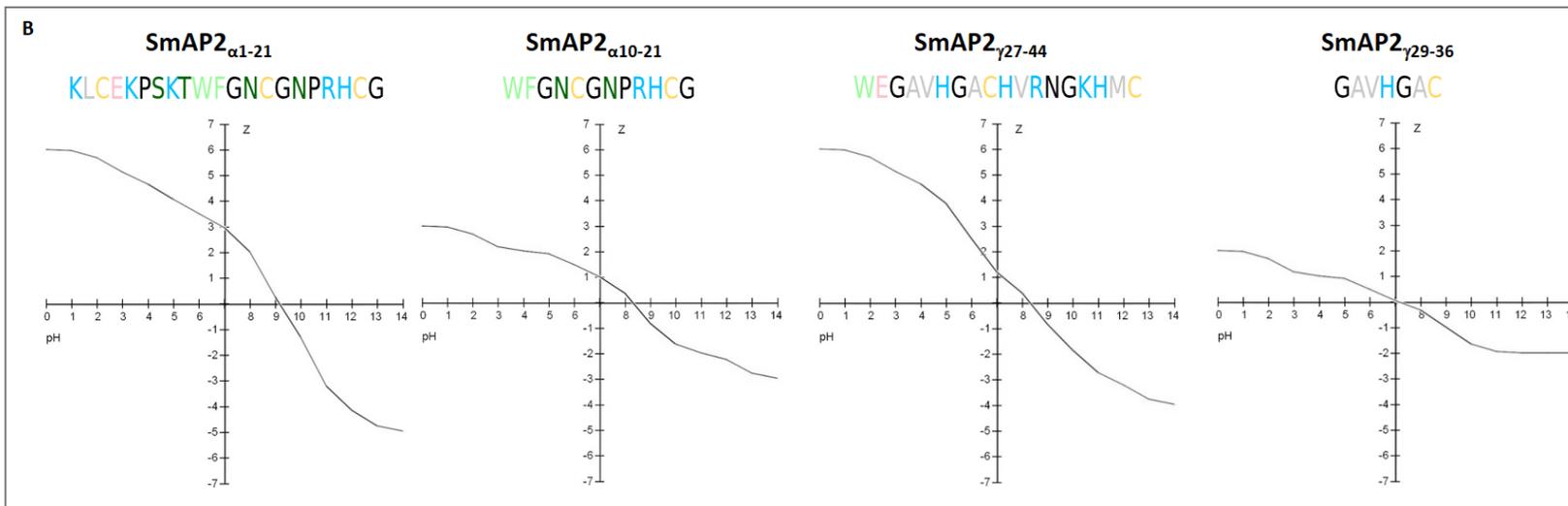
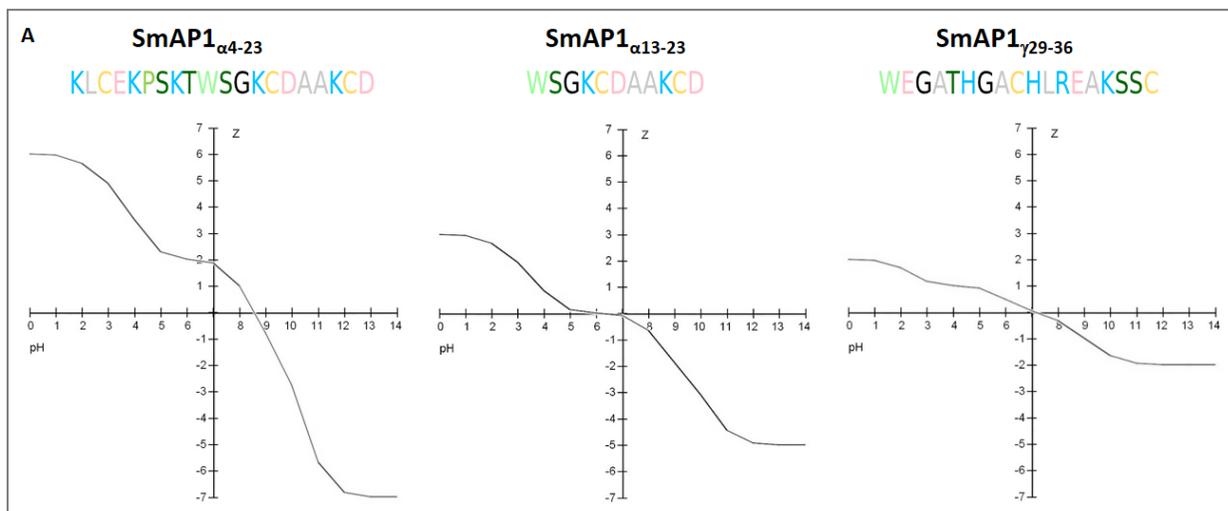


FIGURA 36 | Gráficos de carga neta (z) en función del pH de los péptidos diseñados. (A) Péptidos derivados de DefSm1D (B) Péptidos derivados de DefSm2D. Los gráficos fueron realizados empleando el software *PeptideCalculator* (Bachem).

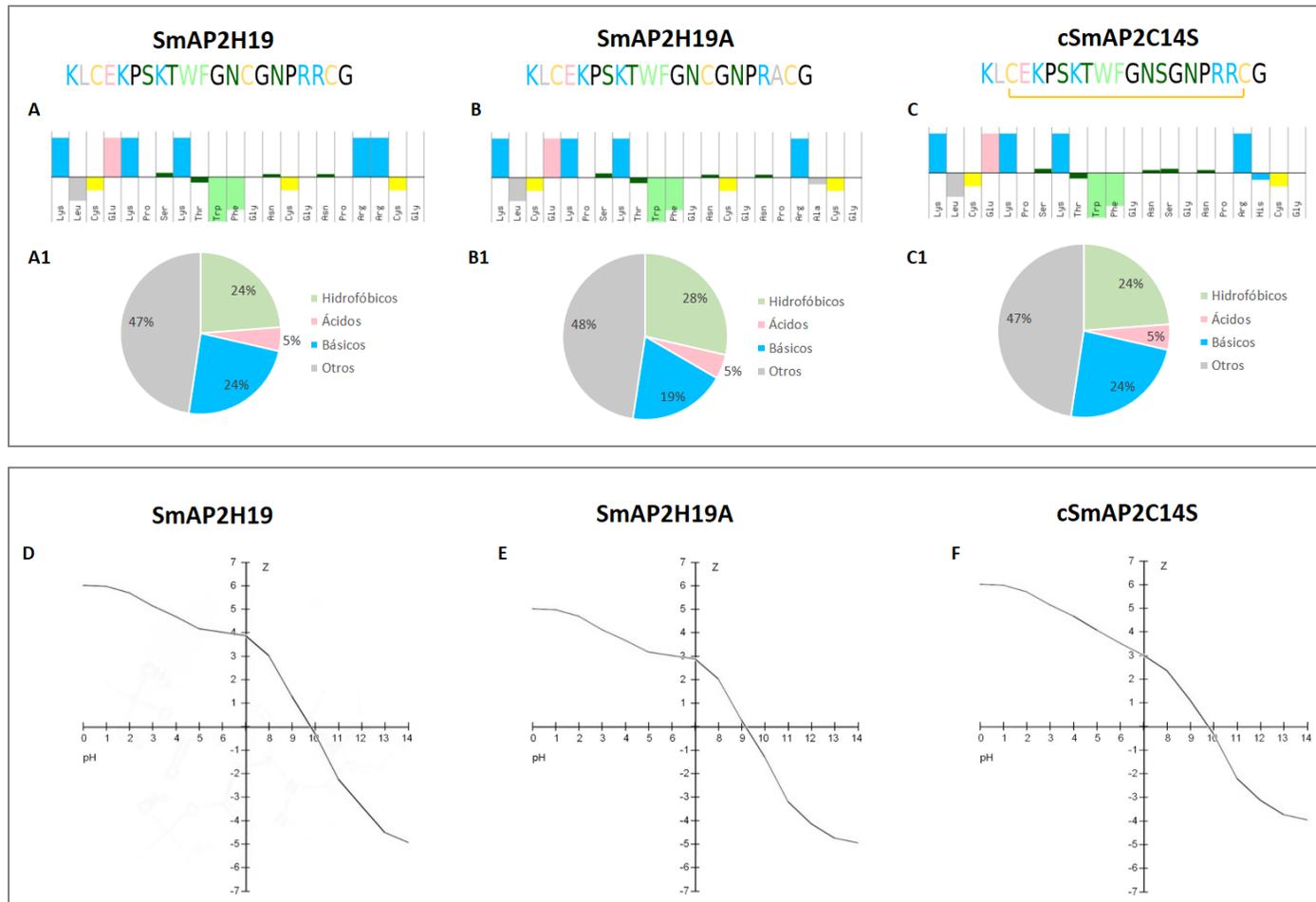


FIGURA 37 | Propiedades de las variantes diseñadas en base a los péptidos derivados del α -core de DefSm2D. (A), (B) y (C) Esquemas de hidropatía de las secuencias en base a la escala de Hopp & Woods. El análisis fue realizado con PepCalc. La parte superior es hidrofílica mientras que la parte inferior es hidrofóbica. En color rosa se muestran los residuos ácidos, en verde claro los aromáticos, en celeste los básicos, en gris los alifáticos, en verde oscuro los polares y en amarillo las cisteínas. (A1), (B1), y (C1) Distribución de la composición aminoacídica para cada péptido. (D), (E) y (F) Gráficos de carga neta (z) en función del pH. Los gráficos fueron realizados empleando el software *PeptideCalculator* (Bachem).

4.3.3 Síntesis química en fase sólida, purificación y caracterización de los péptidos

Se realizó la síntesis en fase sólida de los péptidos tomados como modelo en este estudio, mediante la estrategia de síntesis secuencial Fmoc/tBu, previamente descrita en la sección 3.2.3.1 del Capítulo III. La Tabla 15 resume las principales características de los péptidos sintetizados en este estudio. Las Figuras A1 a A8 del Anexo muestran los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC y los espectros de masas de los péptidos sintetizados por SPPS. El análisis de HPLC reveló en todos los casos la presencia de una mezcla de péptidos eluidos con diferentes tiempos de retención y la identidad del péptido más abundante fue caracterizada en cada caso por ESI-MS. Dichas fracciones fueron las utilizadas para realizar el subsecuente trabajo experimental. El análisis mostró que en el caso de cSmAP2C14S no se logró sintetizar el péptido deseado ya que el peso observado no coincidió con la masa teórica esperada. Esto pudo atribuirse a un acoplamiento no exitoso del aminoácido terminal de dicho péptido, un residuo de glicina. Las masas moleculares obtenidas para cada péptido se detallan en la Tabla 15.

TABLA 15 | Principales características de los péptidos sintetizados.

Péptido	Secuencia	Masa molecular predicha (Da) ¹	Masa molecular (Da)	pI ¹	Carga neta ²
Derivados de DefSm1D					
SmAP1_{α4-23}	KLCEKPSKTWSGKCDAAKCD	2200	2197,6	8,61	+2,2
SmAP1_{α13-23}	WSGKCDAAKCD	1180	1182,3	5,95	+0,3
SmAP1_{γ29-46}	WEGATHGACHLREAKSSC	1940	1942,2	6,91	+1,5
Derivados de DefSm2D					
SmAP2_{α1-21}	KLCEKPSKTWFGNCGNPRHCG	2360	2361,7	9,11	+4,0
SmAP2_{α10-21}	WFGNCGNPRHCG	1350	1346,5	8,08	+1,9
SmAP2_{γ27-44}	WEGAVHGACHVRNGKHMC	1990	1991,3	8,09	+3,8
SmAP2_{γ29-36}	GAVHGAC	613,69	613,9	6,73	+0,9
Péptidos derivados de SmAP2_{α1-21}					
SmAP2H19R	KLCEKPSKTWFGNCGNPRRCG	2382	2383,8	9,5	+4,1
SmAP2H19A	KLCEKPSKTWFGNCGNPRACG	2297	2297,7	9,11	+3,0
cSmAP2C14S	KLCEKPSKTWFGNSGNPRHCG	2347	2289	9,39	+3,9

¹Tanto la masa como el pI teórico de los péptidos fue calculado con el servidor Compute pI/Mw de ExPASy (https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool)

²La carga neta expresada en la tabla se calculó a pH 5,5 que es el pH al cual se realizaron los ensayos de actividad biológica. Se empleó para su cálculo el servidor *PeptideCalculator* (<https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>).

De aquellos péptidos que exhibieron actividad biológica se realizaron los estudios de espectroscopía de dicroísmo circular a fin de determinar su estructura secundaria. La forma general de los espectros de CD de los péptidos SmAP2_{α1-21}, SmAP2_{α10-21} y SmAP2_{γ27-44} se muestran en la Figura 38A, 38B y 38C, respectivamente.

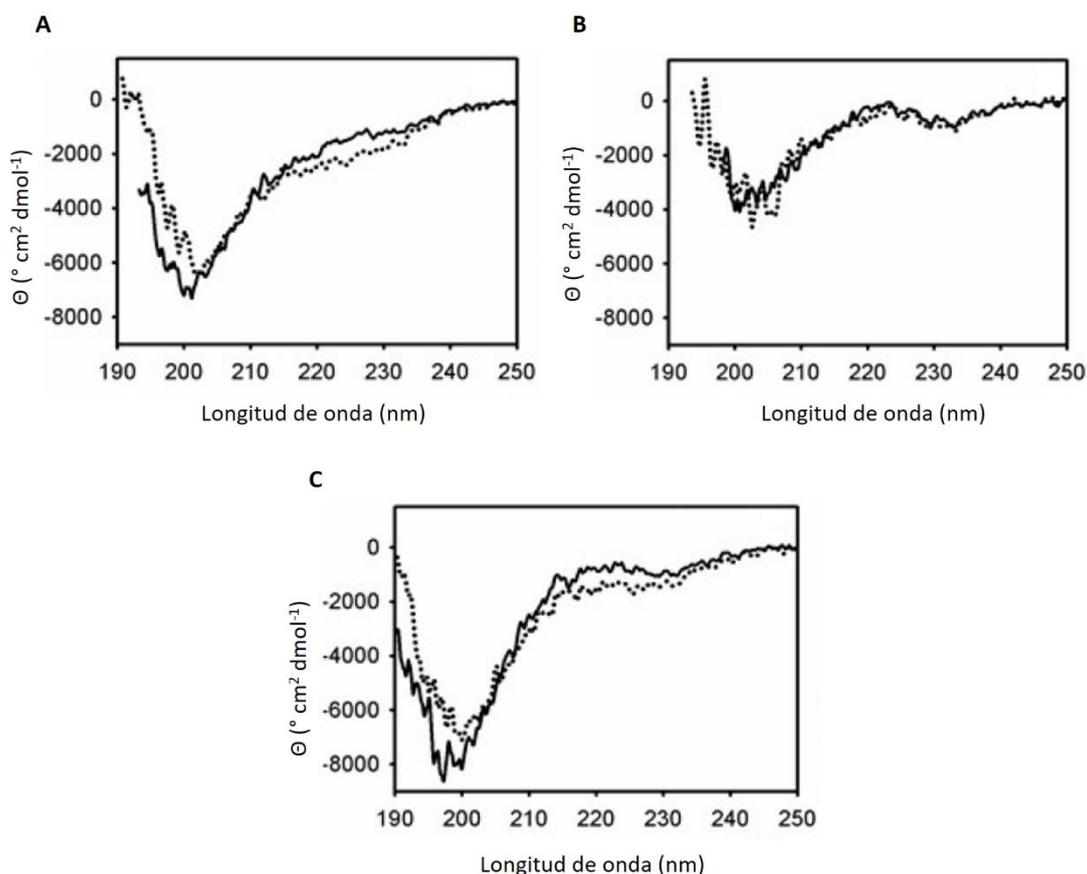


FIGURA 38 | Espectroscopía de dicroísmo circular de los péptidos derivados de la defensina DefSm2D. (A) SmAP2_{α1-21}, (B) SmAP2_{α10-21} y (C) SmAP2_{γ27-44}. Se muestran los espectros de CD de UV lejano de cada péptido. Las muestras de péptidos fueron disueltas en agua (línea continua) o en TFE acuoso al 25% v/v (línea punteada).

Estos resultados sugieren que los péptidos derivados de DefSm2D adoptan predominantemente una conformación *random coil* en agua. El trifluoroetanol es ampliamente reconocido como un codisolvente útil para evaluar la propensión a la formación de estructura secundaria en péptidos y proteínas. Su modo de acción general es promover la formación de estructuras secundarias (hélice α y horquilla β) en polipéptidos. Se evaluaron los espectros UV-CD lejanos de los péptidos luego de ser incubados con TFE para evaluar su comportamiento estructural. Los péptidos

SmAP_{α1-21} y SmAP_{α10-21}, que mapean la secuencia del α -core, muestran un mínimo incremento en las bandas de elipticidad negativas ubicadas en el rango de 215-230 nm, lo que sugeriría una ganancia marginal de estructura tras la exposición a TFE. No obstante, para los tres péptidos, el patrón general de las bandas de UV-CD lejanas, tanto en posición como en intensidad, se mantuvo incluso a alta concentración de TFE ensayada (25% v/v). Los espectros de CD de los péptidos modificados SmAP2H19R, SmAP2H19A y SmAP2H19R se muestran en la Figura 39A, 39B y 39C, respectivamente. En los tres casos se observó que, en presencia de TFE, los péptidos adoptarían una conformación β -turn y en el caso del péptido cíclico se evidenció una leve tendencia helical dada por la banda positiva hacia 190 nm que podría atribuirse a la presencia del enlace disulfuro.

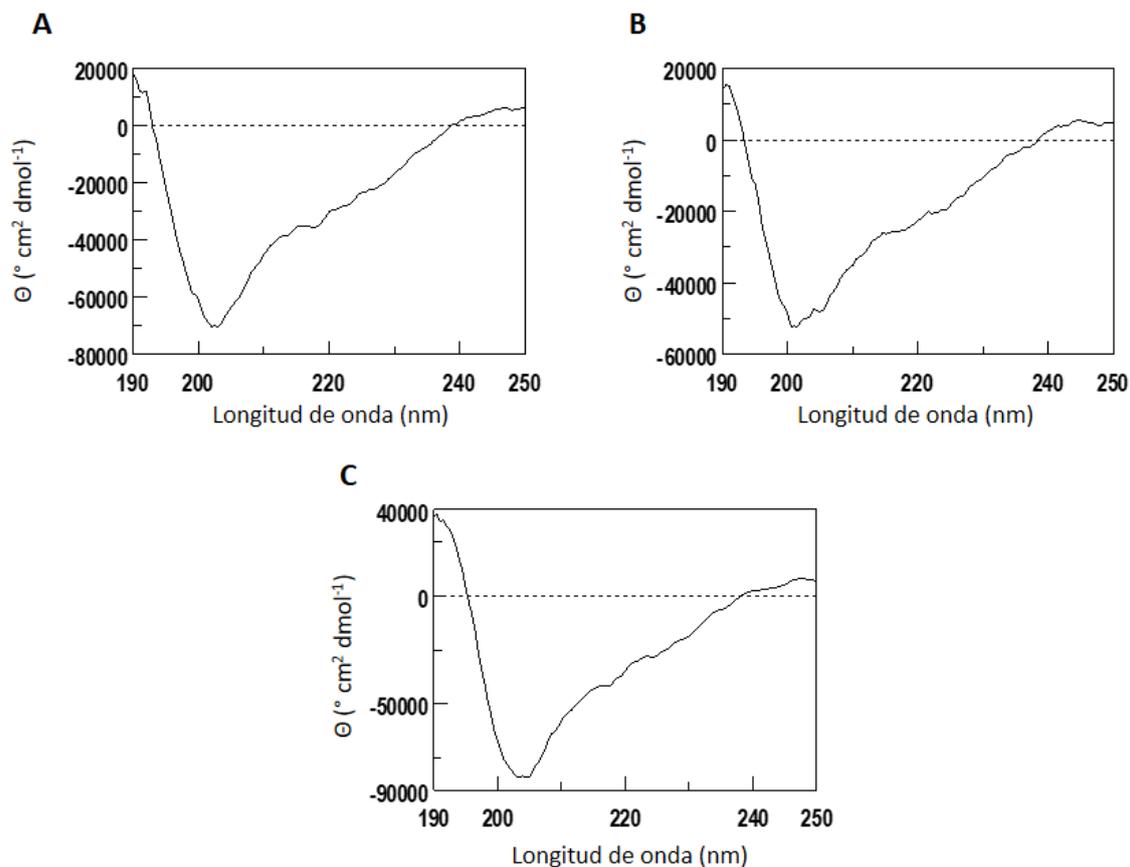


FIGURA 39 | Espectroscopía de dicroísmo circular de los péptidos con modificaciones, derivados de la defensina DefSm2D. (A) SmAP2H19R, (B) SmAP2H19A y (C) cSmAP2C14S. Se muestran los espectros de CD de UV lejano de cada péptido en TFE al 25% v/v.

4.3.4 Screening de la actividad antifúngica de los péptidos sintetizados sobre *Fusarium graminearum* y la levadura *Candida albicans*

Se estudió la actividad antifúngica de los péptidos sintetizados realizando un *screening* sobre el hongo fitopatógeno *F. graminearum* y la levadura *Candida albicans*, un patógeno humano oportunista.

Para *C. albicans*, se monitoreó el efecto de los péptidos sobre el crecimiento de una cepa de la levadura de la colección ATCC según una metodología de dilución en caldo, comparándose el resultado con el obtenido para el surfactante comercial cetrimide. Ninguno de los péptidos que se probaron fueron capaces de inhibir el crecimiento de la levadura a la máxima concentración ensayada (100 μM), mientras que el surfactante comercial produjo inhibición completa del crecimiento.

En el caso del hongo filamentoso ensayado, se analizó el efecto de los péptidos sobre las esporas de reproducción asexual denominadas conidios, estructuras dotadas de gruesas paredes celulares. Con el fin de determinar la acción de los péptidos sobre la cinética de crecimiento de los hongos del género *Fusarium*, se optimizó una metodología de medición en una microplaca de 96 pocillos. Como primera aproximación se realizaron ensayos empleando concentraciones de péptido de 4 y 40 μM , teniendo en consideración que las defensinas vegetales ejercen su efecto en concentraciones del orden micromolar (Shafee et al., 2017). Los cambios en la densidad óptica a lo largo del tiempo en presencia de concentraciones crecientes de cada péptido se muestran en la Figura 40A para aquellos derivados de la defensina DefSm1D y en la Figura 41A para los derivados de DefSm2D. Los péptidos derivados de DefSm1D no exhibieron actividad en las condiciones del ensayo, mientras que tres de los cuatro péptidos derivados de DefSm2D produjeron una inhibición fúngica significativa en comparación con el control del crecimiento (Figuras 40B y 41B). Los péptidos que no mostraron actividad en estos ensayos se probaron a una concentración de 100 μM y tampoco produjeron diferencias en el crecimiento del hongo respecto al control de crecimiento.

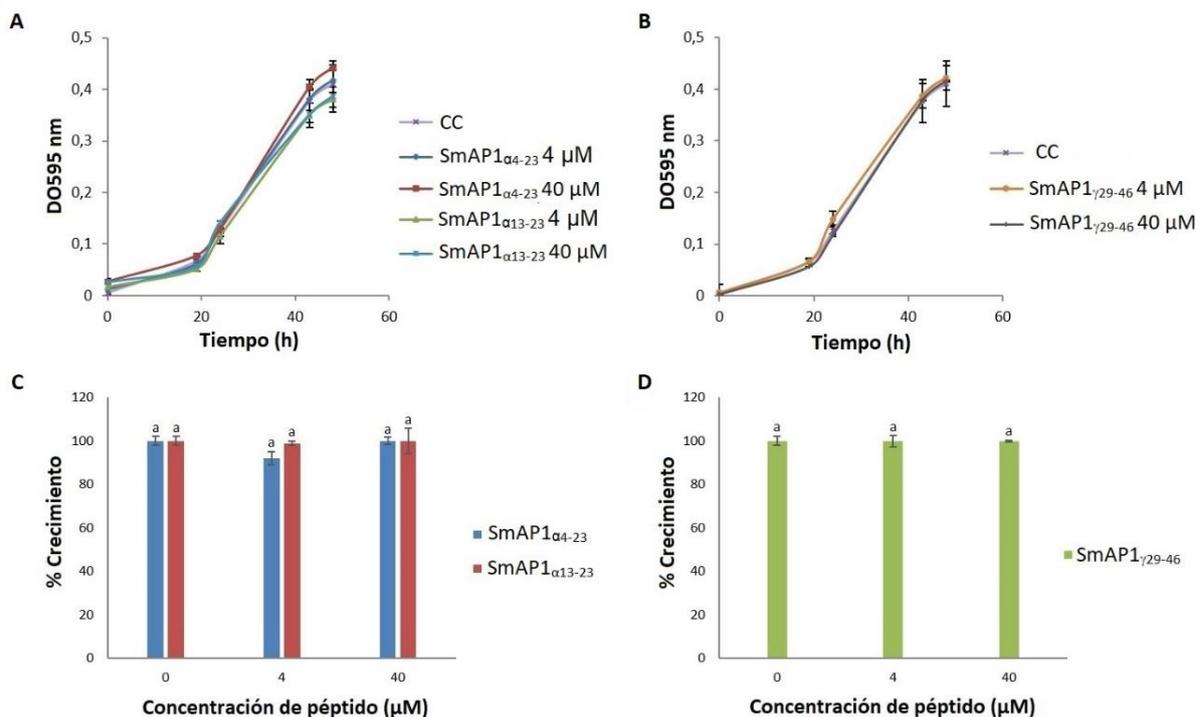


FIGURA 40 | Actividad de los péptidos derivados de DefSm1D sobre la cinética de crecimiento *Fusarium graminearum*. (A) y (B) Curvas de crecimiento en presencia de las concentraciones 4 y 40 μ M de péptidos derivados de la región α -core y γ -core de DefSm1D, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados técnicos. DO595 nm es la absorbancia a 595 nm. CC es el control de crecimiento. (C) y (D) Porcentaje de crecimiento del hongo a las 48 h de incubación en presencia de las concentraciones 4 y 40 μ M de péptidos derivados de la región α -core y γ -core de DefSm1D, respectivamente. Las barras representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de crecimiento en relación con el 100% del crecimiento correspondiente al control, definido como el crecimiento de hongos en ausencia de péptido. Los tratamientos con la misma letra no difieren significativamente ($p > 0.05$).

4.3.5 Efecto de los péptidos sintéticos sobre *Fusarium graminearum*

4.3.5.1 Concentración inhibitoria mínima

Para los péptidos derivados de DefSm2D que mostraron actividad se realizaron nuevas pruebas de actividad ajustando los valores de concentración en función de los resultados obtenidos en el ensayo preliminar para así determinar la concentración inhibitoria mínima, entendida como la mínima concentración de péptido a la cual no se observa desarrollo fúngico en las condiciones

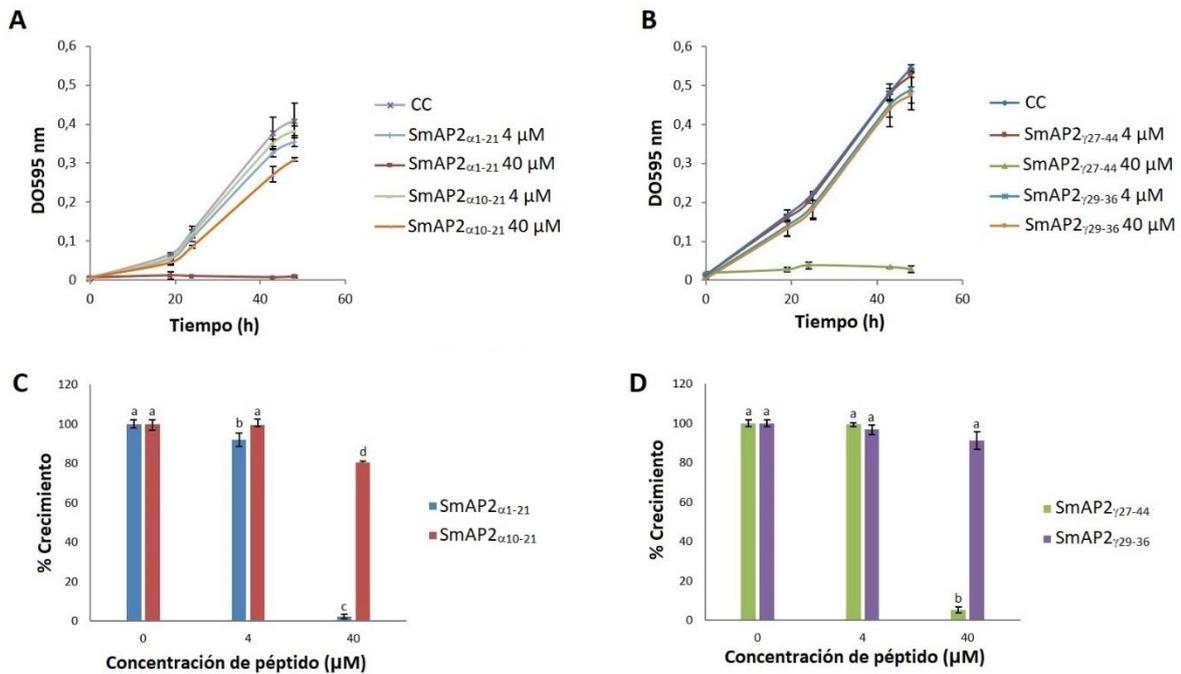


FIGURA 41 | Actividad de los péptidos derivados de DefSm2D sobre la cinética de crecimiento *Fusarium graminearum*. (A) y (B) Curvas de crecimiento en presencia de las concentraciones 4 y 40 μ M de péptidos derivados de la región α -core y γ -core de DefSm2D, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados técnicos. DO595 nm es la absorbancia a 595 nm. (C) y (D) Porcentaje de crecimiento del hongo a las 48 h de incubación en presencia de las concentraciones 4 y 40 μ M de péptidos derivados de la región α -core y γ -core de DefSm2D, respectivamente. Las barras representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de crecimiento en relación con el 100% del crecimiento correspondiente al control, definido como el crecimiento de hongos en ausencia de péptido. Los tratamientos con la misma letra no difieren significativamente ($p > 0.05$).

del ensayo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 42. El péptido más activo resultó ser el derivado de la región γ -core con una CIM de 20 μ M. En cuanto a los péptidos derivados del α -core, la comparación entre ambos reveló que el péptido más largo es más eficaz que el más corto, tal como era de esperar por la presencia adicional de residuos cargados positivamente.

4.3.5.2 Tiempo de muerte-time to kill

Para conocer el tiempo en el cual los péptidos más activos fueron capaces de producir la muerte de los conidios de *F. graminearum* se realizó el ensayo de tiempo de muerte incubando los

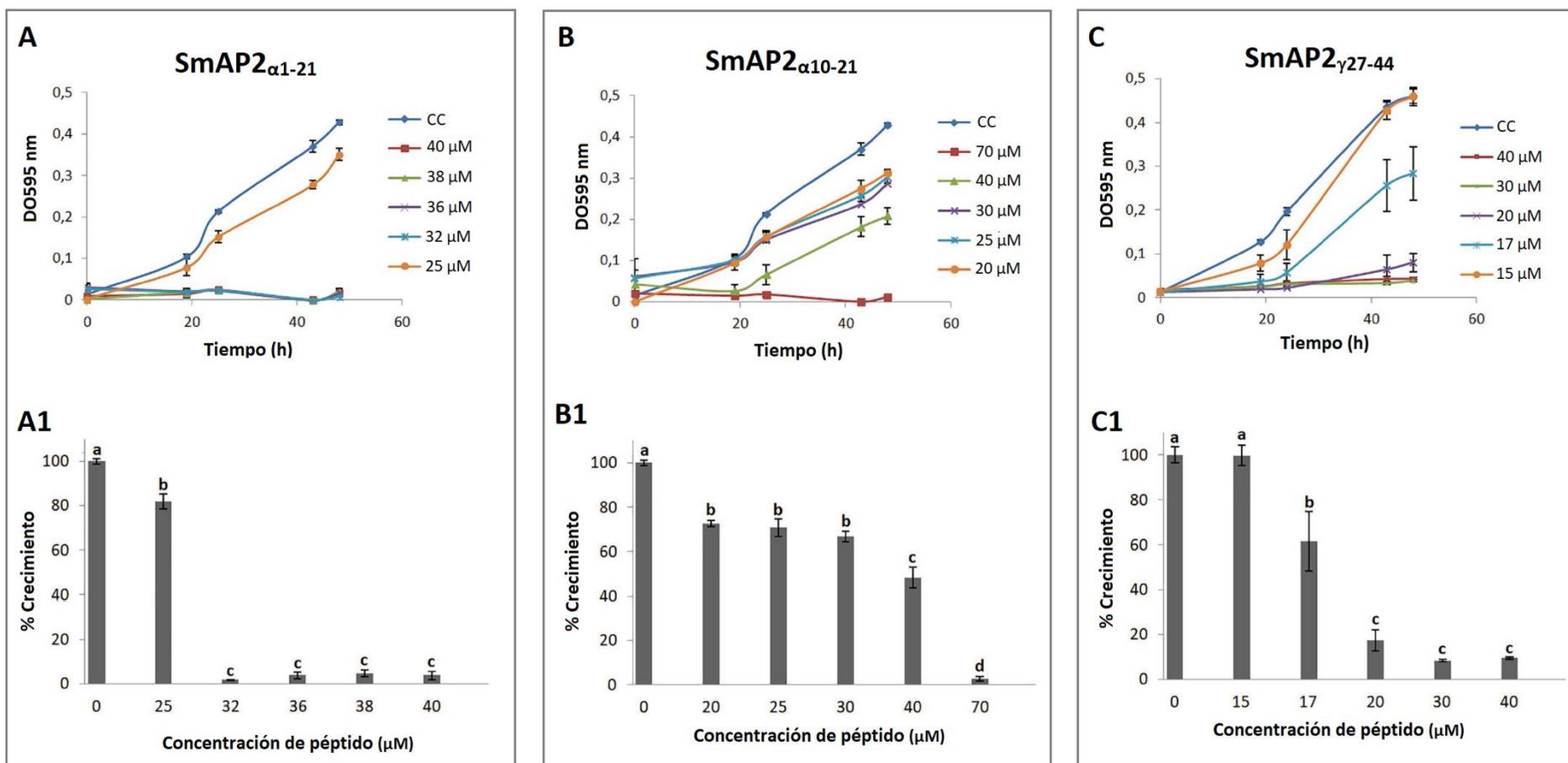


FIGURA 42 | Determinación de la CIM de los péptidos derivados de DefSm2D. (A), (B) y (C) Curvas de crecimiento de *F. graminearum* en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos SmAP2 α 1-21, SmAP2 α 10-21 y SmAP2 γ 27-44, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados técnicos. DO595 nm es la absorbancia a 595 nm. CC es el control de crecimiento. (A1), (B1) y (C1) Porcentaje de crecimiento de *F. graminearum* a las 48 h de incubación en presencia de distintas concentraciones de péptido SmAP2 α 1-21, SmAP2 α 10-21 y SmAP2 γ 27-44, respectivamente. Las barras representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de crecimiento en relación con el 100% del crecimiento correspondiente al control, definido como el crecimiento de hongos en ausencia de péptido. Los tratamientos con la misma letra no difieren significativamente ($p > 0.05$).

conidios con los péptidos a distintos tiempos y plaqueando en placas con medio PDA, tal como se detalla en la sección 3.2.3.7.7 del capítulo III. Tanto SmAP2 _{α 1-21} como SmAP2 _{γ 27-44} resultaron ser letales para los conidios a distintos tiempos de incubación (Figura 43). En las condiciones del ensayo, estos péptidos pudieron ejercer su actividad dentro de las 0,5 h en el caso de SmAP2 _{γ 27-44} y entre 1 y 3 h de incubación para SmAP2 _{α 1-21}.

4.3.5.3 Aproximación al mecanismo de acción de los péptidos derivados de DefSm2D

4.3.5.3.1 Permeabilización de membrana

Para estudiar si el efecto antifúngico de los péptidos derivados de DefSm2D podría involucrar la desestabilización de la membrana plasmática de los conidios del hongo, se evaluó la integridad de la misma mediante microscopía de fluorescencia y el empleo de una sonda impermeable fluorescente. Durante los ensayos se analizó la captación de yoduro de propidio (IP) por conidios de *F. graminearum* tratados con los péptidos o cetrimide como control positivo. La incorporación de IP en conidios tratados con los péptidos fue evidenciada por la observación de fluorescencia roja intensa, mientras que no se detectó fluorescencia en los conidios en ausencia de los mismos (Figura 44). Estos resultados sugieren que, gracias a su carga positiva, todos los péptidos conducen a la permeabilización de la membrana celular (cargada negativamente), comprometiendo entonces la integridad de la misma. A su vez, se observó que en presencia de los péptidos derivados del α -core, se produjo un efecto de agregación de los macroconidios (Figura 44, flechas blancas). Aunque SmAP2 _{γ 27-44} y el tensioactivo utilizado como control positivo también indujeron la permeabilización de la membrana de esporas de *F. graminearum*, no se formaron en ninguno de los casos los agregados descritos anteriormente.

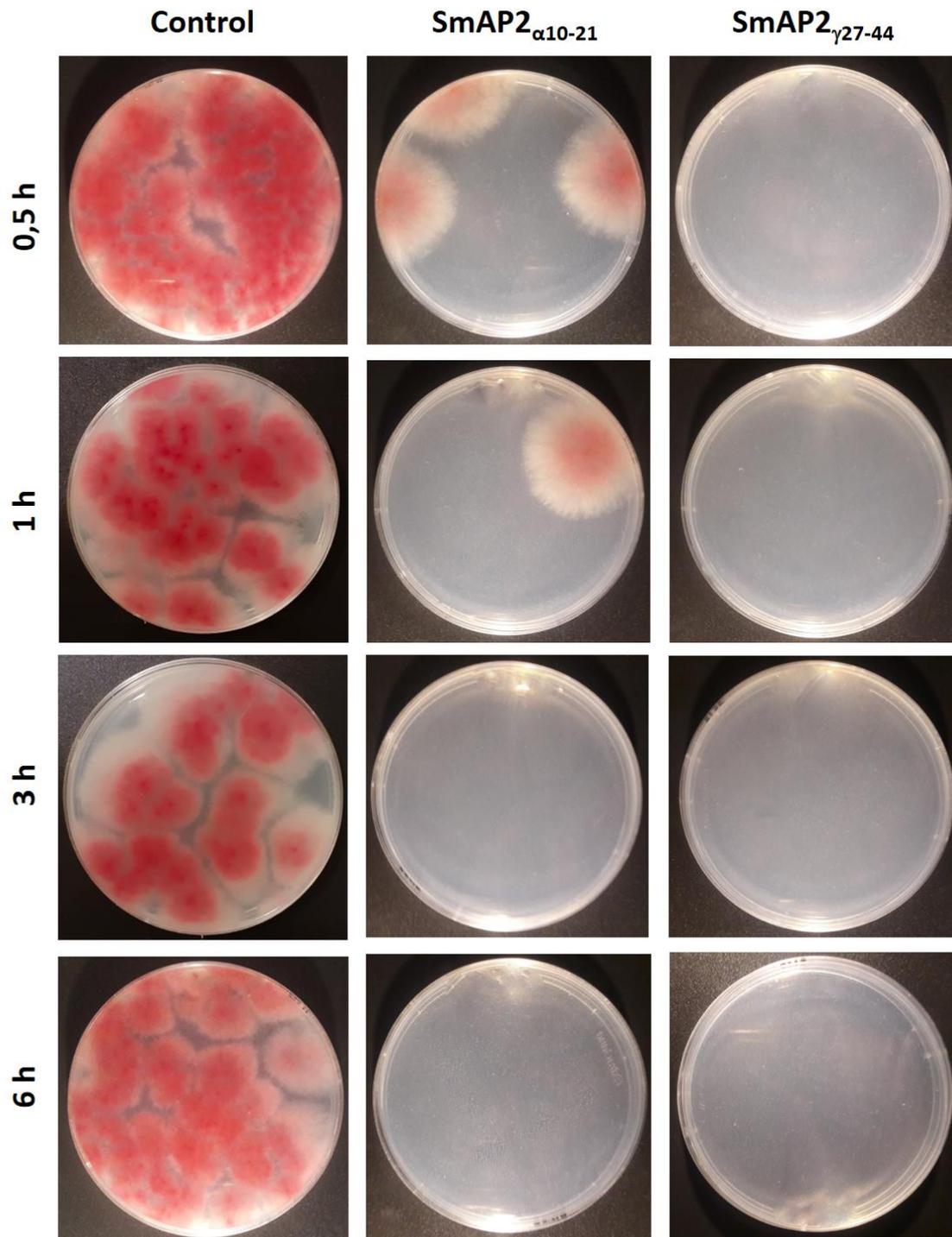


FIGURA 43 | Crecimiento de *F. graminearum* en placas de APG incubadas durante 72 h a 25 °C en presencia de los péptidos SmAP2_{α1-21} y SmAP2_{γ27-44}. Se muestran los tratamientos para cuatro tiempos: 0,5, 1, 3 y 6 h.

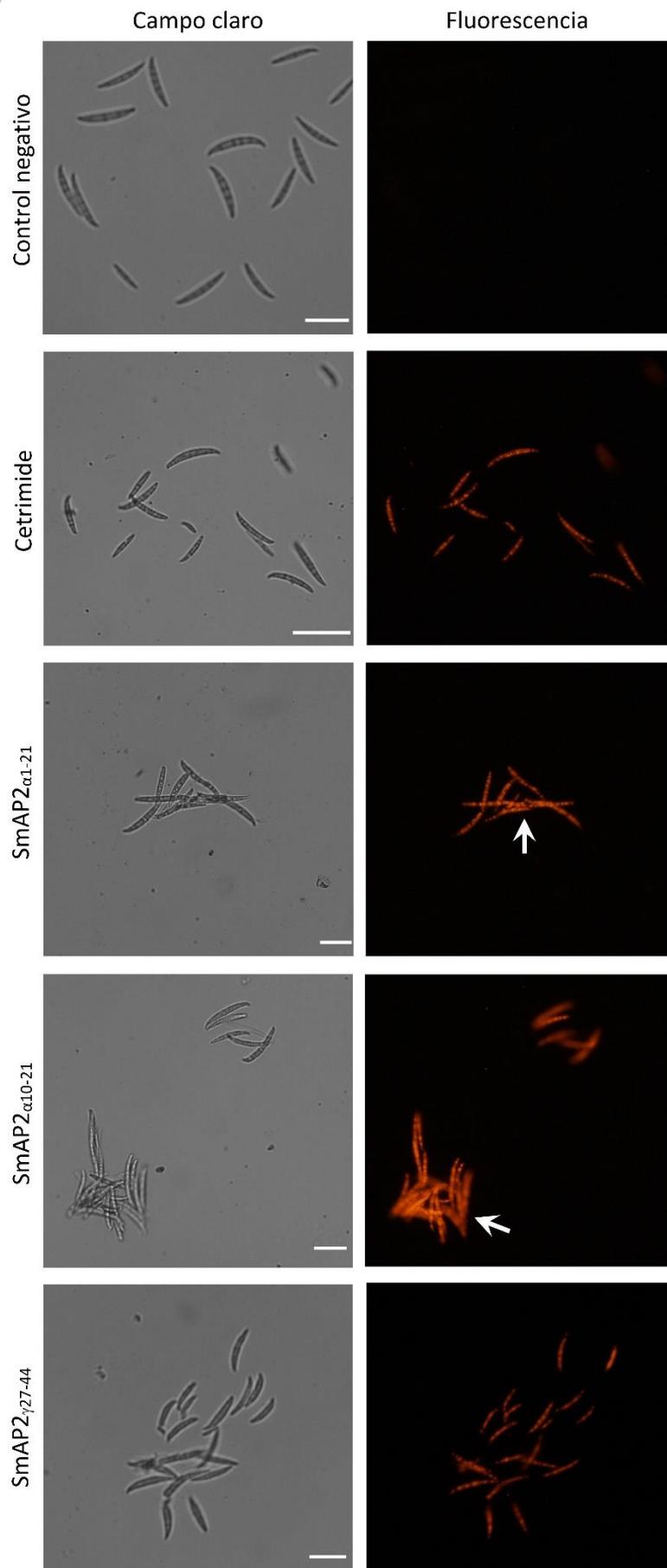


FIGURA 44 | Imágenes de campo claro (izquierda) y fluorescencia (derecha) de conidios de *F. graminearum* incubados con los péptidos derivados de DefSm2D a su CIM durante 1 h y con el fluoróforo yoduro de propidio. Cetrimide es el tensioactivo catiónico bromuro de cetil trimetil amonio, utilizado como control positivo. Los péptidos de la región del α -core, SmAP2_{α1-21} y SmAP2_{α10-21}, produjeron la agregación de conidios en grupos (flechas blancas). Barra=20 μ M.

4.3.5.3.2 Inducción de estrés oxidativo

En investigaciones previas ha sido descrito que muchos péptidos antimicrobianos actúan, además de a través de la desestabilización de la membrana, induciendo la muerte celular al estimular la producción de especies reactivas de oxígeno–ROS (Hayes et al., 2013). Las ROS también pueden funcionar como mediadores en diversas cascadas de señalización intracelular. Se investigó si la acción antifúngica de los péptidos SmAP2_{α1-21} y SmAP2_{γ27-44} involucra procesos vinculados a estrés oxidativo en los conidios tratados. Para ello, tal como se detalla en la sección 3.2.3.7.8 del Capítulo III, se empleó la sonda H₂DCFDA, que permite evaluar la presencia *in situ* de distintas ROS. Esta sonda es capaz de difundir al interior celular donde es desacetilada por esterasas celulares a un compuesto no fluorescente que en presencia de ROS es oxidado a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), una especie altamente fluorescente. La evaluación de ROS en conidios tratados con los péptidos se realizó tanto a través de espectroscopía de fluorescencia (Figuras 45) como por microscopía confocal (Figura 46). A través de las dos metodologías empleadas se

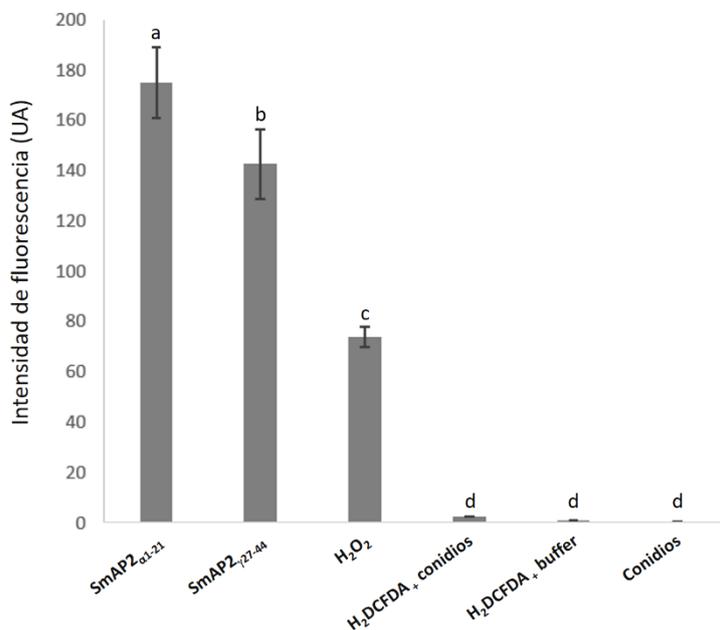


FIGURA 45 | Producción de ROS inducida en conidios de *F. graminearum* por los péptidos SmAP2_{α1-21} y SmAP2_{γ27-44}. Se empleó la sonda H₂DCFDA. La fluorescencia emitida por las células se midió a una longitud de onda de excitación de 492 nm y una longitud de onda de emisión de 527 nm. Se expresa la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias. Cada tratamiento representa la media de tres réplicas independientes.

verificó la producción de ROS luego de 90 minutos de tratamiento, lo cual no fue detectado en las esporas tratadas con agua (control), evidenciando entonces que la inducción de estrés oxidativo podría ser parte del mecanismo antifúngico de los péptidos ensayados.

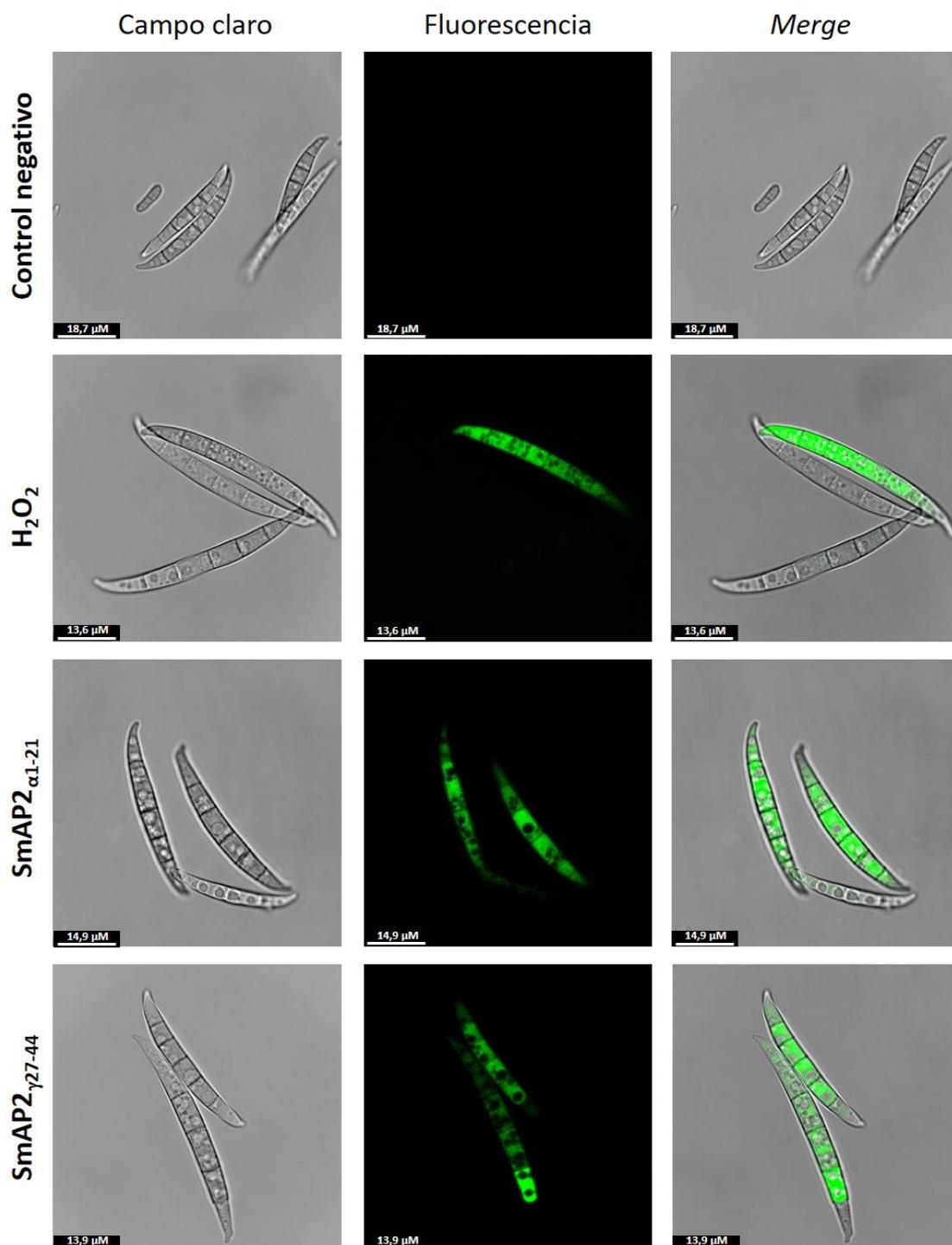


FIGURA 46 | Producción de ROS detectada con la sonda H₂DCFDA sobre conidios tratados con los péptidos, H₂O₂ (control positivo) o agua (control negativo). Se observan las imágenes de campo claro (izquierda), la fluorescencia verde (DCF, centro) y a la derecha el *merge* (superposición de las dos imágenes anteriores). La barra indica tamaño en μM .

Cabe destacar que, a tiempos menores de incubación, no se observó fluorescencia en los conidios tratados en ninguno de los casos sugiriendo que el proceso de inducción de estrés oxidativo tiene una dinámica temporal particular.

4.3.5.3.3 Estudio de la inserción de los péptidos en monocapas lipídicas

Con el objetivo de estudiar el mecanismo antifúngico de los péptidos más activos derivados de DefSm2D, se estudió su interacción con monocapas lipídicas como sistema modelo de membrana, utilizando un tensiómetro de Langmuir tal como se detalla en la Sección 3.2.3.7.10 del Capítulo III. Se evaluó la interacción de los péptidos con membranas compuestas por POPC/Ergosterol en relación molar similar a la encontrada en los hongos (3:1). La Figura 47 muestra las curvas de presión superficial en función del tiempo, para SmAP2_{α1-21} y SmAP2_{γ27-44}, a distintos valores de presión inicial.

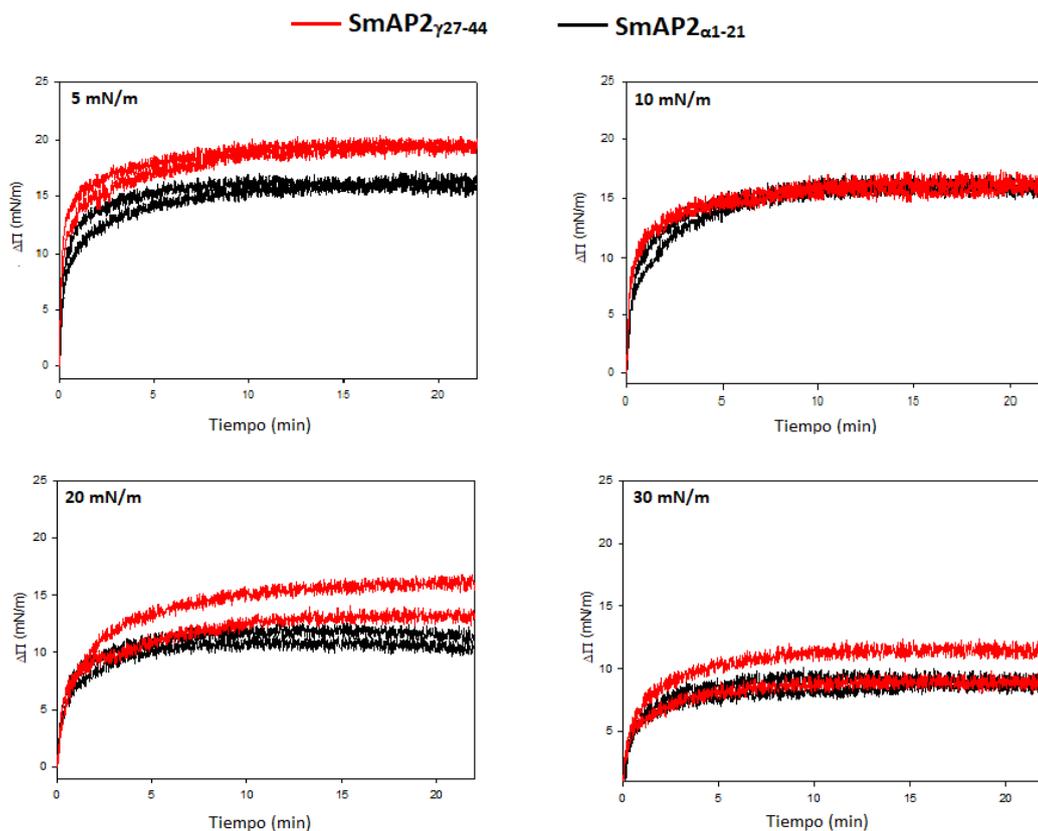


FIGURA 47 | Cinéticas de inserción de SmAP2_{α1-21} (curvas color negro) y SmAP2_{γ27-44} (curvas color rojo) en una monocapa lipídica compuesta por POPC/Ergosterol en una relación molar 3:1. Se muestran las curvas para una presión lateral inicial (Π_0) de 5, 10, 20 y 30 mN/m a 20 ± 1 °C. Ambos péptidos fueron ensayados a una concentración de 20 μ M.

En ambos casos se observó una rápida interacción de los péptidos con las monocapas lipídicas luego de su inyección en la subfase lo que da cuenta de una cinética de asociación rápida a monocapas de POCP/Ergosterol, a todas las presiones iniciales ensayadas. Se observa que, al aumentar la presión inicial menor es el aumento de presión generado por los péptidos debido a que al ser mayor es el empaquetamiento lipídico, resulta más difícil su inserción en la monocapa. El aumento en la presión superficial fue de 8,8669 mN/m para SmAP2 $_{\alpha 1-21}$, observándose un efecto mayor en el caso de SmAP2 $_{\gamma 27-44}$ con un valor de $\Delta\Pi$ de 10,1696 mN/m, a una concentración de 20 μM . La Figura 48 muestra las gráficas de $\Delta\Pi$ en función de la presión superficial inicial (Π_0) para cada péptido. A partir de las mismas se pudo calcular la presión de exclusión o presión crítica (Π_c), por extrapolación al eje de las abscisas. Π_c es la presión superficial máxima de inserción, es decir, aquella a partir de la cual no se produciría inserción de péptidos en la monocapa. Los cálculos revelaron valores de $\Delta\Pi_c$ para una membrana de composición similar a la membrana fúngica de 53,8 y 49,7 mN/m para SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ y SmAP2 $_{\gamma 27-44}$, respectivamente. Estos resultados indican que ambos compuestos son capaces de interactuar con los lípidos de las monocapas, siendo mayor la interacción en el caso de SmAP2 $_{\gamma 27-44}$, resultado que podría correlacionarse con el mayor poder antifúngico observado para este compuesto.

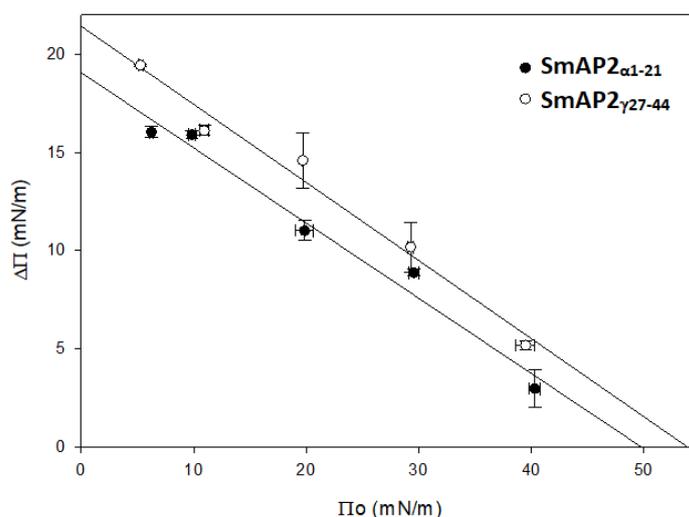


FIGURA 48 | Cambios en la presión superficial ($\Delta\Pi$) vs. Π_0 luego de 10 min de interacción de SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ y SmAP2 $_{\gamma 27-44}$ con una monocapa lipídica POCP/ERG (3:1). Los valores de $\Delta\Pi_c$ fueron obtenidos por extrapolación a $\Delta\Pi=0$.

4.3.5.3.4 Efecto sobre la ultraestructura de conidios

Se empleó la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión para continuar profundizando el estudio de los péptidos más activos derivados de DefSm2D y con el objetivo de evaluar si los mismos son capaces de producir algún efecto sobre la ultraestructura de los conidios de *F. graminearum*. Se tomaron imágenes de conidios expuestos a SmAP2_{α1-21} y SmAP2_{γ27-44} luego de 1 hora de incubación. Las imágenes revelaron una apariencia festoneada alrededor de las células luego del tratamiento con SmAP2_{α1-21} (Figura 49, flechas negras), lo que sugiere que este péptido ejercería un efecto notable sobre la capa más externa de la pared celular. Además, las células presentaron un citoplasma granular y desorganizado. SmAP2_{γ27-44} no produjo el mismo efecto sobre los conidios, pero fue posible observar algunos signos de deterioro celular, incluyendo la segregación del citoplasma de la periferia celular (Figura 49, flecha blanca), vesiculización e incluso desorganización total del citoplasma y las organelas (Figura 50). En ambos casos, se observó un aumento de la densidad electrónica y la presencia de un gran número de peroxisomas electrón-densos en torno a la membrana y pared celular, con respecto a las células no tratadas (Figuras 49 y 50).

4.3.5.3.5 Localización subcelular del péptido SmAP2_{α1-21} derivado del α-core

Con el objetivo de profundizar en el estudio del mecanismo de acción del péptido SmAP2_{α1-21}, se estudió su localización subcelular en conidios tratados con el péptido marcado con fluoresceína a través de microscopía confocal. La Figura 51 muestra la localización del péptido en los conidios tratados a distintos tiempos de incubación. Con rojo se observa la pared celular marcada con el colorante azul de tripán, que exhibe fluorescencia roja cuando se une a quitina y glucanos, componentes de la pared. A tiempos cortos (30 min), se observa que el péptido comienza a internalizarse en los conidios, ingresando en primer lugar a través de las células basales y apicales de los macroconidios.

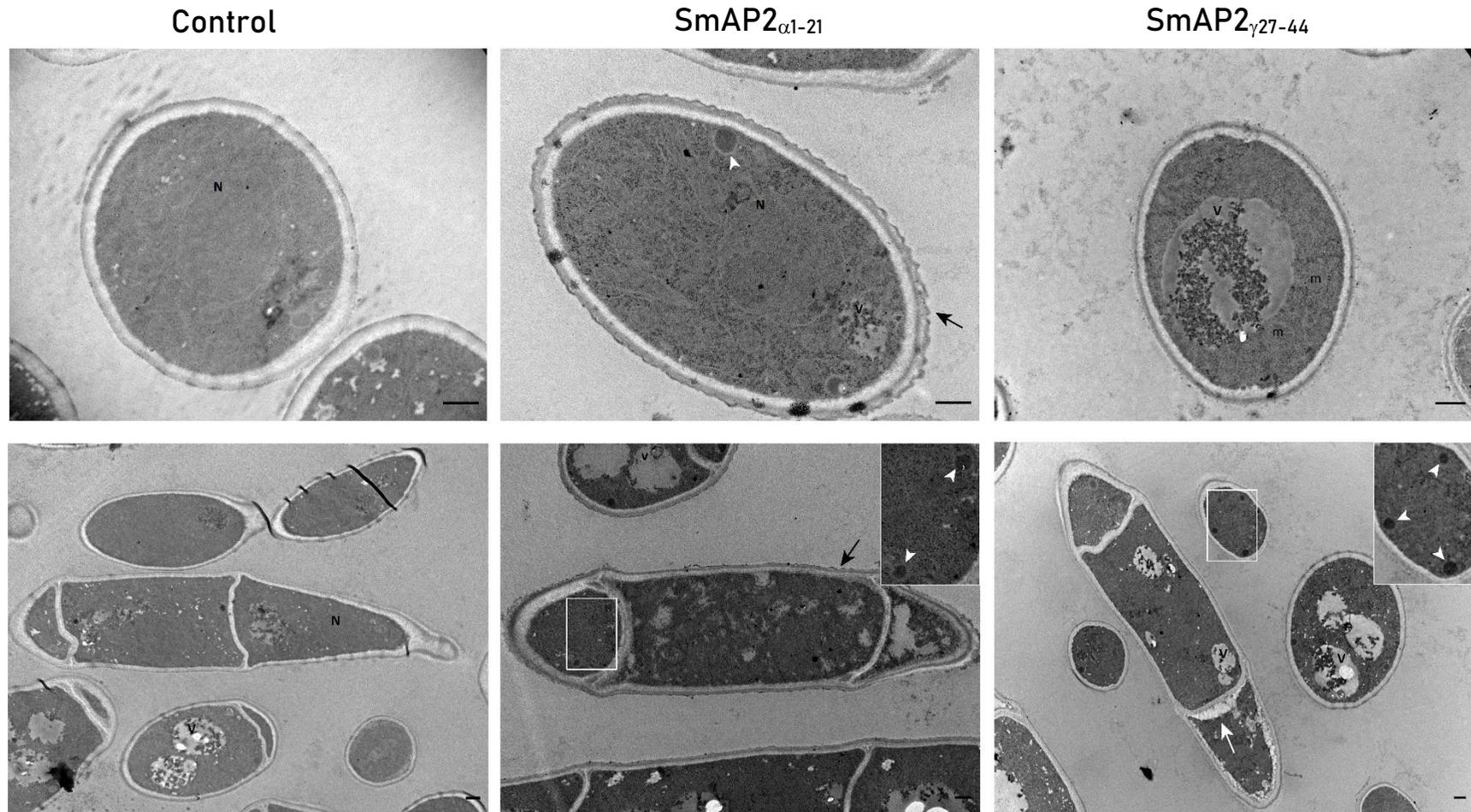


FIGURA 49 | Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de conidios de *F. graminearum* incubados con péptidos SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ y SmAP2 $_{\gamma 27-44}$ a su CIM durante 1 h. Se observó un aspecto festoneado alrededor de las células tratadas con SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ (flechas negras). Con el tratamiento con SmAP2 $_{\gamma 27-44}$, se observa el citoplasma cortical separándose de la pared celular (flecha blanca). En ambos casos, se observó un citoplasma más electrón-denso y se verificó la presencia de peroxisomas electrón-densos en comparación con las células no tratadas (zoom en detalle, puntas de flecha blancas). m: mitocondrias, V: vacuola, N: núcleo.

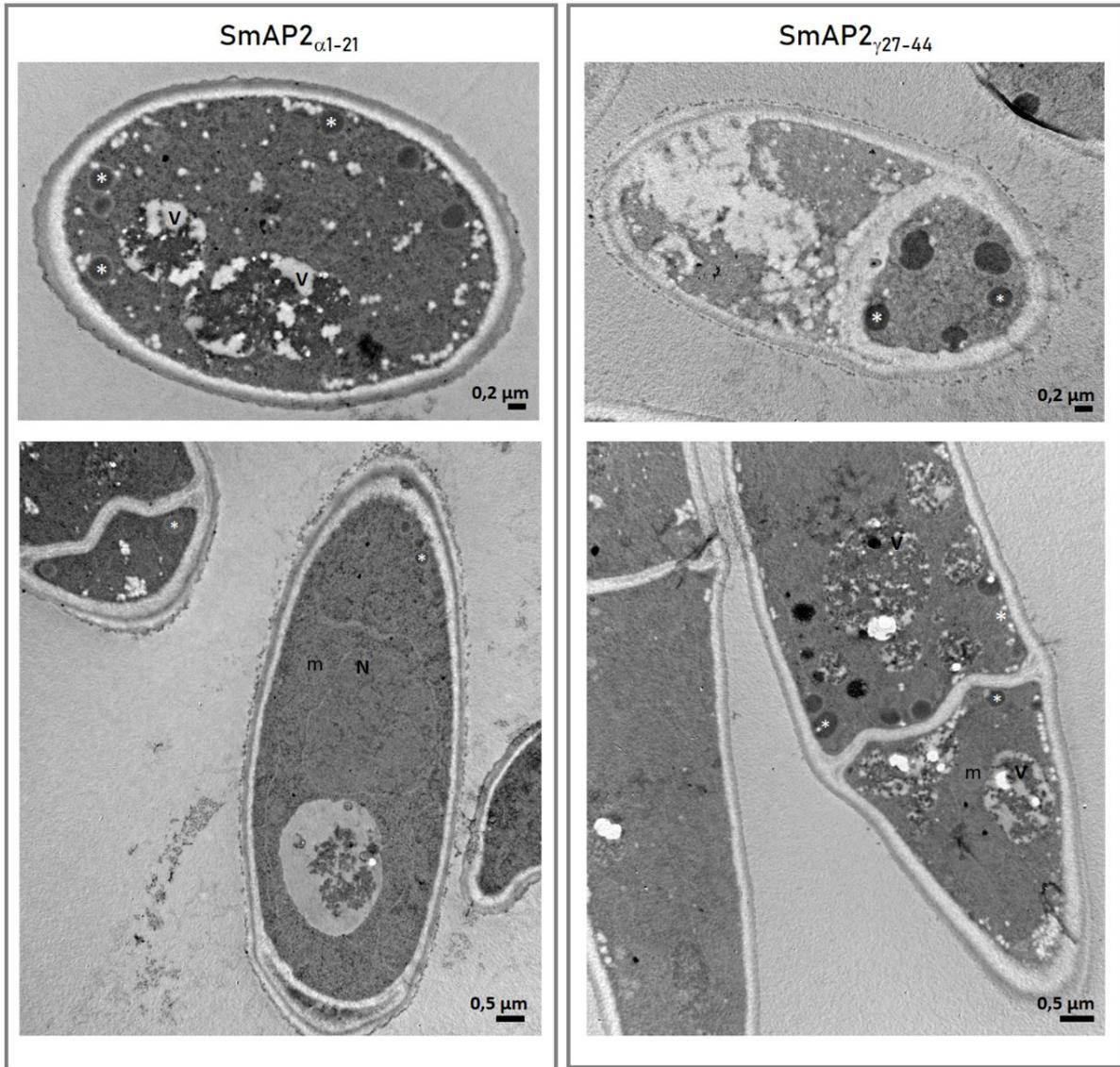


FIGURA 50 | Peroxisomas en conidios de *F. graminearum* tratados con los péptidos SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ y SmAP2 $_{\gamma 27-44}$. Se observó la presencia de un mayor número de peroxisomas en los conidios tratados con estos péptidos. Se señalan algunos peroxisomas con un asterisco blanco (*), m: mitocondrias, V: vacuola, N: núcleo.

Al prolongarse los tiempos de incubación comienza a observarse la fluorescencia verde distribuida en todas las células que conforman los macroconidios, siendo dicha distribución no completamente homogénea en el citoplasma celular, puesto que se observan regiones con mayor intensidad de marca.

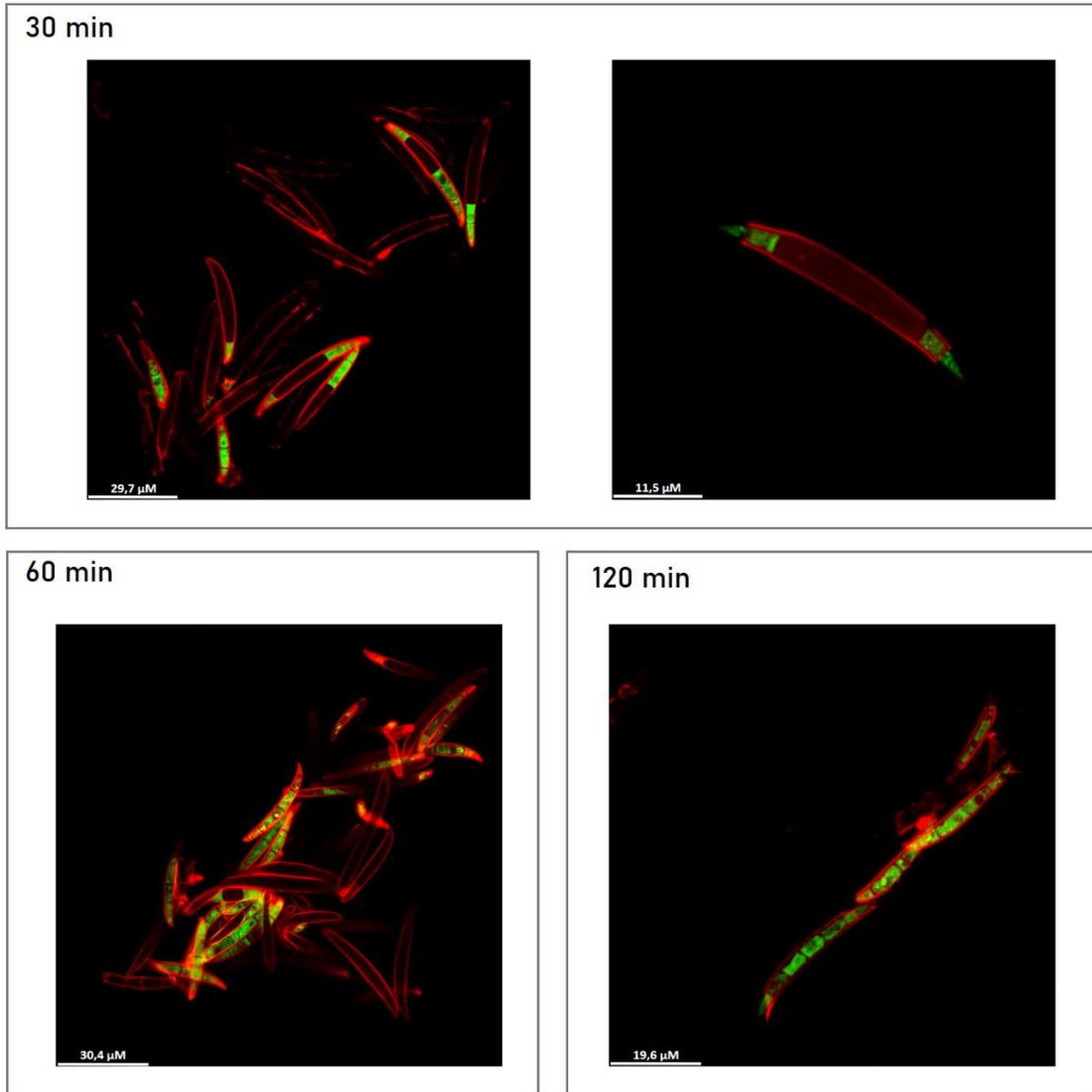


FIGURA 51 | Localización subcelular del péptido SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ en conidios de *F. graminearum* tratados durante distintos tiempos de incubación a la CIM. Se observan las imágenes resultantes de la superposición de los canales verde (péptido) y rojo (azul de tripán, marcador de pared celular). La barra indica tamaño en μM .

4.3.5.3.6 Relevancia de la His 19 y evaluación de la ciclación en el péptido derivado del α -core.

Con el fin de profundizar en el estudio del motivo α -core y su mecanismo de acción, que no ha sido exhaustivamente investigado como sí lo ha sido el motivo γ -core, se procedió a realizar un nuevo diseño de péptidos tomando como base el péptido más activo de dicho motivo, SmAP2 $_{\alpha 1-21}$. Se estudió la capacidad de los nuevos péptidos de inhibir el crecimiento de *F. graminearum*,

a través de la determinación de la CIM, tal como se realizó para el péptido base. La Figura 52 y la Tabla 16 muestran los resultados obtenidos.

TABLA 16 | Efecto inhibitorio de los péptidos modificados sobre el crecimiento de *F. graminearum* expresados en función de la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Péptido	Secuencia	CIM* (μM)
SmAP2_{α1-21}	KLCEKPSKTWFGNCGNPRHCG	32
SmAP2H19R	KLCEKPSKTWFGNCGNPRRCG	38
SmAP2H19A	KLCEKPSKTWFGNCGNPRACG	100
cSmAP2C14S	KLCEKPSKTWFGNSGNPRHCG	70

*CIM: Menor concentración del péptido capaz de inhibir completamente el crecimiento medible del hongo luego de 48 h de exposición al mismo.

SmAP2H19R, el péptido en el que se modificó la His 19 por una Arg resultó ser el péptido más activo con una CIM de 38 μM , del orden de la CIM del péptido base (Figura 52A). El péptido SmAP2H19A, exhibió una CIM de 100 μM (Figura 52B), aproximadamente tres veces superior a la del péptido base. Por su parte, el péptido cíclico presentó una CIM de 70 μM , aproximadamente el doble respecto al péptido base (Figura 52C). Asimismo, se determinó el tiempo en que los nuevos péptidos producían la muerte de los conidios de *F. graminearum*. Si bien el péptido cíclico exhibió una CIM mayor respecto al péptido base, fue el más letal en este ensayo, debido a que, con sólo 30 minutos de incubación a su CIM, produjo la muerte de los conidios del hongo (Figura 53), un comportamiento similar al observado para el péptido derivado del γ -core de DefSm2D. El péptido SmAP2H19R produjo la muerte de los conidios luego de 3 h de incubación, mientras que para SmAP2H19A el tiempo de muerte fue de 6 h.

Se realizó también el ensayo de evaluación de integridad de membrana en los conidios de *F. graminearum* tratados con los péptidos SmAP2H19R, SmAP2H19A y cSmAP2C14S a través de microscopía confocal de fluorescencia utilizando la sonda yoduro de propidio. Se observó la incorporación de IP en conidios tratados con los péptidos durante 1 h, evidenciada por la observación de fluorescencia roja intensa, excepto en el caso del péptido SmAP2H19A (Figura 54). En el caso del péptido cSmAP2C14S se observó una mayor intensidad de fluorescencia roja respecto al péptido SmAP2H19R y el control positivo en las condiciones del ensayo.

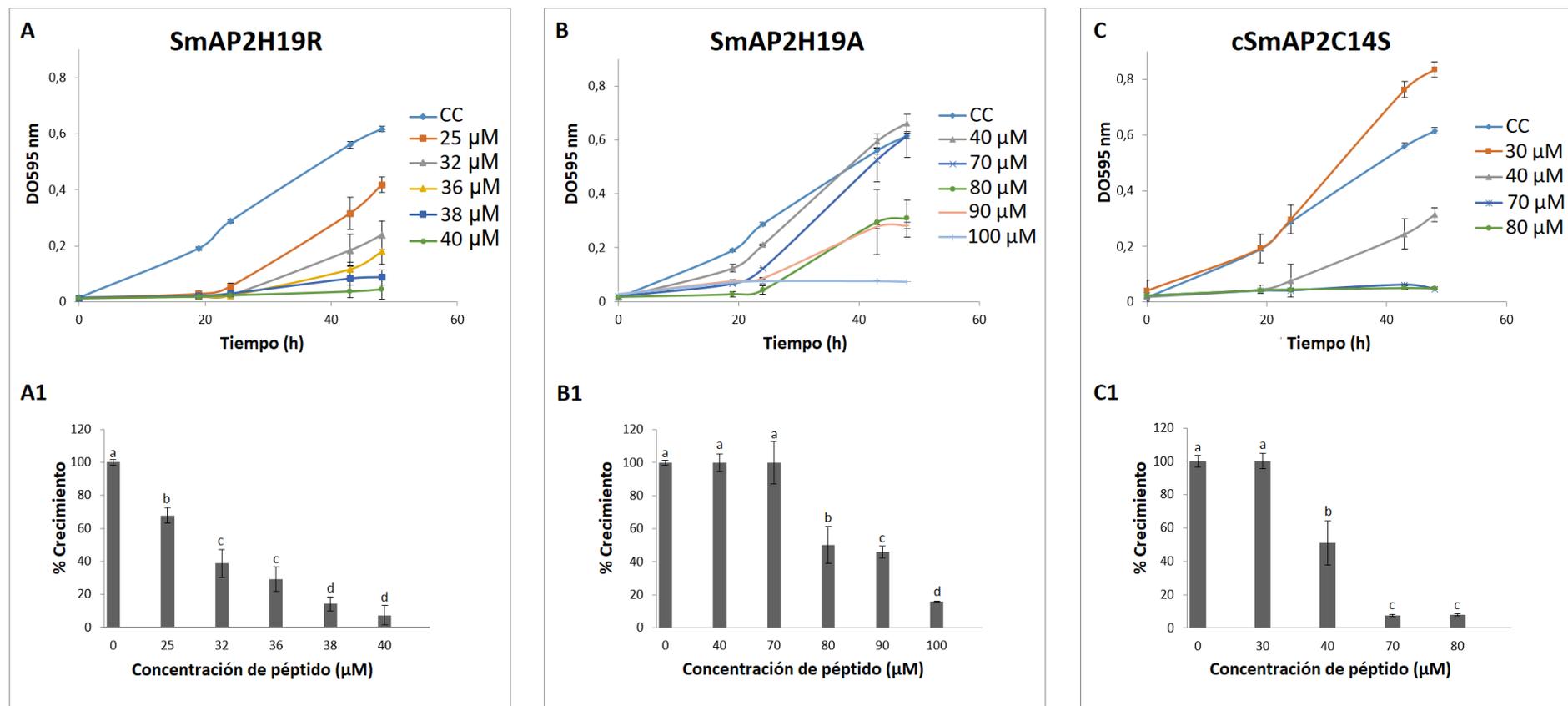


FIGURA 52 | Determinación de la CIM de los péptidos modificados derivados de SmAP2 α 1-21. (A), (B) y (C) Curvas de crecimiento de *F. graminearum* en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos SmAP2H19R, SmAP2H19A y cSmAP2C14S, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados técnicos. DO595 nm es la absorbancia a 595 nm. CC es el control de crecimiento. (A1), (B1) y (C1) Porcentaje de crecimiento de *F. graminearum* a las 48 h de incubación en presencia de distintas concentraciones de péptido SmAP2H19R, SmAP2H19A y cSmAP2C14S, respectivamente. Las barras representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de crecimiento en relación con el 100% del crecimiento correspondiente al control, definido como el crecimiento de hongos en ausencia de péptido. Los tratamientos con la misma letra no difieren significativamente ($p > 0.05$).

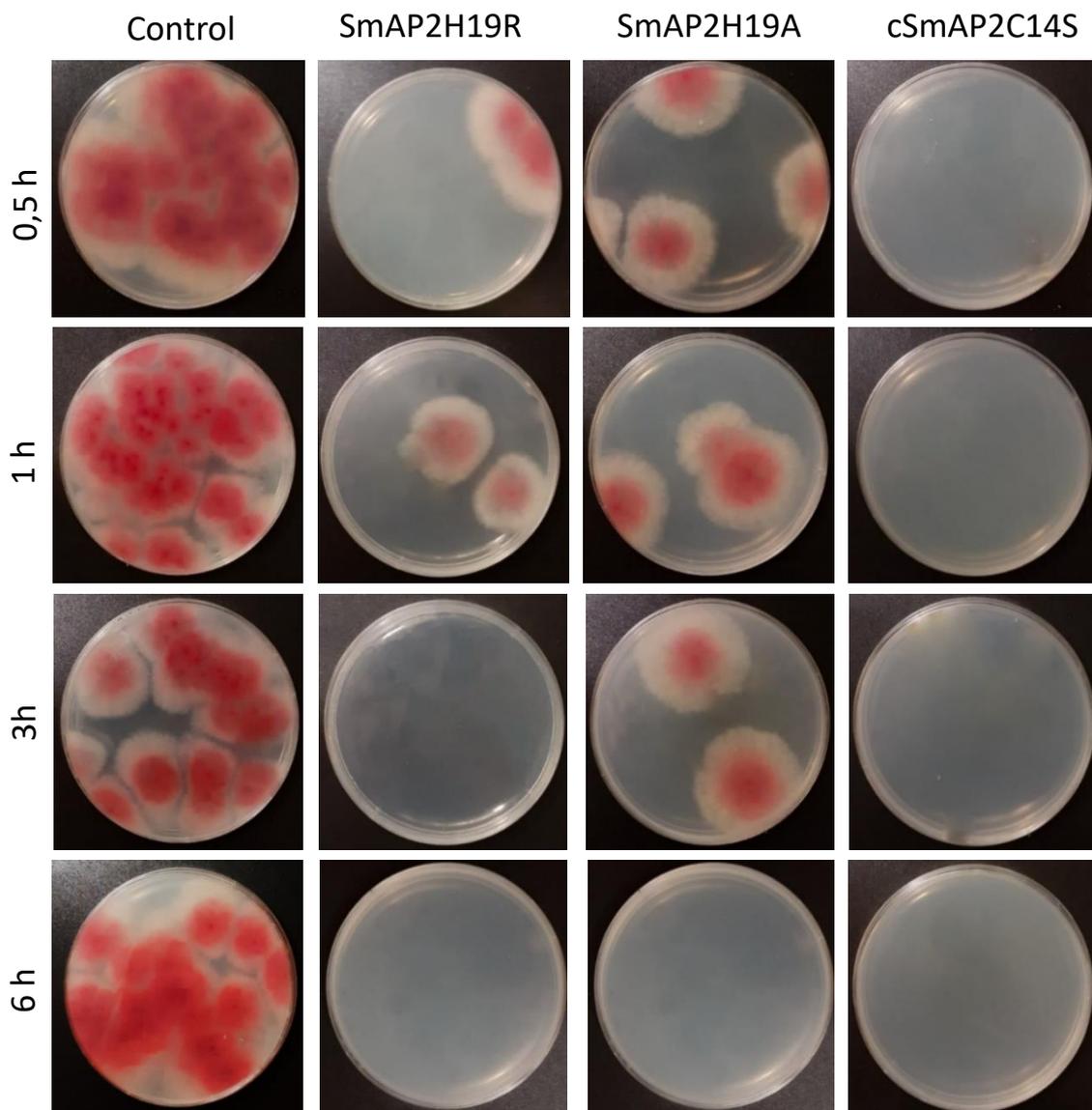


FIGURA 53 | Crecimiento de *F. graminearum* en placas APG incubadas durante 72 h a 25 °C en presencia de los péptidos SmAP2H19R, SmAP2H19R y cSmAP2C14S. Se muestran los tratamientos para cuatro tiempos: 0,5, 1, 3 y 6 h.

Para ninguno de los péptidos ensayados se observó el efecto de agregación verificado en el caso del péptido base SmAP2_{α1-21}. En el caso de SmAP2H19A, se verificó que la permeabilización de la membrana ocurrió al prolongar el tiempo de incubación por 90 minutos (Figura 55)

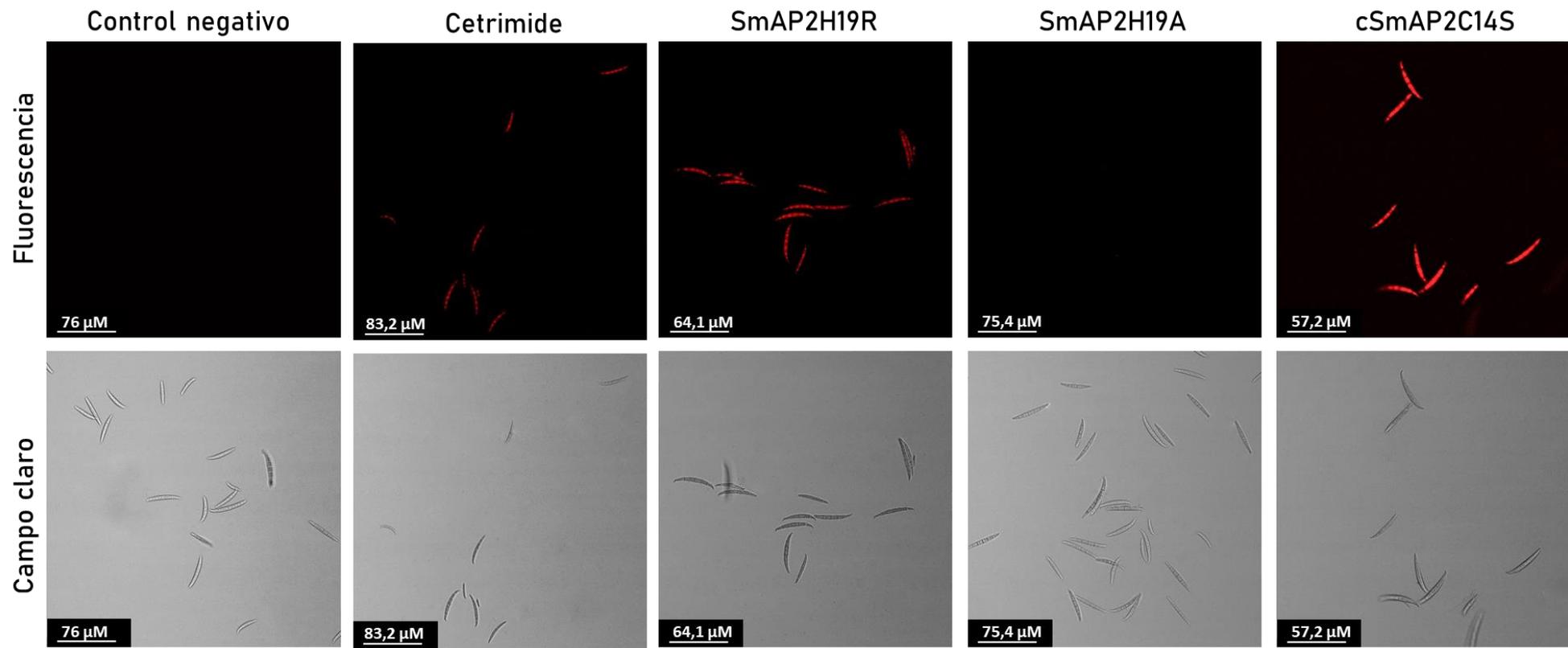


FIGURA 54 | Imágenes de campo claro (abajo) y fluorescencia (arriba) de conidios de *F. graminearum* incubados con los péptidos con modificaciones derivados de DefSm2D a su CIM durante 1 h. Cetrimide es el tensioactivo catiónico bromuro de cetil trimetil amonio, utilizado como control positivo. La barra indica tamaño en μM .

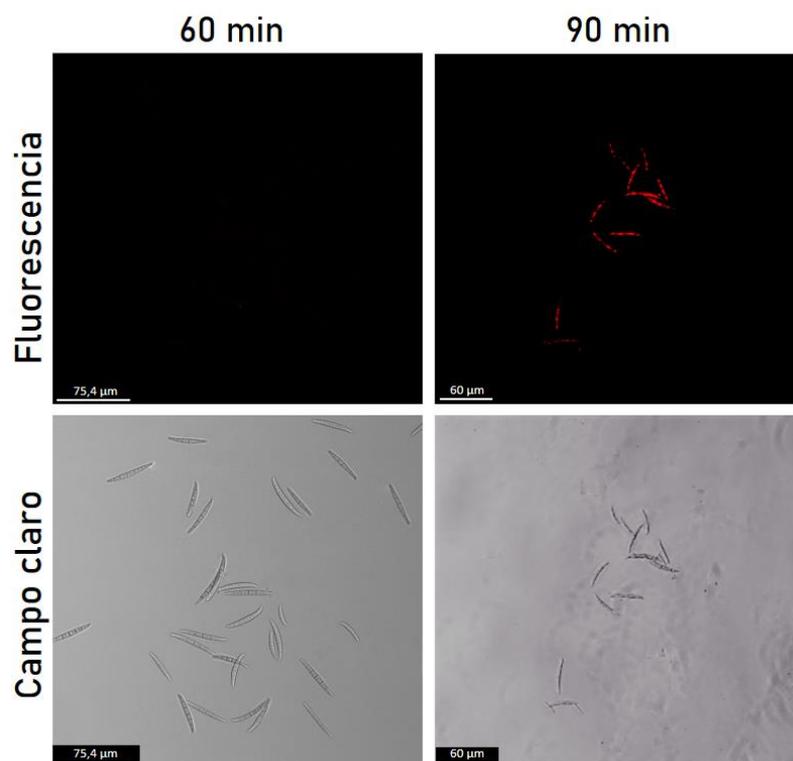


FIGURA 55 | Imágenes de campo claro (abajo) y fluorescencia (arriba) de conidios de *F. graminearum* incubados 60 y 90 minutos con el péptido SmAP2H19A. La barra indica tamaño en μM.

También se evaluó para estos péptidos si la producción de ROS formaba parte del mecanismo de acción antifúngico. Se realizaron los ensayos de detección de ROS a través de medidas de espectroscopia de fluorescencia (Figura 56) y de microscopía confocal (Figura 57). A través de las dos metodologías empleadas se detectó la producción de ROS en las células tratadas, siendo mayor el efecto producido por el péptido cíclico cSmAP2C14S, incluso aún mayor respecto a los péptidos originales derivados del α -y γ -core (SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ y SmAP2 $_{\gamma 27-44}$, respectivamente).

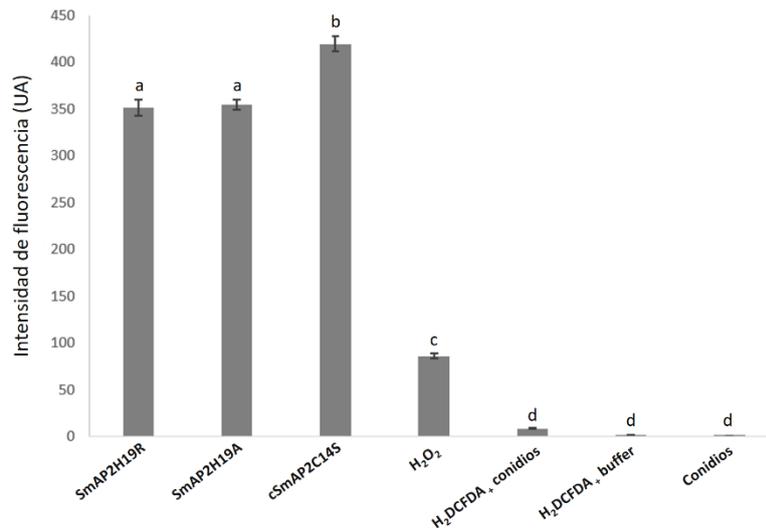


FIGURA 56 | Producción de ROS inducida en conidios de *F. graminearum* por los péptidos SmAP2H19R, SmAP2H19A y cSmAP2C14S. Se empleó la sonda H₂DCFDA. La fluorescencia emitida por las células se midió a una longitud de onda de excitación de 492 nm y a una longitud de onda de emisión de 527 nm. Se expresa la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias. Cada tratamiento representa la media de tres réplicas independientes.

Se estudió también la interacción de los péptidos modificados con monocapas lipídicas, tal como se describió previamente para los péptidos para SmAP2_{α1-21} y SmAP2_{γ-27-44}. Se emplearon membranas compuestas por POPC/Ergosterol en relación molar 3:1. La Figura 58 muestra las curvas de presión superficial en función del tiempo, a un valor de presión inicial de 30 mN/m con una concentración de péptido de 20 μM. En todos casos se observó una rápida interacción de los péptidos con las monocapas lipídicas luego de su inyección en la subfase dando cuenta de una cinética de asociación rápida a monocapas de POCP/Ergosterol. La presión crítica calculada para SmAP2H19R, SmAP2H19A y cSmAPC14S fue de 62,0±8,8; 58,8±6,2 y 55,1±4,9 mN/m, respectivamente (Figura 59). El mayor efecto sobre las monocapas se observó en el caso del péptido cíclico que manifestó a dicha presión inicial un aumento total de presión incluso mayor respecto del péptido SmAP2_{γ-27-44}, derivado del γ-core (Tabla 17). Estos resultados sugerirían que los péptidos modificados serían capaces de interactuar con los lípidos de las monocapas, siendo mayor la interacción en el caso del péptido cíclico que si bien no fue el más activo en términos de la CIM, fue el más letal en los ensayos de tiempo de muerte.

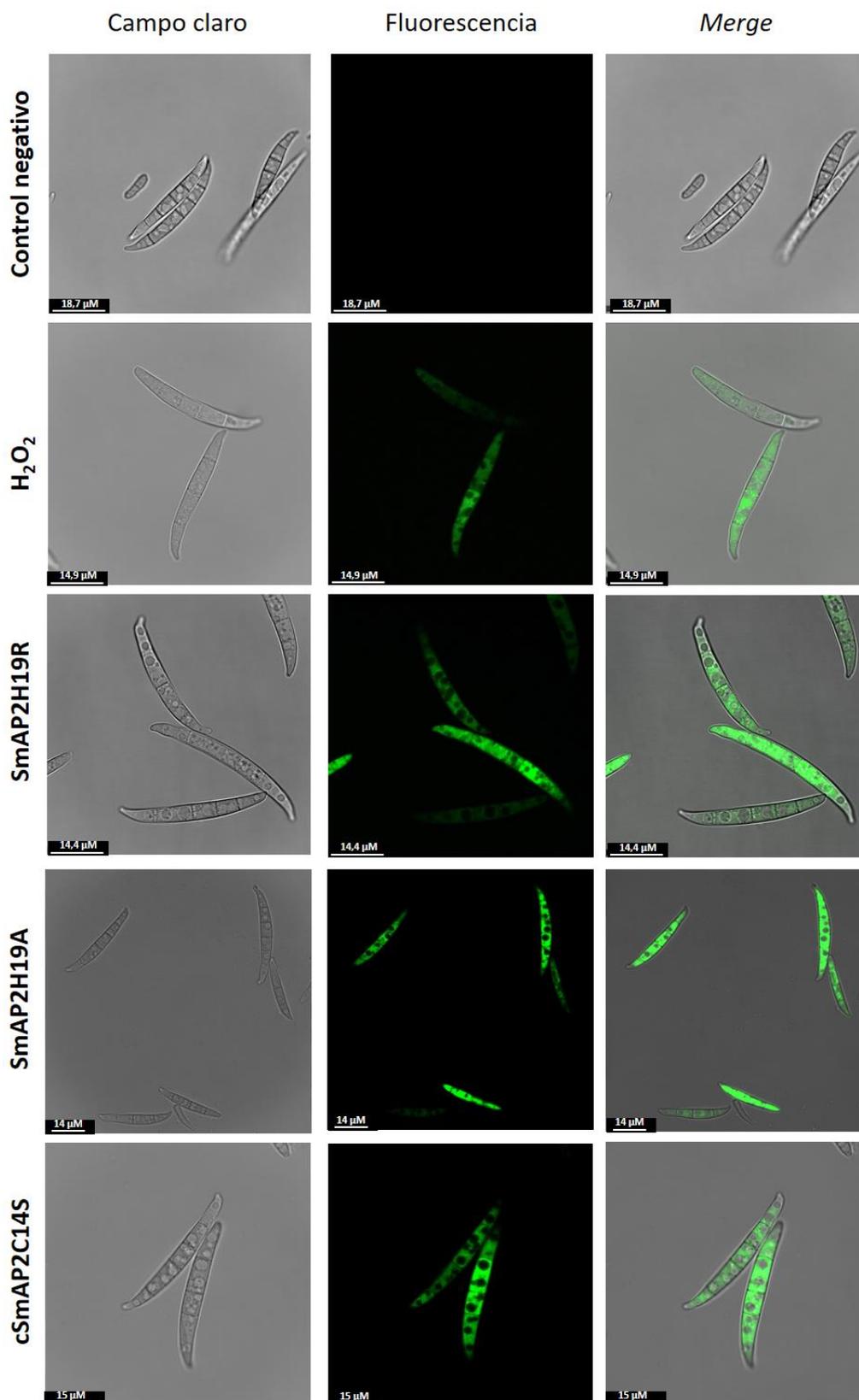


FIGURA 57 | Producción de ROS detectada con la sonda H₂DCFDA sobre conidios tratados con los péptidos modificados derivados del α -core, H₂O₂ (control positivo) o agua (control negativo). Se observan las imágenes de campo claro (izquierda), la fluorescencia verde (DCF, centro) y a la derecha el merge (superposición de las dos imágenes anteriores). La barra indica tamaño en μ M.

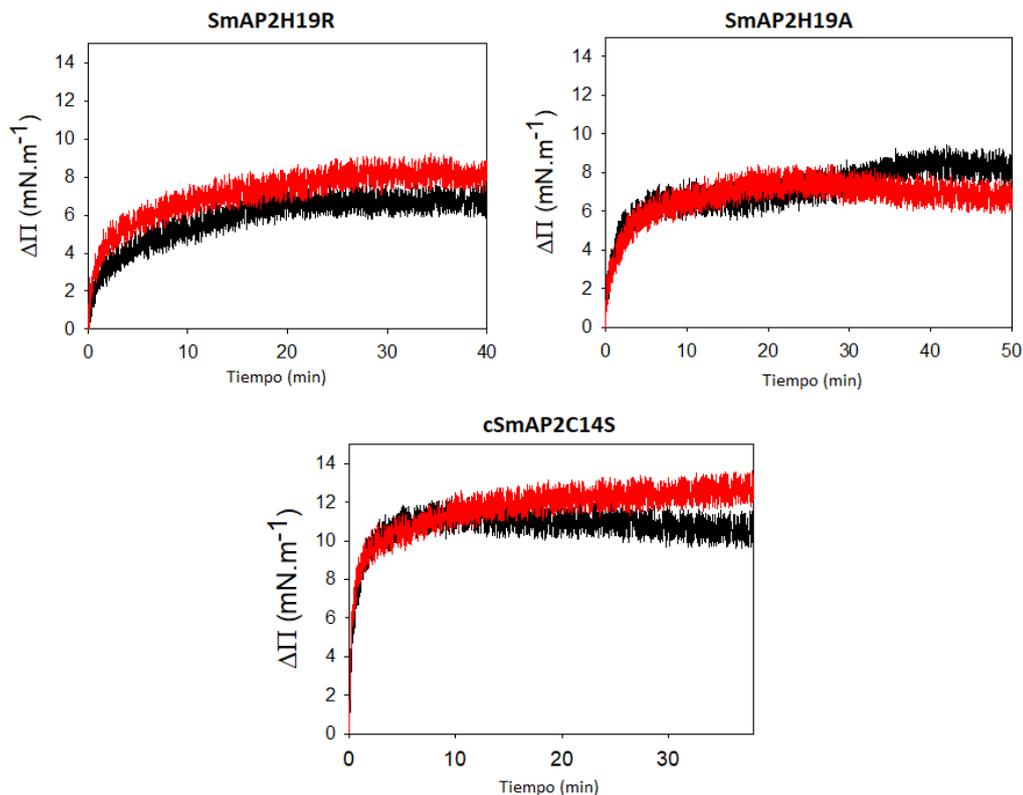


FIGURA 58 | Cinéticas de inserción de los péptidos con modificaciones derivados de SmAP2 _{α 1-21}, SmAP2H19R, SmAP2H19A y cSmAP2C14S en una monocapa lipídica compuesta por POPC/Ergosterol en una relación molar 3:1. Se muestran las curvas para una presión lateral inicial (Π_0) de 30 mN/m a 20±1 °C. Ambos péptidos fueron ensayados a una concentración de 20 μ M.

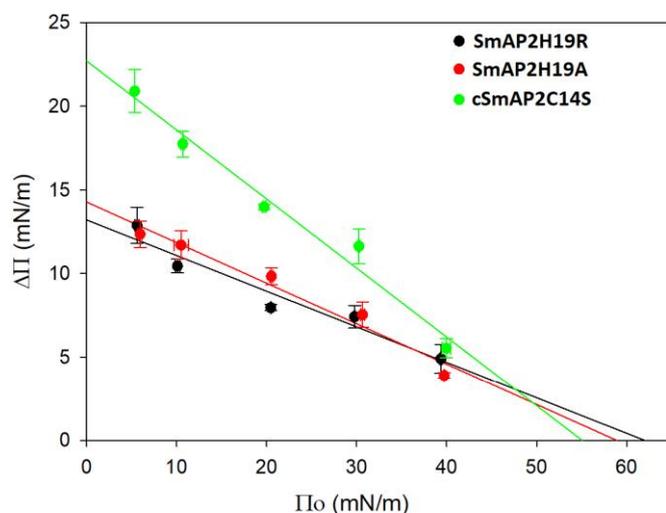


FIGURA 59 | Cambios en la presión superficial ($\Delta\Pi$) vs. Π_0 luego de 10 min de interacción de SmAP2H19R, SmAP2H19A y cSmAP2C14S con una monocapa lipídica POPC/ERG (3:1). Los valores de $\Delta\Pi_c$ fueron obtenidos por extrapolación a $\Delta\Pi=0$.

TABLA 17 | Aumento total de presión generada luego de la inserción de los péptidos en monocapas de POPC/Erg (3:1) a una presión inicial de 30 mN/m.

Péptido	$\Delta\pi$ (mN.m ⁻¹)
SmAP2_{α1-21}	8,8669
SmAP2_{γ27-44}	10,1696
SmAP2H19R	7,4175
SmAP2H19A	7,5405
cSmAP2C14S	11,6314

Con el objetivo de estudiar la localización subcelular de los péptidos SmAP2H19R y SmAP2H19A y evaluar si difiere de aquella observada para el péptido base SmAP2 _{α 1-21}, se realizó la derivatización de los mismos con el fluoróforo fluoresceína y se empleó la técnica de microscopía confocal de fluorescencia para observar conidios tratados con los mismos. Para los ensayos también se utilizó el colorante azul de tripán que funciona como marcador de la pared celular fúngica ya que es capaz de emitir una intensa fluorescencia roja luego de unirse a la quitina y los glucanos de pared. Las Figuras 60 y 61 muestran las imágenes obtenidas para SmAP2H19R y SmAP2H19A, respectivamente. Según estos ensayos, ambos péptidos se localizaron hacia la región extracelular de los conidios, colocalizando con el marcador de pared celular específicamente en las paredes externas de las células. En los tabiques internos de los conidios no se observó fluorescencia verde, sugiriendo que los péptidos no ingresan al interior celular, al menos en el tiempo del tratamiento. Esto difiere de lo observado para el caso del péptido base que en ese mismo tiempo fue internalizado en los conidios tratados. Si bien tanto el péptido base como los péptidos modificados fueron capaces de inhibir el crecimiento del fitopatógeno utilizado en los ensayos, estos resultados sugieren que el mecanismo de acción sería diferente y que el residuo His19 estaría involucrado en la internalización del péptido SmAP2 _{α 1-21}.

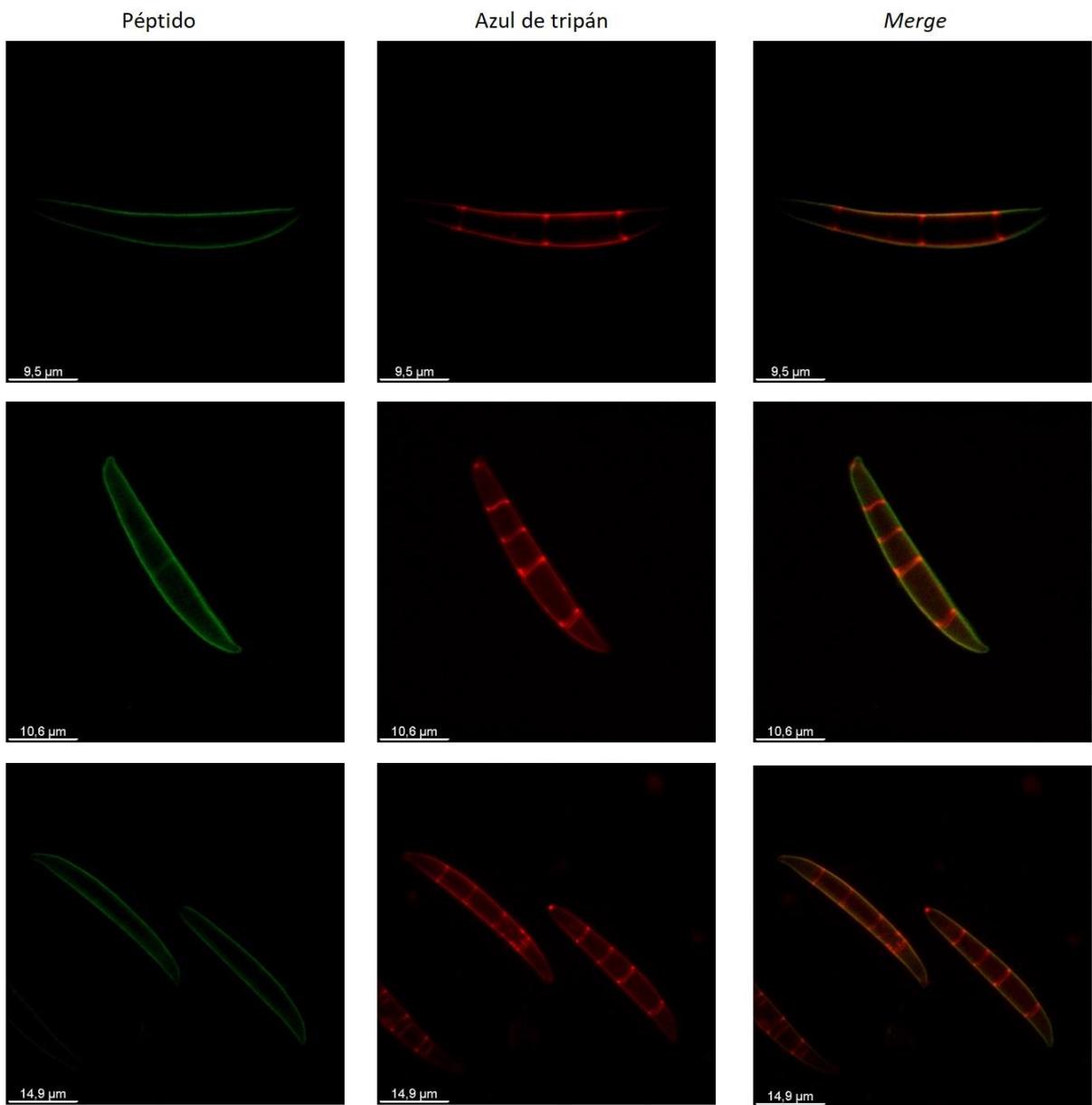


FIGURA 60 | Localización subcelular del péptido SmAP2H19R en conidios de *F. graminearum* tratados durante 2 h a la CIM. A la izquierda se observa la fluorescencia verde (péptido), en el centro la fluorescencia roja (azul de tripán, marcador de pared celular) y a la derecha la superposición de las dos anteriores. La barra indica tamaño en μM .

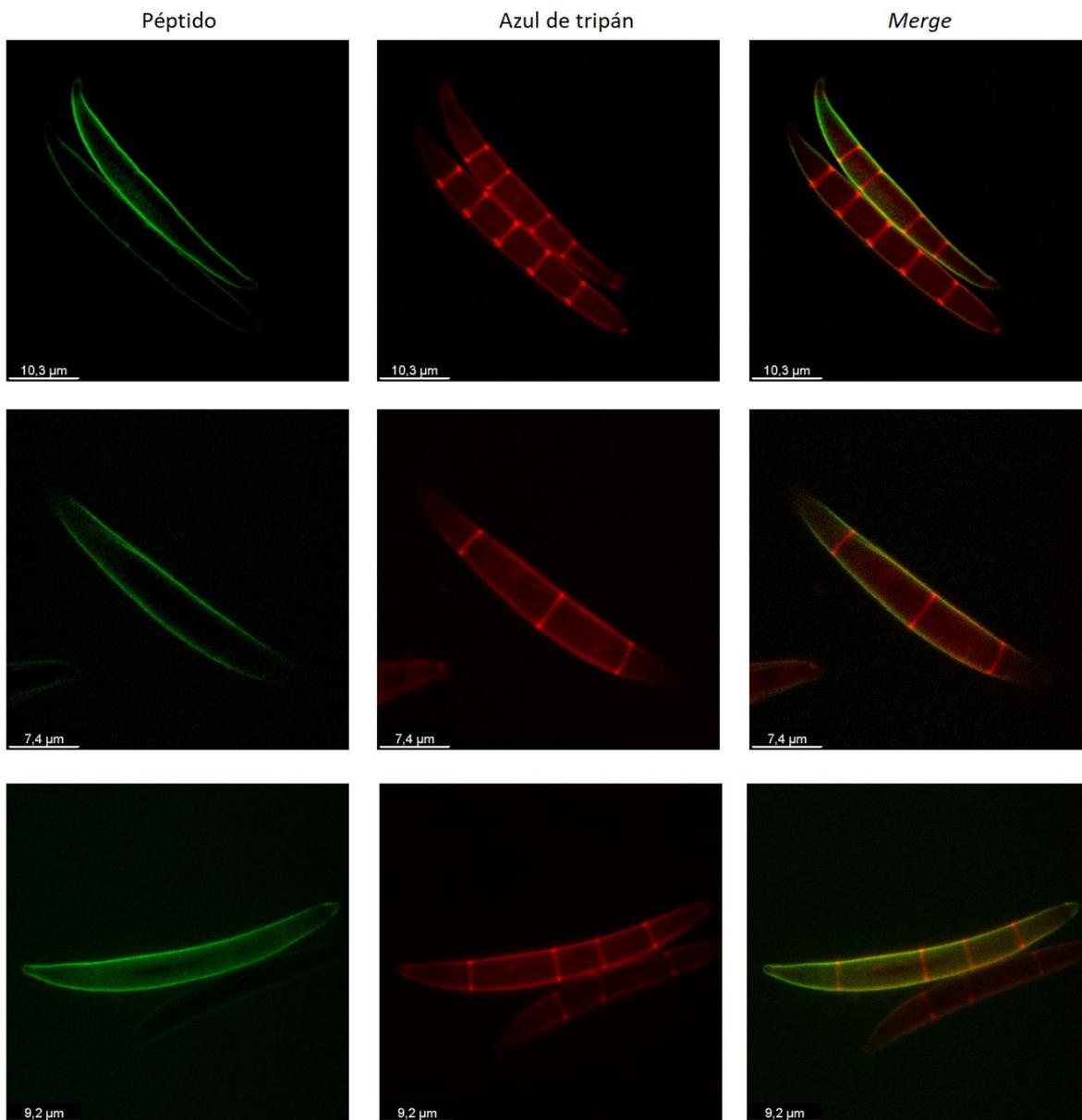
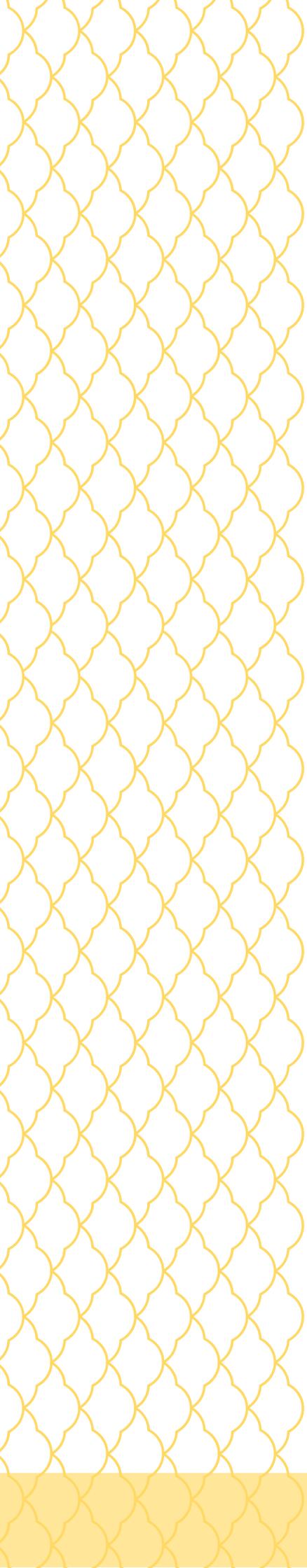


FIGURA 61 | Localización subcelular del péptido SmAP2H19A en conidios de *F. graminearum* tratados durante 2 h a la CIM. A la izquierda se observa la fluorescencia verde (péptido), en el centro la fluorescencia roja (azul de tripán, marcador de pared celular) y a la derecha la superposición de las dos anteriores. La barra indica tamaño en μM .



05

**Discusión &
Conclusiones**

Capítulo V: Discusión & Conclusiones

El uso masivo de agentes antifúngicos en el sector agrícola ha conducido a la aparición de cepas resistentes a los fungicidas, restringiendo en gran medida el número de compuestos de este tipo de uso común (Brauer et al., 2019) y probablemente contribuyendo a desarrollar resistencia contra los distintos compuestos antifúngicos (Jampilek, 2016; Perfect, 2016). Para la fusariosis de la espiga en particular, varios factores obstaculizan aún más la efectividad de los tratamientos con fungicidas, incluida la falta de efectividad de las moléculas disponibles, la floración desigual del trigo y la escasa retención de fungicidas en las espigas (Wegulo et al., 2015). En el caso de esta enfermedad no sólo es relevante su impacto económico debido a la merma significativa en el rendimiento del cultivo sino también reviste gran importancia la producción de micotoxinas por parte del hongo. Estos compuestos ocasionan intoxicaciones y cuadros agudos en animales y humanos, convirtiéndose en un tema de gran preocupación a nivel mundial (Omotayo et al., 2019). En este contexto, existe una necesidad urgente de buscar nuevos antifúngicos seguros y eficaces. Las plantas silvestres y las malezas exhiben naturalmente una mayor resistencia a los patógenos debido a su perfecta adaptación al medio ambiente, lo que las convierte en una fuente valiosa, aunque inexplorada, de AMPs naturales como lo son las defensinas (Slavokhotova et al., 2011). La amplia gama de patógenos contra los que actúan los AMPs y los distintos niveles de eficacia que exhiben podrían atribuirse al hecho de que estos péptidos han aprovechado la divergencia bioquímica y la evolución de la pared celular, así como la composición de la membrana celular, actuando preferentemente sobre los patógenos mientras que resultan ser inofensivos para el huésped (Teixeira et al., 2012). Teniendo en consideración su aplicabilidad futura, resulta evidente la necesidad de estudiar en profundidad tanto la estructura como la función de los AMPs naturales, para ser utilizados como herramientas en ingeniería de proteínas y para el diseño racional de péptidos mejorados.



En el presente estudio de tesis, se reporta la identificación de DefSm1 y DefSm2, dos proteínas antifúngicas putativas con un dominio defensina que se expresan en forma natural en las flores del cardo silvestre *S. marianum*. Las flores son estructuras ricas en nutrientes que contienen una gran cantidad de moléculas de protección que sirven como primera línea de defensa en las capas celulares periféricas (Silverstein et al., 2007). De hecho en las plantas, los péptidos antimicrobianos que constituyen una barrera frente a una amplia gama de patógenos se producen especialmente en tejidos importantes para la reproducción como lo son las flores, semillas y frutos (Giacomelli et al., 2012). Las secuencias nucleotídicas que codifican para DefSm1 y DefSm2 poseen la estructura típica de los genes que codifican para defensinas vegetales: exón-intrón-exón; el primer exón codifica el péptido señal y el segundo el péptido maduro, con un intrón de longitud variable (Silverstein et al., 2005). A su vez, el análisis de las regiones promotoras de los genes reveló la presencia de elementos regulatorios vinculados a respuestas frente a estrés biótico y en el caso de DefSm2 se encontró un elemento de respuesta frente a elicitores fúngicos, lo que sugeriría que el rol de estas proteínas estaría asociado a procesos de defensa en la planta. El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos derivada del ADNc de DefSm2 reveló la presencia de dos dominios básicos fusionados; el dominio N-terminal es una defensina C8, mientras que el dominio C-terminal es rico en Arg y Lys. En el caso de DefSm1 también se verificó la presencia de dos dominios básicos fusionados, siendo el dominio N-terminal una defensina C7 y el C-terminal un dominio rico en prolina, putativo en hidroxiprolina. Las fusiones de CRP ocurren con frecuencia en genomas de plantas y transcriptomas con otros dominios proteicos ricos en cisteína, glicina o prolina, pero su función aún es desconocida (De Paula et al., 2011). De Paula et al. (2011) describieron para Sd5, una defensina de *Saccharum officinarum*, la presencia de una región C-terminal no estructurada que no pudo ser identificada en la base de datos PDB, es decir ninguna estructura de defensina de plantas reportada la presenta. La región C-terminal de Sd5 presenta un predominio de aminoácidos hidrofóbicos, así como de residuos cargados (Arg, Glu y Lys) que participan en la



interacción defensina-membrana. Se encontró también un dominio C-terminal rico en Lys en Ha-DEF1, una defensina de hojas y raíces de girasol (Asteraceae) (Letousey et al., 2007). Al realizar la búsqueda de secuencias homólogas con las defensinas de *S. marianum*, se encontraron defensinas predichas en otras especies de la familia Asteraceae fusionadas con dominios catiónicos C-terminales pero, al igual que para Ha-DEF1, esos dominios son más cortos y tienen menos aminoácidos catiónicos que los dominios C-terminal de DefSm1 y DefSm2. Además, aunque DefSm2D comparte una alta identidad con los dominios de defensina predichos de proteínas fusionadas de *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (números de acceso XP_024967363 y XP_024968136), el dominio C-terminal de DefSm2 comparte una identidad de secuencia más baja o nula con sus respectivos dominios C-terminales básicos predichos. Por su parte, el dominio C-terminal de DefSm1 es un dominio rico en prolina y presentó identidad con una extensina de *Solanum penellii* y una proteína hipotética de *S. tuberosum* con un dominio extensina en su secuencia. Una de las modificaciones postraduccionales reversibles más importantes la constituye la hidroxilación de proteínas, siendo la prolina el principal residuo que sufre dicha modificación (Hu et al., 2010). Las proteínas que contienen hidroxiprolina juegan un papel clave en el crecimiento y desarrollo de las plantas superiores ya que serían sitios de o-glicosilación correspondientes a modificaciones postraduccionales reversibles relevantes en diversos procesos fisiológicos (Liang et al., 2020). De hecho, se encontró que la hidroxiprolina es el aminoácido mayoritario en hidrolizados de pared celular (Deepak et al., 2010). El entrecruzamiento de las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) conduce a un fortalecimiento a nivel de la pared celular que contribuye a las reacciones de defensa de las plantas (Deepak et al., 2010). En las plantas pueden distinguirse tres familias de HRGPs: las arabinogalactanas, extensinas y proteínas ricas en prolina (Hu et al., 2010). Para la defensina Art v 1 de *A. vulgaris*, se encontró que dicha proteína es secretada con un dominio C-terminal rico en prolina con presencia de dos repeticiones (Ser/Ala)Pro₂₋₄, frecuentes en proteínas tipo extensina (Himly et al., 2002). Para el caso del dominio C-terminal de DefSm1 se encontraron 16



de dichas repeticiones; mostrando una similitud de dicho dominio con las extensinas vegetales. El rol de estos dominios C-terminales dentro de las proteínas ricas en cisteína, sin embargo, es aún desconocido. Resulta evidente que el dominio C-terminal de DefSm1 que presenta homología con las extensinas vegetales, independientemente de que se escinda o no del dominio defensina al cual está fusionado, estaría también implicado en procesos de defensa. En el caso del dominio C-terminal de DefSm2, si bien no se identificaron secuencias homólogas, su composición aminoacídica podría sugerir también un rol en defensa.

Mediante la realización del modelado molecular por homología fue posible predecir la estructura tridimensional de los dominios defensina que mostraron el patrón típico de plegamiento de las defensinas vegetales, exhibiendo la presencia del motivo estabilizado por cisteína $CS\alpha\beta$ formado por una hélice α y tres hojas β antiparalelas interconectadas por tres enlaces disulfuro (Lay and Anderson 2005). Las defensinas vegetales presentan en general cuatro enlaces disulfuro intramoleculares, los tres presentes en el motivo $CS\alpha\beta$ y un cuarto enlace entre los extremos N- y C- terminal. El espaciamiento y la conectividad de los residuos de cisteína altamente conservados definen la familia de las defensinas de las plantas (Shafee et al., 2016). Según los modelos realizados a través de la predicción por modelado molecular por homología, la conectividad disulfuro DefSm2D es 1:8, 2:5, 3:6 y 4:7, que es común a las defensinas C8. En contraste, para DefSm1D sólo se verificó la presencia de los enlaces disulfuro que garantizan la integridad del motivo $CS\alpha\beta$, 2:5, 3:6 y 4:7. Los enlaces disulfuro confieren a la molécula una alta resistencia a las proteasas y a valores extremos de pH y temperatura, que es un rasgo valioso en la primera línea de defensa huésped-patógeno (De Coninck et al., 2013; Parisi et al., 2018). Además, esta red de enlaces disulfuro que estabiliza el *fold* correcto también parece ser fundamental para muchas de las actividades exhibidas por las defensinas (Dhople et al., 2006; Powers et al., 2005). Probablemente, la disposición de enlaces disulfuro facilita la exposición superficial de aminoácidos específicos en los *loops* intermedios, contribuyendo al establecimiento de interacciones clave para la actividad antimicrobiana (Parisi



et al., 2018). Al analizar los resultados de los cálculos de la distribución electrostática de cargas en las superficies de los modelos de DefSm1D y DefSm2D, se observa una prevalencia de carga positiva en la superficie de ambas defensinas (siendo mayor en el caso de la segunda), pero también áreas con una cierta densidad de carga negativa, lo que apunta a que el pequeño número de residuos ácidos también contribuyen a la cara polar.

El estudio de la predicción funcional realizada empleando como *input* los modelos tridimensionales obtenidos a través del servidor ProFunc así como los resultados del análisis de búsqueda de similitud secuencial mostraron que la función putativa de ambos dominios defensina sería la actividad antifúngica. Los estudios de estructura proteica permiten predecir *in silico* actividades antimicrobianas permitiendo de este modo diseñar péptidos basados en la secuencia y estructura primaria de la proteína. Péptidos sintéticos diseñados a partir de la secuencia de AMPs antifúngicos han permitido el mapeo de motivos antimicrobianos putativos y han exhibido actividad antifúngica por sí mismos (Garrigues et al., 2017; Kaewklom et al., 2016; Muñoz et al., 2014; Sagaram et al., 2011). El análisis filogenético realizado empleando secuencias de defensinas vegetales mostró que DefSm1D y DefSm2D se encuentran agrupadas junto con defensinas antifúngicas y a su vez comparten el mismo *cluster* con defensinas antifúngicas de Asteraceae. Todos los resultados de los análisis *in silico* realizados en este trabajo de tesis refuerzan la idea del rol que estas proteínas putativas tendrían en defensa y, en particular, como proteínas antifúngicas.

A pesar de su estructura terciaria conservada, las defensinas vegetales comparten una identidad muy baja a nivel de secuencia de aminoácidos. Esta variabilidad de secuencia podría explicar las diferentes funciones biológicas que se han atribuido a estas proteínas, donde un cambio de un solo aminoácido puede alterar el espectro de actividad exhibido por defensinas estrechamente relacionadas y también podría asociarse con la existencia de diversos mecanismos de acción antifúngica (Aerts et al., 2008; Karin Thevissen et al., 2003, 2007). Los aminoácidos en posiciones típicamente conservadas son dos residuos de glicina, un aminoácido aromático y un ácido

glutámico (Ghag et al., 2016); los números de posición relativos a DefSm2D son Gly12 y Gly33, Trp10 y Glu28 y para DefSm1D Gly15 y Gly32, Trp12 y Glu31. Se ha propuesto que estos residuos también contribuyen a la estabilización de la estructura de las defensinas y que la Gly12, altamente conservada y presente en todas las defensinas de las plantas, contribuye a la plasticidad de los *loops*, y probablemente sea esencial para el proceso de reconocimiento de patógenos (de Medeiros et al., 2010). Tal como se esperaba, el análisis de la secuencia de aminoácidos deducida de DefSm1D y DefSm2D reveló la presencia de los motivos estructurales γ - y α -core. El γ -core de DefSm2D es idéntico al mismo motivo de la defensina DmAMP1, que resultó ser activa contra diversos hongos filamentosos fitopatógenos tales como *Neurospora crassa*, *F. solani* y *F. culmorum* (Osborn et al., 1995) y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Karin Thevissen et al., 2003) entre otros. El motivo α -core, a diferencia del γ -core, no se encuentra conservado en todos los AMP ricos en cisteína y carece de la estructura de β *hairpin*. Aunque la similitud secuencial entre las defensinas vegetales es pequeña, los *loops* donde se encuentran los motivos α - y γ -core constituyen regiones interactuantes con estructuras de superficie de los patógenos que pueden alcanzar altos puntajes de identidad lo que podría estar relacionado con que compartan el mismo *target* (de Medeiros et al., 2010). Dentro de los motivos α - y γ -core también existen residuos que se encuentran muy conservados en subfamilias de defensinas (Fant et al., 1999). Uno de ellos es la Arg38 contenida en el motivo γ -core que resultó ser crucial para la actividad antifúngica de MsDef1 contra *F. graminearum* (Sagaram et al., 2011). Dicho residuo demostró no solo ser importante para la actividad antifúngica de algunas defensinas vegetales, sino también para la interacción de la membrana de las defensinas humanas con las membranas de bacterias Gram positivas y Gram negativas (J. Lee et al., 2016). Si bien el rol de la arginina se discutirá con mayor profundidad más adelante en este capítulo, es importante remarcar que el mismo se encuentra presente en DefSm1D y DefSm2D, y que el péptido derivado SmAP2_{γ27-44} que contiene este residuo de Arg fue el más activo contra el patógeno *F. graminearum*.

Se han realizado muchos esfuerzos para identificar motivos activos mínimos en las defensinas que permitirían crear nuevos agentes antimicrobianos (de Medeiros et al., 2010). Algunos autores han reportado una mayor actividad de los péptidos derivados de una secuencia que de la propia fuente original (Schaaper et al., 2001). Recientemente, Sathoff et al. (2019) demostraron que péptidos sintetizados químicamente conteniendo el motivo γ -core de las defensinas pueden imitar la actividad biológica relativa de la defensina completa. Por el contrario, Garrigues et al. (2017) encontraron que PAF109, un péptido diseñado a partir del motivo γ -core de la proteína antifúngica AfpB de origen fúngico, no mostró actividad contra varios hongos utilizados en los ensayos. La fragmentación en muchas proteínas y péptidos antimicrobianos también puede generar actividades que no representarían la de la molécula parental. En este sentido, Muñoz et al. (2014) encontraron que los péptidos sintéticos derivados del motivo γ -core de MtDef4 y MsDef1 (de *Medicago truncatula* y *M. sativa*, respectivamente) poseen propiedades antifúngicas específicas que difieren de las de la defensina parental.

En el presente trabajo de tesis, se diseñaron péptidos sintéticos a partir de los motivos α - y γ -core de las defensinas putativas de *S. marianum* DefSm1D y DefSm2D, demostrando la capacidad de aquellos derivados de DefSm2D para inhibir el crecimiento del fitopatógeno *F. graminearum* en concentraciones del orden micromolar. Varios estudios han informado la actividad de péptidos derivados del γ -core de defensinas con CIMs del orden micromolar (Kaewklom et al., 2016, 2018; Muñoz et al., 2014; Sagaram et al., 2011), siendo mayores a aquellas reportadas para el caso de las defensinas completas que se encuentran en el rango de micromolar a nanomolar (Lacerda et al., 2014). Cabe destacar que la diferencia entre la actividad de las defensinas y los péptidos derivados del γ -core radican en que la molécula completa posee, además de este último, otros determinantes que contribuyen a su actividad (Yount & Yeaman, 2004). Si bien los péptidos más largos derivados de la región α -core de ambas defensinas presentan un fragmento N-terminal de 10 aminoácidos idénticos (KLCEPSKTW), el péptido derivado de DefSm1D (SmAP1 _{α 4-23}) fue inactivo frente al hongo ensayado en contraposición a

aquel derivado de DefSm2D que sí presentó actividad antifúngica. Esto sugeriría que la especificidad exhibida por el péptido SmAP2 _{α 1-21} radicaría en la composición aminoacídica de su porción C-terminal donde se encuentra el α -core. De hecho, dicho fragmento C-terminal por sí solo (correspondiente a la secuencia de SmAP2 _{α 10-21}) manifestó actividad antifúngica.

En lo que respecta a la estructura primaria de los péptidos activos, se observa que los residuos aminoacídicos Arg, Lys, así como también los de His, se distribuyen a lo largo de las regiones seleccionadas para el diseño de SmAP2 _{α 1-21} (y sus péptidos derivados donde se realizaron modificaciones puntuales de residuos), SmAP2 _{α 10-21} y SmAP2 _{γ 27-44}. El péptido SmAP2 _{α 1-21}, en comparación con SmAP2 _{α 10-21}, incluye tres aminoácidos catiónicos extra (Lys) y un aminoácido aniónico (Glu). No sólo la presencia de carga positiva asegura la actividad antimicrobiana de los péptidos, se ha reportado que la presencia de residuos aminoacídicos hidrofóbicos también es de suma importancia en las defensinas y en los AMPs en general (Cytryńska & Zdybicka-Barabas, 2015; Hwang & Vogel, 1998; Toledo et al., 2021). El residuo hidrofóbico Trp también está presente en los péptidos activos sintetizados, y se considera que desempeña una función fundamental en la partición de los AMPs en la membrana, anclando el péptido en la interfaz de la misma (Teixeira et al., 2012). En SmAP2 _{α 1-21} y SmAP2 _{α 10-21}, Phe se encuentra adyacente a Gly, los primeros residuos del motivo de α -core. En el péptido SmAP2 _{γ 27-44}, Phe no está presente y la hidrofobicidad, además de la presencia del Trp, está asegurada por la presencia de Val y Met. Los aminoácidos catiónicos establecerían interacciones electrostáticas con las membranas patógenas cargadas negativamente o con la pared celular, mientras que los aminoácidos hidrófobos contribuirían a las interacciones en la interfaz de la membrana lipídica en la célula patógena *target*. Esta es una propiedad importante porque, independientemente de las características específicas del mecanismo de acción de los AMP, el primer paso parece requerir objetivos de unión específicos en la pared celular y/o membrana del patógeno (Cools, Vriens, et al., 2017; El-Mounadi et al., 2016b).

En cuanto a la estructura secundaria que adoptan los péptidos activos, la evidencia de dicroísmo circular indicaría que tanto SmAP2_{α1-21}, SmAP2_{α10-21} y SmAP2_{γ27-44} permanecen desestructurados en solución, con escasa o nula propensión a adoptar una estructura secundaria definida. De manera razonable, el mantenimiento de la plasticidad a lo largo de estos *loops* mejoraría el reconocimiento molecular con los sitios *target*, lo que se correlacionaría con la ubicación de estos motivos dinámicos y expuestos en la proteína madre. Para los péptidos diseñados en base a SmAP2_{α1-21} se observó que en el caso del péptido cíclico una leve tendencia helical que podría asociarse a la presencia del enlace disulfuro.

Los motivos α -core de las defensinas MsDef1 y MtDef4 (secuencias: GPCFSGC y GPCASDHNC, respectivamente) fueron sintetizados químicamente por Sagaram et al. (2011) y encontraron que ambos péptidos fueron totalmente inactivos en todas las concentraciones ensayadas en un rango de 0-50 μ M sobre *F. graminearum*. Estos resultados indican que los motivos α -core de estas defensinas *per se* no exhiben actividad antifúngica. Los péptidos derivados de la región del α -core de la defensina de *Brassica hybrid* cv pule exhibieron actividad contra *Colletotrichum gloeosporioides*, aunque dicho efecto sólo fue observado en concentraciones milimolares (Kaewklom et al., 2016). Probablemente, los motivos α - y γ -core requieren la presencia de residuos adyacentes para exhibir actividad antifúngica. Muñoz et al. (2014) encontraron que el γ -core de MsDef1, una defensina activa contra *N. crassa*, no muestra actividad antifúngica por sí mismo, pero sí un péptido que se expande seis residuos extra de dicho motivo (incluyendo residuos de Trp, Arg y Lys) muestra una alta actividad inhibitoria. Por el contrario, el γ -core de MtDef4, que presenta tres residuos de Arg, es casi tan eficaz como la molécula de defensina completa contra el hongo anteriormente mencionado y la adición de aminoácidos hacia el extremo C-terminal no afecta su actividad biológica. En este trabajo, para el diseño de los péptidos, se decidió expandir los motivos α - y γ -core de DefSm2D hacia la región N-terminal en ambos casos, debido a la presencia de residuos de Lys y Trp que podrían mejorar la actividad antimicrobiana. De hecho, se verificó un aumento de actividad para el péptido SmAP2_{α1-21} en

comparación con SmAP2_{α10-21}. SmAP2_{α1-21} contiene la secuencia SmAP_{α10-21} pero además posee una carga neta superior dada por la presencia de tres residuos de Lys adicionales. De manera similar, se demostró que dos péptidos de 10 aminoácidos de la región N-terminal de una defensina de arroz (OsAFP1) fueron activos contra *Candida albicans* en concentraciones micromolares. Estos péptidos se diseñaron, entre otros, como péptidos superpuestos de diferentes regiones que cubrían toda la secuencia de OsAFP1 e incluyeron residuos hidrófobos y catiónicos en sus secuencias (Ochiai et al., 2018).

El papel del motivo α -core en la actividad antifúngica ha sido muy poco estudiado, de hecho, en este trabajo de tesis se ha reportado por primera vez que péptidos derivados de este motivo y sus regiones adyacentes inhiben el crecimiento de hongos en concentraciones micromolares. Por este motivo, se decidió profundizar en su estudio diseñando nuevos péptidos a partir de la secuencia del péptido base SmAP2_{α1-21}. Los péptidos modificados (SmAP2H19R, SmAP2H19A y cSmAP2C14S) también exhibieron actividad a concentraciones micromolares. El cambio de His19 por Arg en el péptido base (péptido SmAP2H19R) aumenta la carga neta positiva en un valor de 0,1 unidades; pero esto no produjo un efecto significativo sobre la actividad antifúngica debido a que se mantuvo la CIM y el tiempo de muerte respecto del péptido base. No obstante, el cambio de His19 por un residuo neutro como Ala (péptido SmAP2H19A) produjo una disminución en la carga neta de una unidad y un aumento significativo tanto en la CIM como en el tiempo de muerte de los conidios, evidenciando entonces la importancia de la carga positiva en estos péptidos. El papel de la carga positiva se vincula con las interacciones electrostáticas que pueden establecer los aminoácidos básicos con sus dianas en los sitios *target*. En particular, se ha descrito la importancia del aminoácido Arg, que presenta una cadena lateral alifática relativamente larga con un grupo guanidino terminal cargado positivamente. Cuando este residuo se encuentra expuesto en una interfase, la parte alifática se orienta hacia la porción hidrofóbica de la membrana mientras que el grupo guanidinio puede interactuar en la parte polar con los grupos fosfatos de los fosfolípidos, comportamiento conocido como *snorkeling*

(Killian & Von Heijne, 2000). Con respecto al péptido cíclico, se observó que la CIM se duplicó aproximadamente respecto al péptido base lo cual podría atribuirse a la ausencia de la Gly terminal, debido a que su síntesis no fue exitosa. Sin embargo, este péptido mostró ser muy eficaz en el ensayo *time to kill*, produciendo la muerte de los conidios en sólo 30 minutos de incubación, comparable a los resultados obtenidos con el péptido derivado del γ -core. La ciclación de las Cys con la consiguiente formación del enlace disulfuro confiere estabilidad a un péptido o proteína, con lo que podría esperarse que potencie la actividad de las defensinas. Esto ha sido reportado para el caso de persulcatina, una defensina de la garrapata *Ixodes persulcatus* en la que péptidos lineales derivados de dicha defensina presentaron menor actividad respecto a las formas oxidadas. Esto también se verificó en el caso de coprosina, una defensina del escarabajo *Copris tripartitus*, donde la pérdida de un enlace disulfuro afectó su actividad antibacteriana. Para dos β -defensinas humanas se ha reportado que la ciclación de sus γ -core potencia su actividad antibacteriana, mientras que para péptidos truncados obtenidos a partir de la α -defensina HNP-1 y con ausencia de enlaces disulfuro, se mantuvo la actividad (Lundy et al., 2008). En este mismo sentido, en el caso de TC3, un potente péptido antifúngico derivado del γ -core de una defensina de la garrapata *Ixodes ricinus*, se demostró que no requiere la ciclación de las Cys para inhibir el crecimiento y la producción de micotoxinas de *F. graminearum*. De hecho, la formación de enlace disulfuro en dicho péptido redujo notablemente la actividad (Leannec-Rialland et al., 2021). En péptidos derivados de la defensina del tomate SolyC07g007760, diseñados a partir del γ -core se demostró que la ciclación de los péptidos, resulta en la segregación de cargas positivas en la región de giro y produce péptidos muy activos contra bacterias Gram negativas (Avitabile et al., 2013). La actividad del péptido cíclico sintetizado en el presente estudio de tesis fue muy promisorio por los tiempos reducidos en los cuales fue capaz de ejercer su acción.

A través de los ensayos en los que se utilizó la sonda yoduro de propidio, se demostró que los péptidos SmAP2 _{α 1-21}, SmAP2 _{α 10-21} y SmAP2 _{γ 27-44} así como los péptidos derivados de SmAP2 _{α 1-21}

produjeron la permeabilización de la membrana plasmática de conidios de *F. graminearum*. Este colorante penetra en las células con membranas dañadas y se une a los ácidos nucleicos en células necróticas y apoptóticas tardías, por lo que es indicativo de la pérdida de viabilidad celular. Todos los conidios analizados internalizaron el IP dentro de la hora de incubación cuando se trataron con los péptidos derivados del α - y γ -core a sus respectivas CIM, excepto en el caso del péptido SmAP2H19A que produjo dicho efecto, pero luego de 2 horas de incubación. Estos resultados sugieren que la permeabilización de la membrana es un factor que contribuye a la actividad antifúngica de estos péptidos o bien una consecuencia de su acción y que la carga positiva en la posición 19 incluida dentro de la región α -core es importante, aunque no determinante para la permeabilización de membrana. En contraste con otros estudios de permeabilización de membranas en hifas de hongos causadas por defensinas o péptidos derivados, los ensayos realizados en el presente trabajo de tesis se hicieron en conidios que son estructuras fúngicas dotadas de gruesas paredes celulares, enfatizando la actividad antimicrobiana prometedora de los péptidos derivados de la defensina DefSm2D de *S. marianum*. La presencia de Phe y/o Trp como "anclajes hidrofóbicos" y residuos catiónicos podrían desempeñar un papel clave en la permeabilización de la membrana. Al respecto, Sagaram et al. (2011) demostraron la importancia del residuo Phe en el hexapéptido RGFRRR derivado del γ -core de la defensina MtDef4, que provoca la permeabilización de hifas en *F. graminearum*, mientras que la variante RGARRR no produce permeabilización en las mismas condiciones de ensayo. Los residuos aromáticos e hidrofóbicos presentes en SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ y sus péptidos derivados, SmAP2 $_{\alpha 10-21}$ y SmAP2 $_{\gamma 27-44}$ tendrían un papel importante en relación con su actividad antifúngica, tal como se desprende de la falta de actividad mostrada para SmAP2 $_{\gamma 29-36}$, péptido que cuenta con una mínima presencia de residuos hidrofóbicos en comparación con los péptidos activos. En el ensayo de permeabilización se observó que los péptidos derivados del α -core (SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ y SmAP2 $_{\alpha 10-21}$) produjeron la agregación de los conidios, no así aquellos diseñados a partir de SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ (SmAP2H19R, SmAP2H19A y cSmAP2C14S). El efecto de la

agregación celular producida por defensinas fue observado por Velivelli et al. (2018) sobre la bacteria *Xanthomonas campestris* tratada con MtDef5B, uno de los dos dominios de una defensina de *M. truncatula*. Estos autores también encontraron que el reemplazo simultáneo de His-Arg por Ala-Ala en los dos motivos de γ -core de MtDef5 (His36 y Arg37 en el dominio A e His93 y Arg94 en el dominio B) conduce a una pérdida del efecto de destrucción de las células bacterianas, previene la acumulación de agregados e induce la formación de estructuras similares a cadenas de bacterias. En SmAP $_{\gamma 27-44}$, aunque está presente un residuo de Arg –equivalente a la posición de Arg37 en MtDef5– no hay His adyacente y no se observa agregación visible en el ensayo de captación de IP. Por el contrario, los péptidos derivados del α -core de DefSm2D que presentan un residuo de His adyacente a Arg (Arg18 e His19 en relación con la numeración de DefSm2D) fueron capaces de inducir la agregación de los conidios. Este efecto tampoco se observó en el caso de los péptidos modificados lineales SmAP2H19R y SmAP2H19A donde el residuo de His19 fue modificado. Sin embargo, para el péptido cíclico que presenta los residuos Arg18-His19, tal como se encuentran en el péptido base, tampoco se observó el fenómeno de agregación, lo que podría asociarse a un mecanismo de acción distinto debido a la presencia del enlace disulfuro.

Otro de los posibles efectos involucrados en el mecanismo de la actividad antifúngica de varios AMPs y en particular de las defensinas incluye la generación de especies reactivas de oxígeno–ROS (François et al. 2006; Aerts et al. 2011). Para la defensina RsAFP2 de *R. sativus* se demostró que su mecanismo de acción sobre la levadura *C. albicans* involucra la producción de ROS como consecuencia de una cascada de señalización inducida luego de la unión de la defensina a glucosilceramida y de la permeabilización de la membrana celular (Aerts et al. 2007). La producción excesiva de ROS y su acumulación en el citoplasma celular puede conducir a estrés oxidativo, produciendo daños en el ADN y ARN, daño mitocondrial, oxidación de lípidos y proteínas, pudiendo desencadenar en última instancia la apoptosis o la muerte celular programada (Parisi et al., 2018). Tanto en el caso de SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ y sus péptidos derivados como



de SmAP2_{γ27-44} se verificó la producción de ROS en los conidios tratados tanto por fluorimetría como por microscopía confocal. En consecuencia, la producción de ROS podría ser parte del mecanismo de acción de los péptidos derivados de DefSm2D. El efecto de la producción de ROS se visualizó a partir de una hora y media de tratamiento con los péptidos, sugiriendo que es un fenómeno que se produce luego de la permeabilización de la membrana celular, quizás como consecuencia de este evento. Si bien se ha reportado la producción de ROS como un evento implicado en la cascada de señalización luego del tratamiento con defensinas, los resultados parecerían indicar en el caso de SmAP2_{γ27-44} y cSmAPC14S que la producción de ROS podría ser una consecuencia del daño celular más que un evento implicado en señalización debido a que en menos de 30 minutos estos péptidos ocasionan la muerte de los conidios, tal como se desprende de los resultados de tiempo de muerte. Para SmAP2_{α1-21} y SmAP2H19R el tiempo de muerte se sitúa entre 1-3 h y en ese caso la producción de ROS podría responder a ambos fenómenos. En el péptido SmAP2H19A, tanto la permeabilización de la membrana como la producción de ROS se produce en forma más lenta respecto al péptido base lo que también se correlaciona con un mayor tiempo de muerte observado para este péptido, situado entre las 3 y las 6 h.

El péptido derivado de la región α -core (SmAP2_{α1-21}) indujo modificaciones sobre la ultraestructura de los conidios, a nivel de su pared celular, según lo observado en las imágenes de TEM. Las paredes de las células fúngicas son estructuras complejas y dinámicas, esenciales para la viabilidad celular, morfogénesis y patogénesis, y están asociadas a muchas enzimas y vías metabólicas. Consisten en una capa interna electrón-lúcida que comprende un esqueleto estructural relativamente conservado de quitina y capas externas heterogéneas y electrón-densas de β -glucanos (Gow et al., 2003). Los resultados de TEM indican que esta capa protectora más externa podría ser afectada por la acción de SmAP2_{α1-21}. Existe poca bibliografía disponible respecto de la constitución de la pared celular de los hongos filamentosos, siendo diferente la composición según la estructura fúngica de la que se trate, aunque hay componentes básicos

que están presentes en todas ellas. Aun así, puede afirmarse que la pared celular de los hongos constituye un *target* prometedor para el desarrollo de compuestos antifúngicos debido a su organización bioquímica y estructural única, que está ausente en las células de plantas y mamíferos. La actividad antifúngica de los péptidos se podría explicar en función del efecto producido sobre varias moléculas potenciales, incluidos aquellos componentes químicos de la capa más externa, enzimas involucradas en la remodelación de la zona de la pared celular externa o sobre mensajeros que desencadenan la respuesta fúngica observada. La pared celular externa de los conidios de *F. graminearum* está formada por capas de α -(1,3) glucano con proteínas hidrofóbicas llamadas hidrofobinas, que forman una cubierta denominada *rodlets* que protegen las esporas (Quarantin et al., 2019). En la infección en plantas producidas por patógenos fúngicos, se requiere que las hidrofobinas penetren en la interfaz agua-aire y se adhieran a superficies hidrofóbicas, como por ejemplo el tejido de las espigas. Además, la presencia simultánea de diferentes hidrofobinas en la superficie de los conidios de *F. graminearum* podría formar un escudo protector contra compuestos tóxicos, convirtiendo esta estructura en un *target* potencial para compuestos antifúngicos. Con respecto a las enzimas responsables de remodelar y mantener la pared celular, la muerte celular podría ser el resultado de la inhibición de las polisacárido sintetas de la pared celular (Latgé, 2007). Además de ser activas frente a hongos filamentosos, se han reportado varias defensinas vegetales con actividad frente a levaduras (Hayes et al., 2013; Karin Thevissen et al., 2003, 2013); sin embargo, ninguno de los péptidos sintetizados en este trabajo fue activo frente al patógeno humano oportunista *C. albicans*. La ausencia de actividad podría vincularse a la composición diferencial de las paredes celulares de dicha levadura respecto a los hongos filamentosos, grupo al que pertenecen las especies del género *Fusarium*. Si bien comparten el esqueleto estructural básico de quitina y β -glucanos, las levaduras carecen de α -(1,3) glucanos en la capa más externa y de hidrofobinas. En cambio, hacia el exterior poseen una red de glicoproteínas manosiladas cubriendo las capas más internas (Gow et al., 2003).

Para el péptido derivado del γ -core, SmAP2 $_{\gamma 27-44}$, no se observaron cambios morfológicos aparentes en la pared celular, sin embargo, el efecto observado en el citoplasma que comenzó a desprenderse de la pared celular podría ser indicativo de una etapa temprana de deterioro celular. Un efecto similar fue observado por Sagaram et al. al tratar hifas de *F. graminearum* con la defensina MtDef4 (Sagaram et al., 2013). Tanto para SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ como para SmAP2 $_{\gamma 27-44}$, se observó un citoplasma electrón-denso y granuloso, similar al observado al tratar hifas de *F. graminearum* y *F. oxysporum* con MtDef4 y Nad1, respectivamente (Sagaram et al., 2013; Weerden et al., 2008). A su vez, también en ambos casos se verificó la presencia de un mayor número de peroxisomas en el citoplasma celular respecto de lo observado en el control. Los peroxisomas son organelas dinámicas que la célula fúngica puede formar rápidamente en función de las condiciones ambientales y el estadio de desarrollo. La biogénesis *de novo* y la fisión a partir de peroxisomas ya existentes son procesos que la célula utiliza para aumentar el número de estas organelas (Falter & Reumann, 2022). En los hongos filamentosos, están involucrados en varios procesos metabólicos celulares. Participan en la β -oxidación de ácidos grasos destinados a la generación de energía y/o la producción de precursores de pared (quitina y glucanos), en el ciclo del glioxilato, en la biosíntesis de metabolitos secundarios y, en conjunto con las mitocondrias, en la producción y detoxificación de ROS (Chen et al., 2016; Min et al., 2012; Navarro-Espíndola et al., 2020). Asimismo, en los hongos filamentosos, pueden formar cuerpos de Woronin (WB), orgánulos ricos en proteínas localizados adyacentes a los tabiques en micelios, tubos germinativos, hifas infectivas y, con menos frecuencia, en conidios. Una de las funciones que ha sido descrita para los WB es el sellado de los poros de los tabiques de las hifas luego de un daño o herida, evitando así la fuga citoplasmática (Bartoszewska et al., 2011). La presencia de los peroxisomas en los conidios tratados con SmAP2 $_{\alpha 1-21}$ y SmAP2 $_{\gamma 27-44}$ podría dar cuenta de los procesos que tienen lugar como consecuencia de su acción, ya sea asociados a la detoxificación de las ROS producidas, la necesidad de contar con materia prima (energía o

estructuras carbonadas) para la remodelación de la pared o bien a través de la formación de WB para sellar los tabiques y evitar el daño en todas las células del conidio.

Según los efectos visualizados sobre la capa más externa de la pared de los conidios de *F. graminearum*, para SmAP2_{α1-21}, algún componente de la pared celular del hongo podría actuar como el primer sitio *target* de unión del péptido. Aunque no se trata del péptido más activo, es un punto de partida interesante para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos que podrían actuar sobre la pared celular de los hongos, una estructura clave en la resistencia frente a patógenos y en la evasión de la respuesta del huésped. Además, la composición diferencial de la pared celular del patógeno con respecto al huésped explicaría una acción selectiva de los péptidos sobre el hongo y no sobre la célula huésped (Gow et al., 2003). SmAP2_{γ27-44}, en cambio, podría inducir la muerte de las células fúngicas a través de un mecanismo diferente.

Otro posible *target* de los péptidos derivados de DefSm2D podría estar localizado a nivel de la membrana celular. Se ha reportado que muchas defensinas vegetales se unen a componentes específicos de las membranas celulares fúngicas como paso inicial de su mecanismo de acción. Con el fin de evaluar la capacidad de los péptidos de interactuar con membrana, se realizaron ensayos sobre monocapas, empleando una composición similar a una membrana fúngica, con lípidos mayoritarios de la hemicapa externa. Los resultados de estos ensayos mostraron que todos los péptidos activos fueron capaces de interactuar con dichas monocapas luego de la inyección en la subfase, produciendo cambios importantes en la presión superficial. A su vez, en todos los casos la presión crítica fue superior a 30 mN/m, valor considerado como equivalente a la presión crítica de la monocapa externa de una membrana celular (Seelig, 1987). Más aun, mayor fue el cambio de presión superficial y la presión crítica observada para el péptido derivado del γ -core y para el péptido cíclico cSmAP2C14S, lo que podría correlacionarse con los resultados obtenidos en el ensayo *time to kill*, donde ambos péptidos resultaron ser los más letales, produciendo la muerte de los conidios en menos de 30 minutos de incubación. No obstante, todos los péptidos mostraron una alta afinidad con las monocapas sugiriendo que la interacción

entre los péptidos y componentes de membrana podría tener lugar como parte de su mecanismo de acción. Se han reportado varias defensinas que poseen distintos lípidos de membrana como blanco, aunque muchos de estos lípidos se ubican en la monocapa interna. HsAFP1, una defensina de *Heuchera sanguínea*, interactúa de manera reversible con el fosfolípido ácido fosfatídico (PA) y en menor medida con varios fosfatidil inositol fosfatos (PIP) en *Saccharomyces cerevisiae* (Cools, Vriens, et al., 2017). NaD1 de *Nicotiana glauca*, se une a los grupos fosfato del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂), lo que conduce a la oligomerización y formación de complejos (Poon et al., 2014); lo mismo ha sido descrito para TPP3 de *Solanum lycopersicum* (Baxter et al., 2015). MtDef4 de *Medicago truncatula* y NsD7 de *Nicotiana glauca* se unen a PA (Kvansakul et al., 2016; Sagaram et al., 2013) y MtDef5 de *M. truncatula* es capaz de unirse a fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3P), fosfatidil inositol 4-fosfato (PI4P) y fosfatidil inositol 5-fosfato (PI5P) (Islam et al., 2017). La interacción directa con los fosfolípidos de la membrana plasmática conduce en todos los casos a la formación de complejos oligoméricos que juegan un papel importante en la permeabilización de la membrana fúngica. Con el fin de evaluar la localización de SmAP2_{α1-21} y sus péptidos derivados, se realizó su derivatización con una sonda fluorescente y se incubaron con conidios de *F. graminearum* empleando también el marcador de pared celular azul de tripán. Se observó que, a tiempos cortos de incubación, el péptido SmAP2_{α1-21} comenzó a ingresar al interior celular de los conidios a través de las células basal y apical, siendo su captación completa a partir de la hora de incubación y visualizándose la marca en todas las células de los conidios. Curiosamente, esto no fue observado para los péptidos derivados de SmAP2_{α1-21}, SmAP2H19R y SmAP2H19A, ya que dichos péptidos permanecen en la región extracelular de los conidios aún luego de 2 horas de incubación. Evidentemente, estos péptidos modificados ejercerían su acción desde el exterior de la célula fúngica induciendo en una primera instancia la permeabilización de la membrana celular seguida de la producción de ROS en el interior celular. Estos resultados indicarían que la His ubicada en posición 19 (que es el residuo que se modifica en SmAP2H19R y SmAP2H19A por

Arg y Ala, respectivamente) tendría un rol clave en la internalización del péptido base. La histidina es un aminoácido único que posee una cadena lateral constituida por el grupo imidazol, con un pKa de 6,5 que le confiere capacidad de cambiar su carga a pHs fisiológicamente relevantes (Bleackley et al., 2020). En cuanto a su naturaleza química, es un residuo aromático que presenta un anillo pentacíclico nitrogenado con dos átomos de nitrógeno que pueden funcionar como donores de electrones. Las características fisicoquímicas de este aminoácido le permiten establecer interacciones de diferente naturaleza, ya sea la formación de complejos de coordinación con cationes metálicos, interacciones catión- π , hidrógeno- π o π - π . El tipo de interacción que prevalezca dependerá fundamentalmente del pH del medio (Pirtskhalava et al., 2021). Si bien se encuentra representada en muchos péptidos antimicrobianos, el rol de la histidina en los AMPs así como su participación en los mecanismos de acción correspondientes no ha sido estudiado en profundidad como sí ha ocurrido con otros residuos tales como arginina o lisina (Hitchner et al., 2019). Es interesante destacar que tiene la capacidad de formar los mismos complejos no covalentes que la Arg, aunque en menor medida y con menor estabilidad (Muller et al., 2019). Más aún, se ha demostrado que el grupo imidazol de una histidina protonada tiene propensión a formar pares de contacto con carga similar con otra histidina protonada o con arginina, interacción que posee una fuerza similar a la del emparejamiento arginina-arginina (Heyda et al., 2010). Esta interacción Arg-Arg es importante en los llamados *cell penetrating peptides* (CPPs), en los que se ha demostrado que tiene un rol relevante en la internalización de este tipo de péptidos (Pirtskhalava et al., 2021). Para las defensinas vegetales se ha demostrado en algunos casos la importancia de la His. En defensinas de Solanaceae y Brassicaceae ha sido descrito un rol importante en las respuestas de plantas en relación con la tolerancia frente a metales dada por la capacidad de unión a metales de este residuo aminoacídico (Bleackley et al., 2020). En HsAFP1, el cambio de la His32 junto con la Arg52 (lejanas en la secuencia pero cercanas en la estructura tridimensional) anula tanto su capacidad de unión a PA y a varios PIPs como la permeabilización de membrana y su actividad antifúngica

(Cools, Vriens, et al., 2017). En la defensina bidominio MtDef5, a través de estudios de *scanning* de alanina se demostró que el motivo HR en los dos dominios que la constituyen (His36 y Arg37 en MtDef5A y His93 y Arg94 en MtDef5B) son cruciales para su actividad tanto antifúngica como antibacteriana (Islam et al., 2017; Velivelli et al., 2018). Cabe destacar que tanto HsAFP1 como MtDef5 se internalizan en las células fúngicas para exhibir su actividad lo cual podría asociarse a la presencia de la His y/o Arg, ya que el cambio en estos residuos simultáneamente anula la actividad de estas proteínas. Para esas defensinas el mecanismo de internalización demostrado incluye la endocitosis. En el caso de los péptidos modificados en este trabajo de tesis, el cambio en la His no ocasionó la anulación de la capacidad de permeabilizar la membrana, inducir ROS y muerte celular, aunque sí el reemplazo por Ala produjo que todos los procesos se volvieran más lentos. El cambio más notorio fue la no internalización de los péptidos sin His, destacando el rol de este aminoácido en este evento, que podría producirse, tal como en el caso de MtDef5 o HsAFP1 por vía endocítica, o bien tal como fue demostrado para NaD1 a través de la traslocación del péptido en la membrana (Cools, Vriens, et al., 2017; Van Der Weerden et al., 2010).

Los hongos patógenos presentan una notable flexibilidad genética que contribuye a la rápida evolución y adaptación al huésped y al medio ambiente. Para evitar la aparición de cepas resistentes, es necesario el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos. En el presente trabajo de tesis se estudió la actividad antifúngica de péptidos sintéticos derivados de la región del α - y γ -core de la defensina DefSm2D de la planta silvestre *S. marianum* contra conidios de *F. graminearum*. Independientemente de su mecanismo de acción preciso, la composición de aminoácidos de los péptidos activos sugiere que los residuos de aminoácidos cargados positivamente combinados con aromáticos constituyen *signatures* distintivos y obligatorios para lograr la actividad antimicrobiana. En este sentido, los péptidos sintetizados en el presente trabajo de tesis constituirían agentes antifúngicos prometedores, ya que son activos *in vitro* frente a una estructura fúngica con gruesas paredes como lo son los conidios.

Los resultados obtenidos con los péptidos sintetizados en el presente trabajo evidencian que tan solo el cambio en un aminoácido puede modificar significativamente su actividad, generando variantes más o menos activas y alterando su mecanismo de acción. En la prevención y tratamiento de enfermedades fúngicas de plantas es clave contar con agentes cuyos mecanismos de acción sean distintos a los fines de evitar la generación de resistencia por parte de los patógenos. En este sentido, el diseño racional de péptidos se constituye como una poderosa herramienta para el desarrollo de moléculas de interés. En este trabajo de tesis se presenta la relevancia de las defensinas vegetales como plantillas –no sólo en base al reconocido motivo γ -core, sino como ha sido demostrado en base al α -core– por su amplio espectro de acción sobre patógenos fúngicos, múltiples *targets* y mecanismos de acción diferenciales; y en particular se profundizó en el estudio de la relevancia del residuo His en la internalización como parte del mecanismo de acción de un AMP.

TABLA A1 | Sitios potenciales de hidroxilación sobre residuos de prolina ubicados en el dominio C-terminal de DefSm1.

Posición predicha del sitio de hidroxiprolina	Secuencia*
84	KDEKK P PKHKSP
91	PKHKSP P PKDKKP
97	PPKDKK P PKDKK
98	PKDKK P PKDKKP
105	PKDKK P PKDKSP
111	PPKDKS P PPKAG
113	KDKSP P PKAGSP
130	DGGSS P PKDGSS
147	DGGSS P PKAGSP
153	PPKAGS P PPKAG
155	KAGSP P PKAGSP
161	PPKAGS P PPKDK
163	KAGSP P PKDKSS
164	AGSP P PKDKSSP
172	DKSS P PKDKSS
173	KSS P PKDKSSP
181	DKSS P PKDKSS
182	KSS P PKDKSSP
190	DKSS P PKDKSP
196	PPKDKS P SPPPK
200	KSPS P PKDKSP
206	PPKDKS P SPPPK
210	KSPS P PKDKSP
216	PPKDKS P SPPPK
220	KSPS P PKDKSP
226	PPKDKS P SPPPK
230	KSP P PKDKSS
231	SP P PKDKSSP
238	KDKSS P PKHEM
239	DKSS P PKHEMP
240	KSS P PKHEMPL

*Se indica en color rojo y en negrita el residuo de prolina identificado como el sitio potencial de hidroxilación. Los resultados fueron obtenidos con el servidor iHyd-PseAAC (<http://app.aporc.org/iHyd-PseAAC/>)



TABLA A2 | Listado de las defensinas vegetales utilizadas para realizar el análisis filogenético, extraídas de la base de datos del NCBI. Se incluye el número de acceso (GenBank), la especie y familia correspondiente.

Defensina	Fuente	Familia	N° acceso (GenBank)	Defensina	Fuente	Familia	N° acceso (GenBank)
Aainhi21	<i>Sorghum bicolor</i>	Poaceae	Q09198	MsDef3.1	<i>Medicago sativa</i>	Fabaceae	AAT66095
AdAFP	<i>Arachis diogeni</i>	Fabaceae	AAO72633	MtDef2.1	<i>Medicago sativa</i>	Fabaceae	AAT69983
AdDef	<i>Arachis diogeni</i>	Fabaceae	AAP92330	MsDef3.2	<i>Medicago sativa</i>	Fabaceae	AAT66096
AFP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	P30224	MtDef2	<i>Medicago truncatula</i>	Fabaceae	AY313169
AFP2B	<i>Sinapis alba</i>	Brassicaceae	Q10989	MtDef3.1	<i>Medicago truncatula</i>	Fabaceae	AAT66097
AhAMP1	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Sapindaceae	AAB34970	MtDef3.1a	<i>Medicago truncatula</i>	Fabaceae	AAT69983
AhPDF1.1	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicaceae	AA27736	MtDef4	<i>Medicago truncatula</i>	Fabaceae	2LR3_A
AhPDF1.2	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicaceae	AA27737	MtDef1.1	<i>Medicago truncatula</i>	Fabaceae	AAQ91287
AhPDF1.4	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicaceae	AA27739	NaD1	<i>Nicotiana glauca</i>	Solanaceae	Q8GTM0
Art v 1	<i>Artemisia vulgaris</i>	Asteraceae	GBK62707	NaD2	<i>Nicotiana glauca</i>	Solanaceae	AOD7534
At2g26010	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	O80995	NatD1	<i>Nicotiana attenuata</i>	Solanaceae	AAS13436
At2g26020	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	O80994	Nethio1	<i>Nicotiana excelsior</i>	Solanaceae	BAA21114
AtAFP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	P30224	Nethio2	<i>Nicotiana excelsior</i>	Solanaceae	BAA21113
AtAMP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	AAM45086	Nphio1	<i>Nicotiana paniculata</i>	Solanaceae	O24115
AtAMP1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	AAL36289	p322	<i>Solanum tuberosum</i>	Solanaceae	P20346
AX1	<i>Beta vulgaris</i>	Amaranthaceae	P81493	PCP-A1	<i>Brassica oleracea</i>	Brassicaceae	CAA06464
AX2	<i>Beta vulgaris</i>	Amaranthaceae	P82010	PeDef	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Fabaceae	3PSM
BnAFP	<i>Brassica napus</i>	Brassicaceae	Q39313	PgD1	<i>Picea glauca</i>	Pinaceae	AAR84643
BnDef1.2	<i>Brassica napus</i>	Brassicaceae	AAX35338	PhD1	<i>Petunia hybrida</i>	Solanaceae	Q8H6Q1
BoDef	<i>Brassica oleracea</i>	Brassicaceae	CAC37558	PhD2	<i>Petunia hybrida</i>	Solanaceae	Q8H6Q0
BoPCP	<i>Brassica oleracea</i>	Brassicaceae	CAA06465	PmDef	<i>Plantago major</i>	Plantaginaceae	CAH58740
Brazzein	<i>Pentadiplandra brazzeana</i>	Pentadiplandraceae	P56552	PPT	<i>Petunia inflata</i>	Solanaceae	Q40901
CaDef1	<i>Cicer arietinum</i>	Fabaceae	ABC59238	PsD1	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	P81929



CaDef2	<i>Cicer arietinum</i>	Fabaceae	ABC02867	PsD2	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	P81930
CanDef1	<i>Capsicum annuum</i>	Solanaceae	AAL35366	RsAFP1	<i>Raphanus sativus</i>	Brassicaceae	P69241
CcDef	<i>Cajanus cajan</i>	Fabaceae	AAP49847	RsAFP2	<i>Raphanus sativus</i>	Brassicaceae	P30230
Ccgth	<i>Capsicum chinense</i>	Solanaceae	AAD21200	RsAFP3	<i>Raphanus sativus</i>	Brassicaceae	CAA65984
CfD1	<i>Cassia fistula</i>	Fabaceae	n/a	RsAFP4	<i>Raphanus sativus</i>	Brassicaceae	O24331
CfD2	<i>Cassia fistula</i>	Fabaceae	n/a	SaAFP1	<i>Sinapis alba</i>	Brassicaceae	P30231
Cpthio1	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	P83399	SaAFP2a	<i>Sinapis alba</i>	Brassicaceae	P30232
Cpthio2	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	P84920	SD2	<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	P82659
CtAMP	<i>Clitoria ternatea</i>	Fabaceae	AAB34971	Sla1	<i>Sorghum bicolor</i>	Poaceae	P21923
DmAMP1	<i>Dahlia merckii</i>	Asteraceae	POC8Y4	Sla2	<i>Sorghum bicolor</i>	Poaceae	P21924
DRR39	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	Q01784	Sla3	<i>Sorghum bicolor</i>	Poaceae	P21925
EcAMPD1	<i>Elaeis guineensis</i>	Arecaceae	XP_010910080	SoD2	<i>Spinacea oleraceae</i>	Amaranthaceae	P81571
EcAMPD1	<i>Elaeis guineensis</i>	Arecaceae	XP_010910081	SPI1B	<i>Picea abies</i>	Pinaceae	AAN40688
EGAD1	<i>Elaeis guineensis</i>	Arecaceae	AF322914	TaDef	<i>Triticum aestivum</i>	Poaceae	BAC10287
EjDef1	<i>Wasabi japonica</i>	Brassicaceae	BAB19054	TfAFP	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Fabaceae	AAO72632
Fabatin1	<i>Vicia faba</i>	Fabaceae	P81456	TkAMPD1	<i>Triticum kiharae</i>	Poaceae	P84963
Fabatin2	<i>Vicia faba</i>	Fabaceae	P81456	TkAMPD1.1	<i>Triticum kiharae</i>	Poaceae	P84965
FST	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanaceae	P32026	TkAMPD1.2	<i>Triticum kiharae</i>	Poaceae	P84964
GbDef	<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoaceae	AAU04859	TkAMPD2	<i>Triticum kiharae</i>	Poaceae	P84968
GmPI	<i>Glycine max</i>	Fabaceae	AAC97524	TkAMPD4	<i>Triticum kiharae</i>	Poaceae	P84970
HcAFP1	<i>Heliphila coronopifolia</i>	Brassicaceae	AER45491	TkAMPD3	<i>Triticum kiharae</i>	Poaceae	P84971
HcAFP3	<i>Heliphila coronopifolia</i>	Brassicaceae	AER45489	TPP3	<i>Solanum lycopersicum</i>	Solanaceae	AAA80496
HsAFP1	<i>Heuchera sanguinea</i>	Saxifragaceae	AAB34974	TtDEFL1	<i>Triticum turgidum</i>	Poaceae	P20158
HvAMP1	<i>Handerbergia violácea</i>	Fabaceae	n/a	TtDEFL2	<i>Triticum turgidum</i>	Poaceae	P20159
HvDEFL1	<i>Hordeum vulgare</i>	Poaceae	P20230	VaD1	<i>Vigna angularis</i>	Fabaceae	KAG24106
Jl-1	<i>Capsicum annuum</i>	Solanaceae	XP_016537483	VrD1	<i>Vigna radiata</i>	Fabaceae	AAR08912



Jl-2	<i>Capsicum annuum</i>	Solanaceae	XP_016537481	VrD2	<i>Vigna radiata</i>	Fabaceae	2GL1_A
LCR66	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	Q9C947	Vundef	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	ACJ06538
LCR67	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	NP_565119	ZmDef	<i>Zea mays</i>	Poaceae	NP001146 963
LCR68	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	Q9ZUL7	ZmES1	<i>Zea mays</i>	Poaceae	AAK08132
LCR69	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	Q39182	ZmES2	<i>Zea mays</i>	Poaceae	AAK08133
LCR70	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	Q41914	ZmESR6	<i>Zea mays</i>	Poaceae	CAH61275
LCR72	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	Q9ZUL8				
LCR73	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	P82782				
LCR74	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	Q9FFP8				
LCR77	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	NP_199255				
LCR78	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	P82787				
LmDef	<i>Lepidium meyenii</i>	Brassicaceae	AAV85992				
MsDef1.1	<i>Medicago sativa</i>	Fabaceae	AAV85437				
MsDef2.1	<i>Medicago sativa</i>	Fabaceae	AAV85438				



FIGURA A1 | Análisis de RP-HPLC y ESI-MS del péptido SmAP1_{γ29-46} (A) Cromatograma obtenido por RP-HPLC y **(B)** espectro de masas (ESI-MS) del péptido SmAP1_{γ29-46}, derivado del γ -core de la defensina DefSm1D.

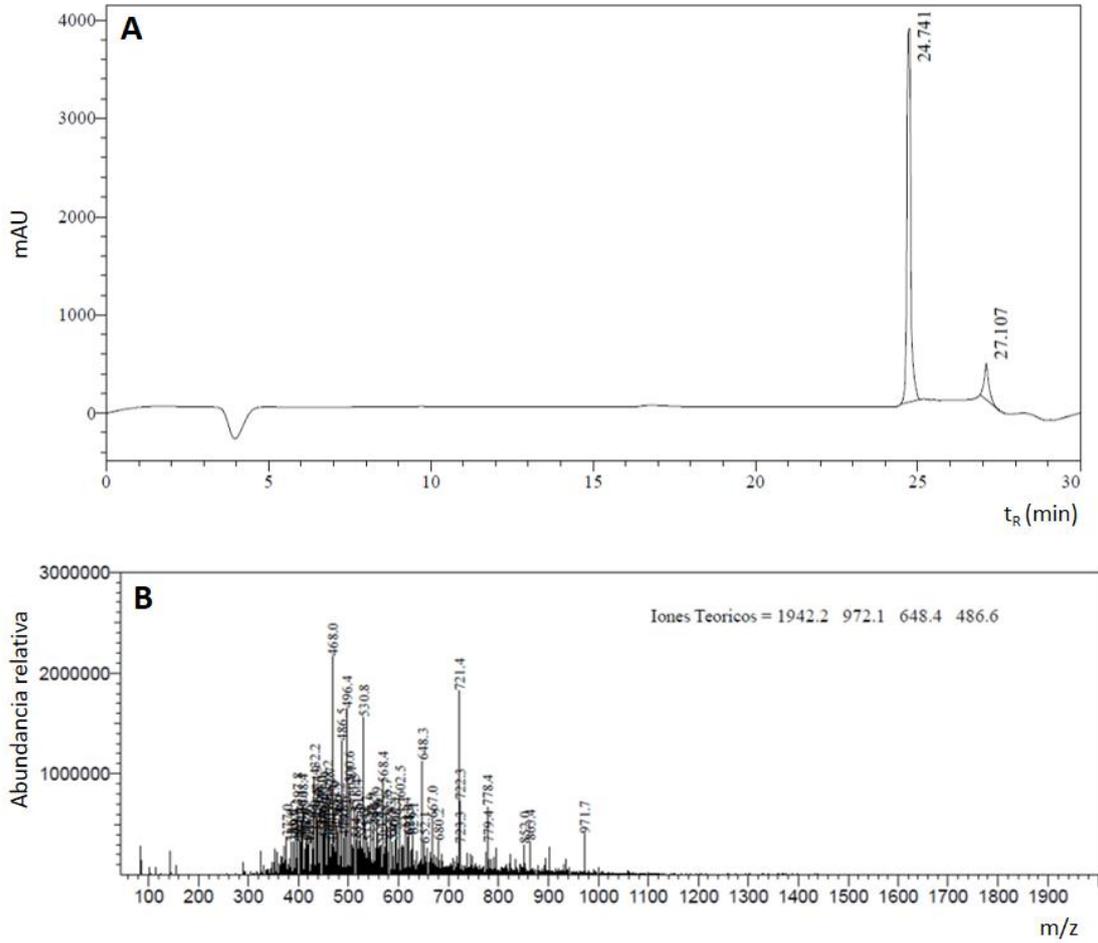




FIGURA A2 | Análisis de RP-HPLC y ESI-MS del péptido SmAP2 α 1-21 (A) Cromatograma obtenido por RP-HPLC y **(B)** espectro de masas (ESI-MS) del péptido SmAP2 α 1-21, derivado del α -core de la defensina DefSm2D.

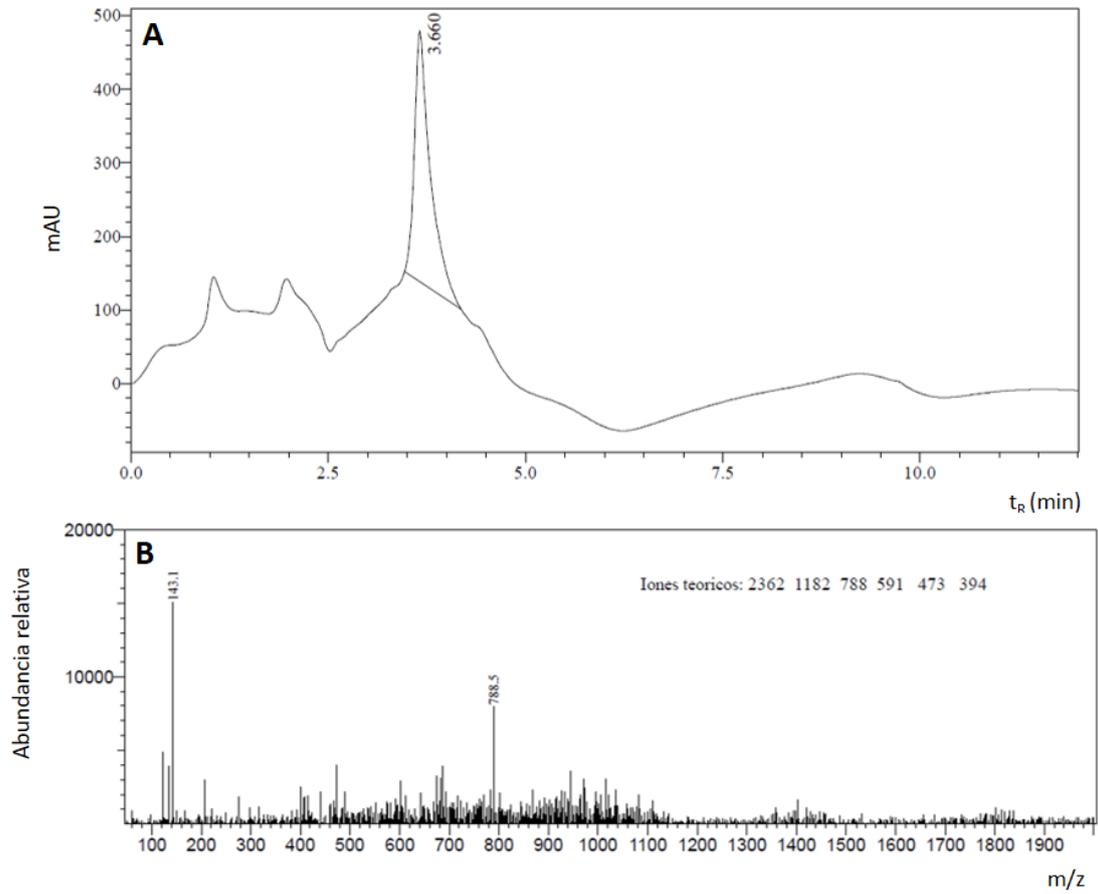




FIGURA A3 | Análisis de RP-HPLC y ESI-MS del péptido SmAP2 $_{\alpha 10-21}$ (A) Cromatograma obtenido por RP-HPLC y (B) espectro de masas (ESI-MS) del péptido SmAP2 $_{\alpha 10-21}$, derivado del α -core de la defensina DefSm2D.

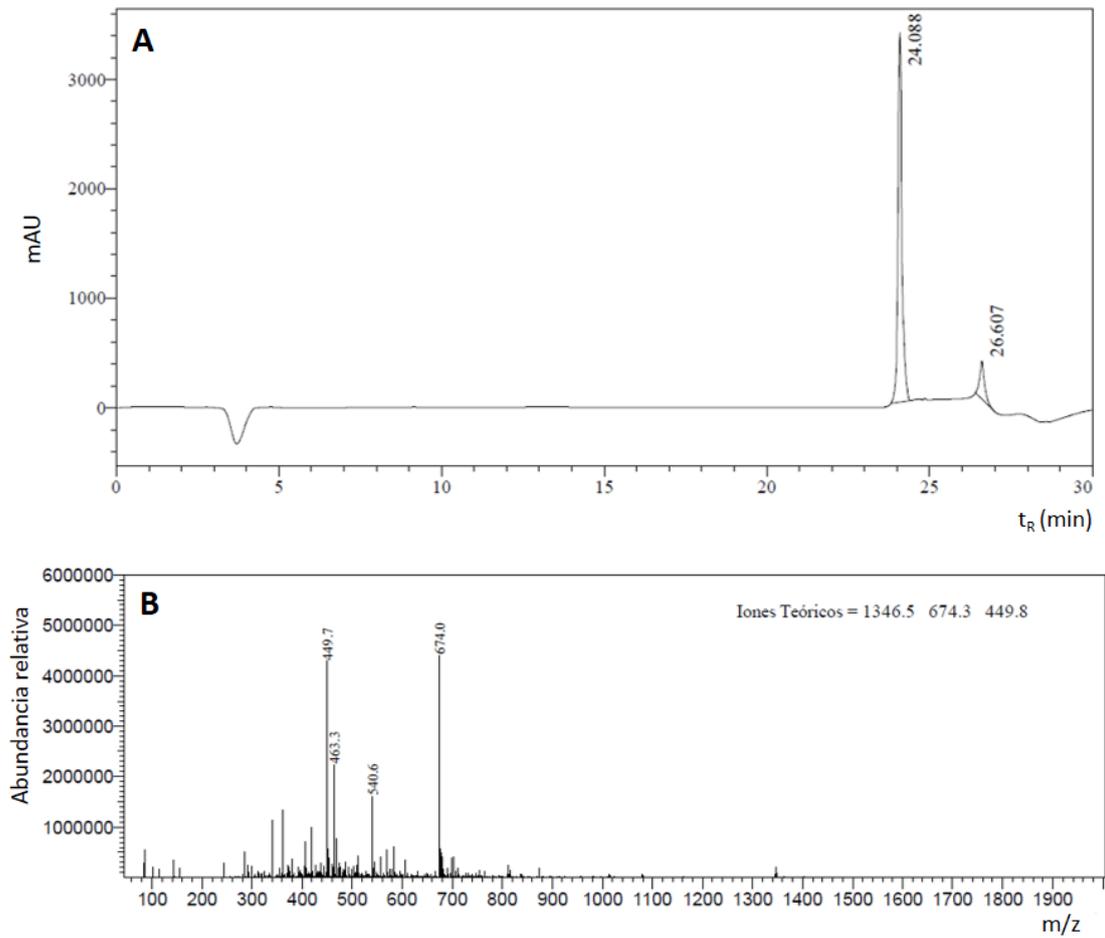




FIGURA A4 | Análisis de RP-HPLC y ESI-MS del péptido SmAP2 $_{\gamma 29-36}$ (A) Cromatograma obtenido por RP-HPLC y (B) espectro de masas (ESI-MS) del péptido SmAP2 $_{\alpha 29-36}$, derivado del γ -core de la defensina DefSm2D.

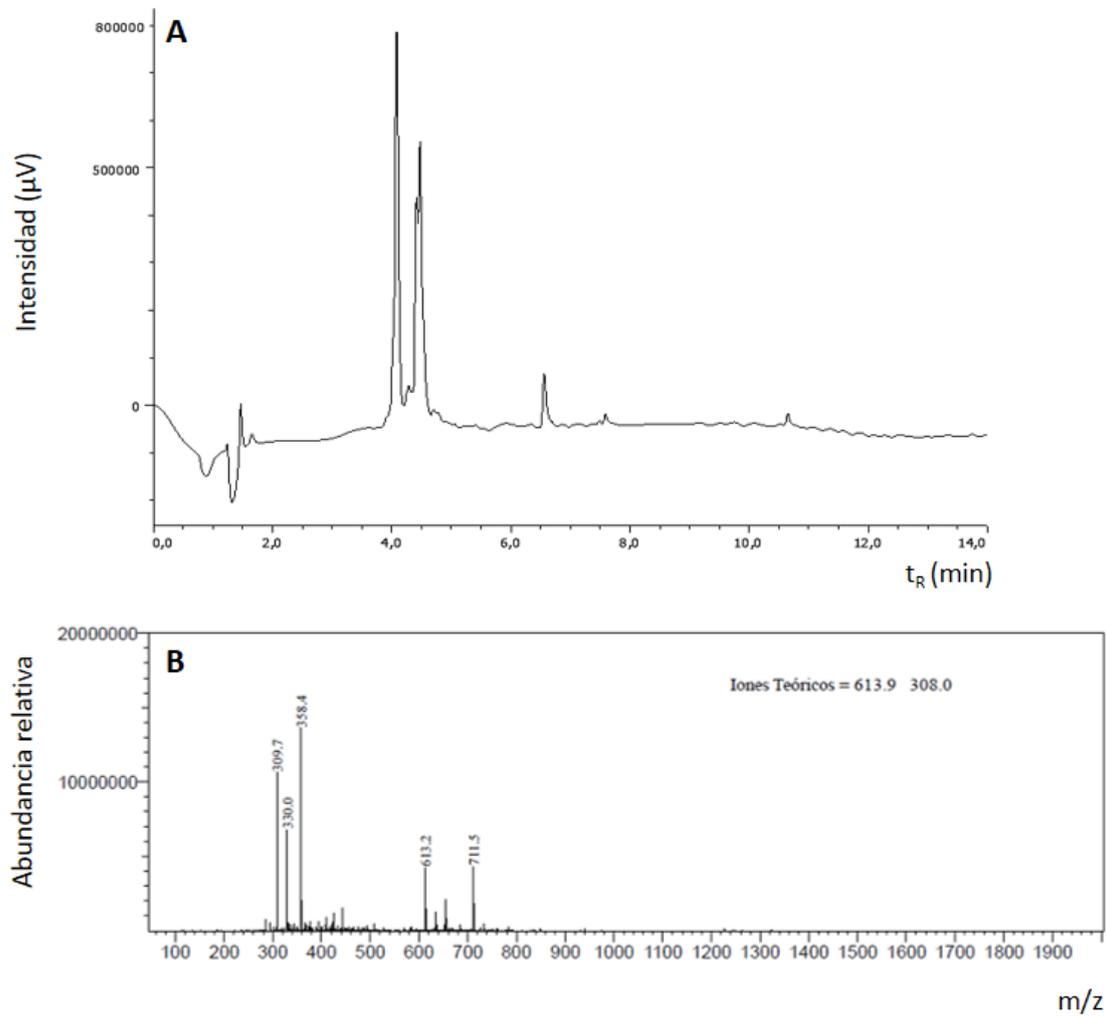




FIGURA A5 | Análisis de RP-HPLC y ESI-MS del péptido SmAP2_{γ27-44} (A) Cromatograma obtenido por RP-HPLC y (B) espectro de masas (ESI-MS) del péptido SmAP2_{α27-44}, derivado del γ -core de la defensina DefSm2D.

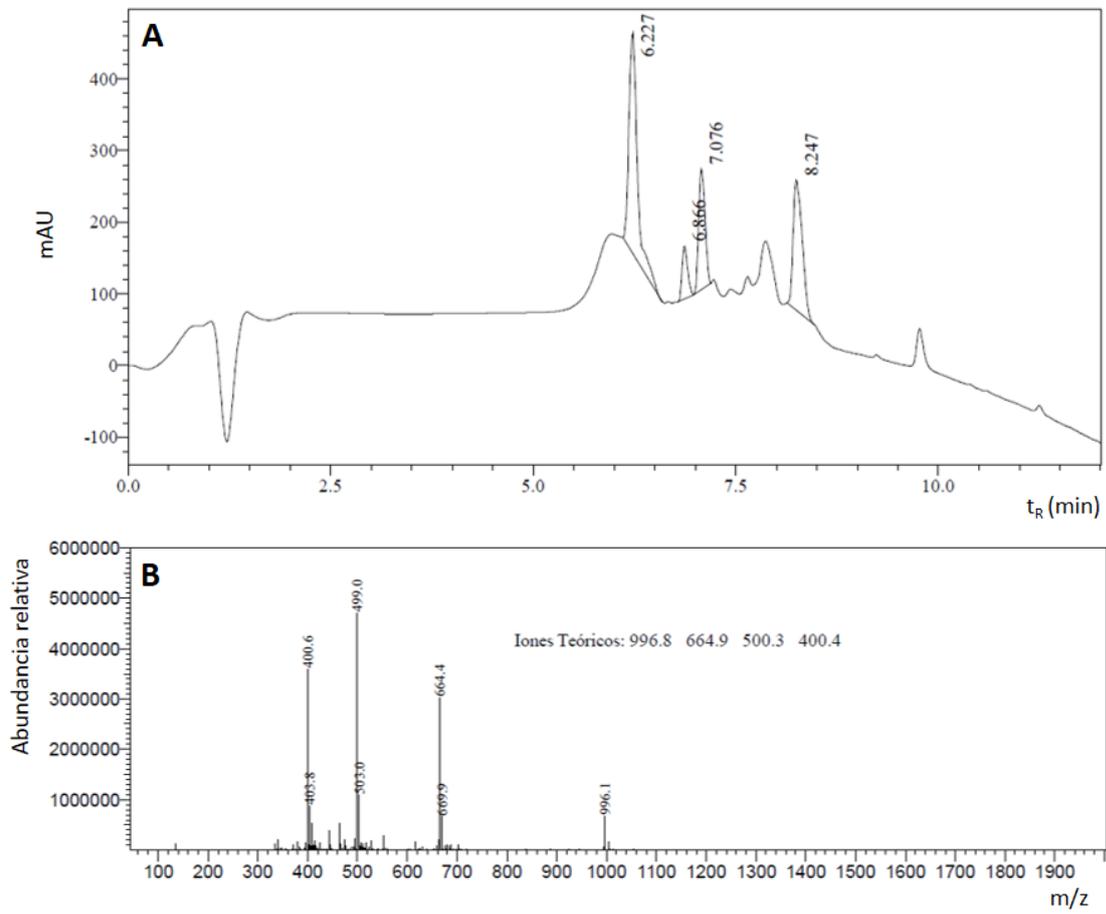




FIGURA A6 | Análisis de RP-HPLC y ESI-MS del péptido SmAP2H19R (A) Cromatograma obtenido por RP-HPLC y **(B)** espectro de masas (ESI-MS) del péptido SmAP2H19R, derivado del γ -core de la defensina DefSm2D.

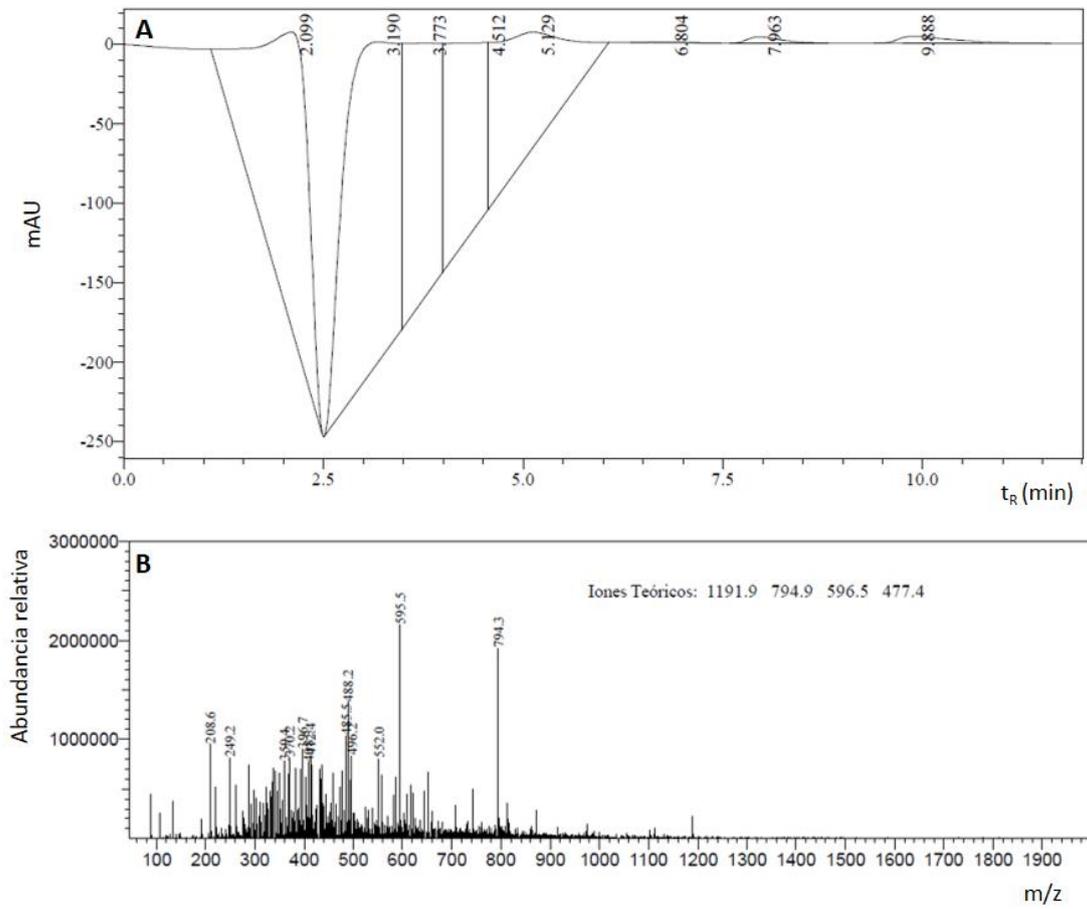




FIGURA A7 | Análisis de RP-HPLC y ESI-MS del péptido SmAP2H19A (A) Cromatograma obtenido por RP-HPLC y **(B)** espectro de masas (ESI-MS) del péptido SmAP2H19A, derivado del γ -core de la defensiva DefSm2D.

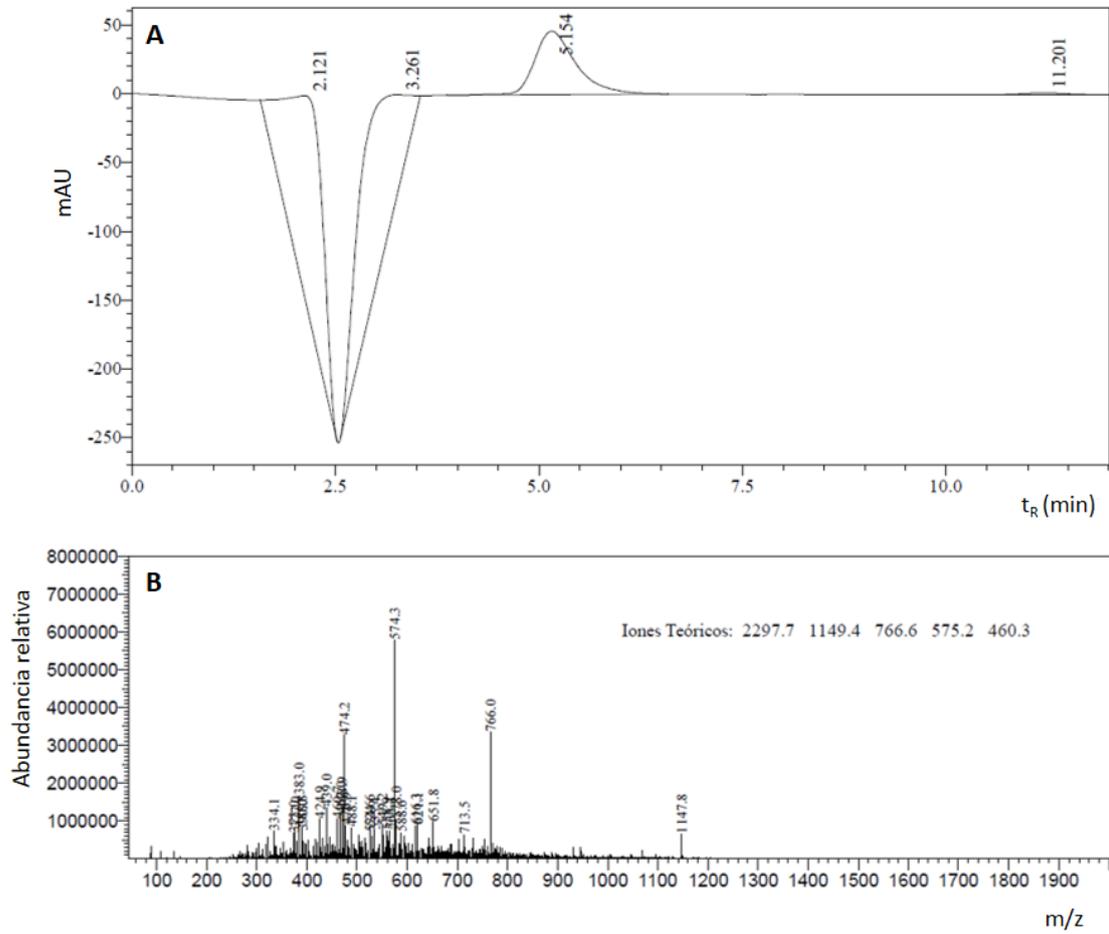
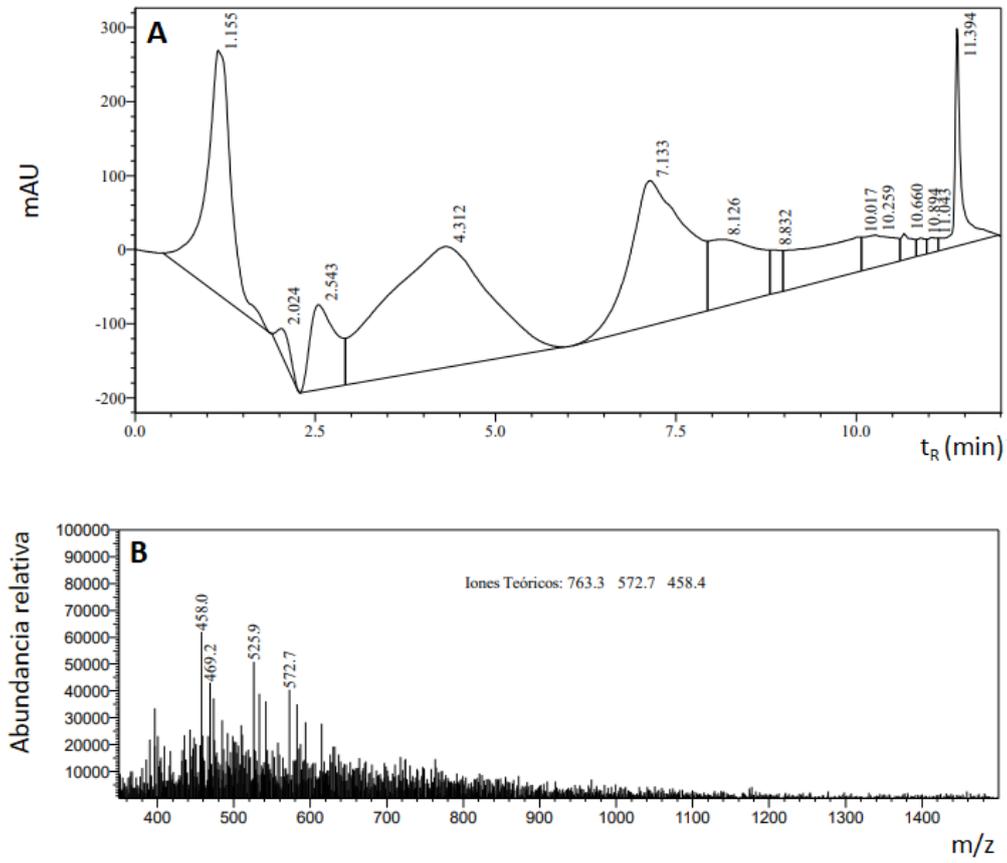




FIGURA A8 | Análisis de RP-HPLC y ESI-MS del péptido cSmAP2C14S (A) Cromatograma obtenido por RP-HPLC y **(B)** espectro de masas (ESI-MS) del péptido cSmAP2C14S, derivado del γ -core de la defensina DefSm2D.





Bibliografía

- Aerts, A. M., Bammens, L., Govaert, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Cammue, B. P. a, & Thevissen, K. (2011). The Antifungal Plant Defensin HsAFP1 from *Heuchera sanguinea* Induces Apoptosis in *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, 2(March), 47. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00047>
- Aerts, A. M., Carmona-Gutierrez, D., Lefevre, S., Govaert, G., François, I. E. J. A., Madeo, F., Santos, R., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2009). The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. *FEBS Letters*, 583(15), 2513–2516. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.004>
- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2008). The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(13), 2069–2079. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8035-0>
- Aerts, A. M., Francois, I., Meert, E., Li, Q.-T., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2007). The Antifungal Activity of RsAFP2 , a Plant Defensin from *Raphanus sativus* , Involves the Induction of Reactive Oxygen Species in *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 243–247. <https://doi.org/10.1159/000104753>
- Ajngi, Y. S., & Jongruja, N. (2020). Antimicrobial Peptide Engineering: Rational Design, Synthesis, and Synergistic Effect. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 46(4), 463–479. <https://doi.org/10.1134/S1068162020040044>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Albericio, F. (2004). Developments in peptide and amide synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(3), 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.03.002>
- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., Tyagi, A., Islam, S. T., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S., & Grover, A. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212–213(April), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>
- Andersen, E. J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., & Nepal, M. P. (2018). Disease resistance mechanisms in plants. *Genes*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/genes9070339>
- Astafieva, a a, Rogozhin, E. a, Odintsova, T. I., Khadeeva, N. V, Grishin, E. V, & Egorov, T. a. (2012). Discovery of novel antimicrobial peptides with unusual cysteine motifs in dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. flowers. *Peptides*, 36(2), 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.05.009>



- Avitabile, C., Capparelli, R., Rigano, M. M., Fulgione, A., Barone, A., Pedone, C., & Romanelli, A. (2013). Antimicrobial peptides from plants: Stabilization of the γ core of a tomato defensin by intramolecular disulfide bond. *Journal of Peptide Science*, *19*(4), 240–245. <https://doi.org/10.1002/psc.2479>
- Ba, R., Kluczyk, A., Stefanowicz, P., & Szewczuk, Z. (2013). *New method of peptide cleavage based on Edman degradation*. 605–611. <https://doi.org/10.1007/s11030-013-9453-y>
- Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., & Redwan, E. M. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*, *13*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>
- Bartoszewska, M., Opaliński, Ł., Veenhuis, M., & van der Klei, I. J. (2011). The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, *33*(10), 1921–1931. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0664-y>
- Baxter, A. A., Lay, F. T., Poon, I. K. H., Kvensakul, M., & Hulett, M. D. (2017). Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*(20), 3809–3825. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2604-z>
- Baxter, A. A., Richter, V., Lay, F. T., Poon, I. K. H., Adda, C. G., Veneer, P. K., Phan, T. K., Bleackley, M. R., Anderson, M. a., Kvensakul, M., & Hulett, M. D. (2015). The Tomato Defensin TPP3 Binds Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate via a Conserved Dimeric Cationic Grip Conformation To Mediate Cell Lysis. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(11), 1964–1978. <https://doi.org/10.1128/MCB.00282-15>
- Bigéard, J., Colcombet, J., & Hirt, H. (2015). Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular Plant*, *8*(4), 521–539. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>
- Bleackley, M. R., Dawson, C. S., Mckenna, J. A., Quimbar, P., Hayes, B. M. E., Weerden, N. L. Van Der, & Anderson, M. A. (2017). *crossm Synergistic Activity between Two Antifungal Proteins , the Plant Defensin*. *2*(5), 1–12.
- Bleackley, M. R., Vasa, S., Harvey, P. J., Shafee, T. M. A., Kerenga, B. K., Soares da Costa, T. P., Craik, D. J., Lowe, R. G. T., & Anderson, M. A. (2020). Histidine-rich defensins from the solanaceae and brasicaceae are antifungal and metal binding proteins. *Journal of Fungi*, *6*(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/jof6030145>
- Brauer, V. S., Rezende, C. P., Pessoni, A. M., De Paula, R. G., Rangappa, K. S., Nayaka, S. C., Gupta, V. K., & Almeida, F. (2019). Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health. *Biomolecules*, *9*(10), 1–21. <https://doi.org/10.3390/biom9100521>
- Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P., & Osborn, R. W. (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*,



- 108(4), 1353–1358.
- Carvalho, A. D. O., & Gomes, V. M. (2009). Plant defensins--prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30(5), 1007–1020. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.01.018>
- Carvalho, A. D. O., & Gomes, V. M. (2011). *Plant Defensins and Defensin-Like Peptides - Biological Activities and Biotechnological Applications*. 4270–4293.
- Chen, X. L., Wang, Z., & Liu, C. (2016). Roles of Peroxisomes in the Rice Blast Fungus. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9343417>
- Cologna, S. M., Russell, W. K., Lim, P. J., Vigh, G., & Russell, D. H. (2010). *Mass Spectrometry to Improve Peptide Detection and Protein Identification*. 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2010.04.010>
- Cools, T. L., Struyfs, C., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2017). Antifungal plant defensins : increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. *Future Microbiology*, 12, 441–454.
- Cools, T. L., Vriens, K., Struyfs, C., Verbandt, S., Ramada, M. H. S., Brand, G. D., Bloch, C., Koch, B., Traven, A., Drijfhout, J. W., Demuyser, L., Kucharíková, S., Van Dijck, P., Spasic, D., Lammertyn, J., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2017). The antifungal plant defensin HsAFP1 is a phosphatidic acid-interacting peptide inducing membrane permeabilization. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02295>
- Cytryńska, M., & Zdybicka-Barabas, A. (2015). Defense peptides: Recent developments. *Biomolecular Concepts*, 6(4), 237–251. <https://doi.org/10.1515/bmc-2015-0014>
- De Beer, A., & Vivier, M. A. (2011). Four plant defensins from an indigenous South African Brassicaceae species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. *BMC Research Notes*, 4. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-459>
- De Coninck, B., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2013). Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biology Reviews*, 26(4), 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.10.002>
- De Galich, M. T. V. (1997). Fusarium head blight in Argentina. In A. Dubin, H., Gilchrist, L., Reeves, J., McNab (Ed.), *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects* (CIMMYT, pp. 19–28).
- de Medeiros, L. N., Angeli, R., Sarzedas, C. G., Barreto-Bergter, E., Valente, A. P., Kurtenbach, E., & Almeida, F. C. L. (2010). Backbone dynamics of the antifungal Psd1 pea defensin and its correlation with membrane interaction by NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1798(2), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.07.013>



- De Paula, V. S., Razzera, G., Barreto-Bergter, E., Almeida, F. C. L., & Valente, A. P. (2011). Portrayal of complex dynamic properties of sugarcane defensin 5 by NMR: Multiple motions associated with membrane interaction. *Structure*, *19*(1), 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.11.011>
- Deepak, S., Shailasree, S., Kini, R. K., Muck, A., Mithöfer, A., & Shetty, S. H. (2010). Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defence. *Journal of Phytopathology*, *158*(9), 585–593. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01669.x>
- Dhople, V., Krukemeyer, A., & Ramamoorthy, A. (2006). The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1758*(9), 1499–1512. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.07.007>
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. W. (2018). *InfoStat* (No. 2018). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba,. <http://www.infostat.com.ar>
- Díaz de Ackermann, M., Kohli, M. . (2013). Chemical Control of Fusarium Head Blight of Wheat. In *Fusarium Head Blight in Latin America*. (pp. 175–189). Springer Netherlands. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-007-7091-1>
- Edman, P. (1950). Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica*, pp 283-293. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.04-0283>
- El-Mounadi, K., Islam, K. T., Hernández-Ortiz, P., Read, N. D., & Shah, D. M. (2016a). Antifungal mechanisms of a plant defensin MtDef4 are not conserved between the ascomycete fungi *Neurospora crassa* and *Fusarium graminearum*. *Molecular Microbiology*, *100*(3), 542–559. <https://doi.org/10.1111/mmi.13333>
- El-Mounadi, K., Islam, K. T., Hernández-Ortiz, P., Read, N. D., & Shah, D. M. (2016b). Antifungal mechanisms of a plant defensin MtDef4 are not conserved between the ascomycete fungi *Neurospora crassa* and *Fusarium graminearum*. *Molecular Microbiology*, *100*(3). <https://doi.org/10.1111/mmi.13333>
- Falter, C., & Reumann, S. (2022). The essential role of fungal peroxisomes in plant infection. *Molecular Plant Pathology*, *23*(6), 781–794. <https://doi.org/10.1111/mpp.13180>
- Fant, F., Vranken, W. F., & Borremans, F. a M. (1999). The three-dimensional solution structure of *Aesculus hippocastanum* antimicrobial protein 1 determined by ¹H nuclear magnetic resonance. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, *37*(3), 388–403. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19991115\)37:3<388::AID-PROT7>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19991115)37:3<388::AID-PROT7>3.0.CO;2-F)
- Finkina, E. I., & Ovchinnikova, T. V. (2018). Plant Defensins: Structure, Functions, Biosynthesis, and the Role in the Immune Response. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, *44*(3), 261–278. <https://doi.org/10.1134/S1068162018030056>



- Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W., & Schneider, G. (2012). *Designing antimicrobial peptides : form follows function*. 11(January). <https://doi.org/10.1038/nrd3591>
- Flor, H. H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, 32, 653–669.
- François, I. E. J. A., Cammue, B. P. A., Borgers, M., Ausma, J., Dispersyn, G. D., & Thevissen, K. (2006). Azoles: Mode of antifungal action and resistance development. Effect of miconazole on endogenous reactive oxygen species production in *Candida albicans*. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 5(1), 3–13. <https://doi.org/10.2174/187152106774755554>
- Garcia-Olmedo, F., Molina, a, Alamillo, J. M., & Rodriguez-Palenzuela, P. (1998). Plant defense peptides [Review]. *Biopolymers*, 47(6), 479–491.
- Garrigues, S., Gandía, M., Borics, A., Marx, F., Manzanares, P., & Marcos, J. F. (2017). Mapping and identification of antifungal peptides in the putative antifungal protein AfpB from the filamentous fungus *Penicillium digitatum*. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00592>
- Ghag, S. B., Singh Shekhawat, U. K., & Ganapathi, T. R. (2016). Plant Defensins for the Development of Fungal Pathogen Resistance in Transgenic Crops. In *Genetically Modified Organisms in Food*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802259-7.00034-8>
- Giacomelli, L., Nanni, V., Lenzi, L., Zhuang, J., Serra, M. D., Banfield, M. J., Town, C. D., Silverstein, K. A. T., Baraldi, E., & Moser, C. (2012). Identification and characterization of the defensin-like gene family of grapevine. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(8), 1118–1131. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-11-0323>
- Gow, N. A. R., Latge, J., Munro, C. A., De Groot, P. W. J., Hellingwerf, K. J., Klis, F. M., Ram, A. F., Klis, F. M., Sosinska, G. J., De Groot, P. W. J., Brul, S., Lipke, P. N., Ovalle, R., Aguilar-Uscanga, B., François, J. M., Martinez-Lopez, R., Monteoliva, L., Diez-Orejas, R., Nombela, C., & Gil, C. (2003). Cell Wall Architecture in Yeast : New Structure and New Challenges MINIREVIEW Cell Wall Architecture in Yeast : New Structure and New Challenges †. *Yeast*, 9(3), 3341–3354. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>.Correspondence
- Graham, M. a., Silverstein, K. a. T., & VandenBosch, K. a. (2008). Defensin-like Genes: Genomic Perspectives on a Diverse Superfamily in Plants. *Crop Science*, 48(Supplement_1), S-3. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.04.0236tpg>
- Guindon, S., Gascuel, O., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., & Hordijk, W. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximim-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>



- Guzmán, F., Barberis, S., & Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: Chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, *10*(2), 279–314. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue2-fulltext-13>
- Guzmán Q., F. (2013). Síntesis de péptidos. In M. S. Pfeiffer & G. Padrón (Eds.), *Genómica Funcional. Fundamentos y aplicaciones*.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Hammami, R., Ben Hamida, J., Vergoten, G., & Fliss, I. (2009). PhytAMP: A database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Research*, *37*(SUPPL. 1), 963–968. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn655>
- Hayes, B. M. E., Bleackley, M. R., Wiltshire, J. L., Anderson, M. A., Traven, A., & Van Der Weerden, N. L. (2013). Identification and mechanism of action of the plant defensin nad1 as a new member of the antifungal drug arsenal against candida albicans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(8), 3667–3675. <https://doi.org/10.1128/AAC.00365-13>
- Heyda, J., Mason, P. E., & Jungwirth, P. (2010). Attractive interactions between side chains of histidine-histidine and histidine-arginine-based cationic dipeptides in water. *Journal of Physical Chemistry B*, *114*(26), 8744–8749. <https://doi.org/10.1021/jp101031v>
- Himly, M., Jahn-schmid, B., Dedic, A., Kelemen, P., Wopfner, N., Altmann, F., Ree, R. Van, Briza, P., Richter, K., & Ebner, C. (2002). Art v 1, the major allergen of mugwort pollen, is a modular glycoprotein with a defensin-like and a hydroxyproline-rich domain. *The FEBS Journal*, *1*.
- Hitchner, M. A., Santiago-Ortiz, L. E., Necelis, M. R., Shirley, D. J., Palmer, T. J., Tarnawsky, K. E., Vaden, T. D., & Caputo, G. A. (2019). Activity and characterization of a pH-sensitive antimicrobial peptide. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1861*(10), 182984. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.05.006>
- Hou, S., Liu, Z., Shen, H., & Wu, D. (2019). Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, *10*(May). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00646>
- Hu, L. Le, Niu, S., Huang, T., Wang, K., Shi, X. H., & Cai, Y. D. (2010). Prediction and analysis of protein hydroxyproline and hydroxylysine. *PLoS ONE*, *5*(12), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015917>
- Hwang, P. M., & Vogel, H. J. (1998). Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochemistry and Cell Biology*, *76*(2–3), 235–246. <https://doi.org/10.1139/o98-026>
- Iqbal, A., Khan, R. S., Shehryar, K., Imran, A., Ali, F., Attia, S., Shah, S., & Mii, M. (2019).



- Antimicrobial peptides as effective tools for enhanced disease resistance in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 139(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01668-6>
- Ishaq, N., Bilal, M., & Iqbal, H. M. N. (2019). *Medicinal Potentialities of Plant Defensins : A Review with Applied Perspectives*. 1–13. <https://doi.org/10.3390/medicines6010029>
- Isidro-Ilobet, A., Mercedes, A., & Albericio, F. (2009). *Amino Acid-Protecting Groups*. 2455–2504.
- Islam, K. T., Velivelli, S. L. S., Berg, R. H., Oakley, B., & Shah, D. M. (2017). A novel bi-domain plant defensin MtDef5 with potent broad-spectrum antifungal activity binds to multiple phospholipids and forms oligomers. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16508-w>
- Jampilek, J. (2016). Potential of agricultural fungicides for antifungal drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1110142>
- Ji, F., He, D., Olaniran, A. O., Mokoena, M. P., Xu, J., & Shi, J. (2019). *Occurrence , toxicity , production and detection of Fusarium mycotoxin : a review*. 2, 1–14.
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen, J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., ... Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, 27(1), 112–128. <https://doi.org/10.1002/pro.3280>
- Kaewklom, S., Euanorasetr, J., Intra, B., Panbangred, W., & Aunpad, R. (2016). Antimicrobial Activities of Novel Peptides Derived from Defensin Genes of Brassica hybrid cv Pule. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 22(1), 93–100. <https://doi.org/10.1007/s10989-015-9488-2>
- Kaewklom, S., Wongchai, M., Petvises, S., Hanpithakphong, W., & Aunpad, R. (2018). Structural and biological features of a novel plant defensin from Brugmansia x candida. *PLoS ONE*, 13(8), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201668>
- Kaur, A., Pati, P. K., Pati, A. M., & Nagpal, A. K. (2017). In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of Arabidopsis thaliana and Oryza sativa. *PLoS ONE*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184523>
- Kaur, J., Sagaram, U. S., & Shah, D. (2011). Can plant defensins be used to engineer durable commercially useful fungal resistance in crop plants? *Fungal Biology Reviews*, 25(3), 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2011.07.004>
- Keller, M. D., Bergstrom, G. C., & Shields, E. J. (2014). *The aerobiology of Fusarium graminearum*. 123–136. <https://doi.org/10.1007/s10453-013-9321-3>
- Killian, J. A., & Von Heijne, G. (2000). How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends*



- in Biochemical Sciences*, 25(9), 429–434. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01626-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01626-1)
- Kimmerlin, T., & Seebach, D. (2005). “100 years of peptide synthesis”: Ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies. *Journal of Peptide Research*, 65(2), 229–260. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2005.00214.x>
- Koo, J. C., Lee, B., Young, M. E., Koo, S. C., John, A., Baek, D., Lim, C. O., Lee, S. Y., Yun, D., & Je, M. (2009). *in Yeasts*. 45(11), 1669–1680. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch189.Pn-AMP1>
- Kumar, D., & Bhalla, T. C. (2005). Microbial proteases in peptide synthesis: Approaches and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), 726–736. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0094-7>
- Kvansakul, M., Lay, F. T., Adda, C. G., Veneer, P. K., Baxter, A. A., Phan, T. K., Poon, I. K. H., & Hulett, M. D. (2016). Binding of phosphatidic acid by NsD7 mediates the formation of helical defensin-lipid oligomeric assemblies and membrane permeabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(40), 11202–11207. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607855113>
- Lacerda, A. F., Vasconcelos, E. a R., Pelegrini, P. B., & Grossi de Sa, M. F. (2014). Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in Microbiology*, 5(April), 116. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00116>
- Lareo, L. (2006). Identificación De Promotores Eucariotas Tipo Ii. *Universitas Stuttgart*, 35–48.
- Laskowski, R. a., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283–291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>
- Laskowski, Roman a., Watson, J. D., & Thornton, J. M. (2005). ProFunc: A server for predicting protein function from 3D structure. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), 89–93. <https://doi.org/10.1093/nar/gki414>
- Latgé, J. P. (2007). The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, 66(2), 279–290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x>
- Lay, F. T., & Anderson, M. A. (2005a). Defensins – Components of the Innate Immune System in Plants. *Current Protein and Peptide Science*, 6(1), 85–101.
- Lay, F. T., & Anderson, M. a. (2005b). Defensins-components of the innate immune system in plants. *Current Protein & Peptide Science*, 6(1), 85–101.
- Leannec-Rialland, V., Atanasova, V., Chereau, S., Tonk-Rügen, M., Cabezas-Cruz, A., & Richard-Forget, F. (2022). Use of Defensins to Develop Eco-Friendly Alternatives to Synthetic Fungicides to Control Phytopathogenic Fungi and Their Mycotoxins. *Journal of Fungi*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/jof8030229>



- Leannec-Rialland, V., Cabezas-Cruz, A., Atanasova, V., Chereau, S., Ponts, N., Tonk, M., Vilcinskas, A., Ferrer, N., Valdés, J. J., & Richard-Forget, F. (2021). Tick defensin γ -core reduces *Fusarium graminearum* growth and abrogates mycotoxins production with high efficiency. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86904-w>
- Lee, J., Jung, S. W., & Cho, A. E. (2016). Molecular Insights into the Adsorption Mechanism of Human β -Defensin-3 on Bacterial Membranes. *Langmuir*, *32*(7), 1782–1790. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04113>
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing Professional.
- Letousey, P., Marion, D., de Zélicourt, A., Thoiron, S., Simier, P., Elmorjani, K., Delavault, P., Simoneau, P., & Campion, C. (2007). Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in Orobanche parasitic plants. *Planta*, *226*(3), 591–600. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0507-1>
- Liang, R., You, L., Dong, F., Zhao, X., & Zhao, J. (2020). Identification of Hydroxyproline-Containing Proteins and Hydroxylation of Proline Residues in Rice. *Frontiers in Plant Science*, *11*(August), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01207>
- Liesche, J., Marek, M., & Günther-Pomorski, T. (2015). Cell wall staining with Trypan blue enables quantitative analysis of morphological changes in yeast cells. *Frontiers in Microbiology*, *6*(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00107>
- Lundy, F. T., Nelson, J., Lockhart, D., Greer, B., Harriott, P., & Marley, J. J. (2008). Antimicrobial activity of truncated α -defensin (human neutrophil peptide (HNP)-1) analogues without disulphide bridges. *Molecular Immunology*, *45*(1), 190–193. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.04.018>
- Mäde, V., Els-Heindl, S., & Beck-Sickinger, A. G. (2014). Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, *10*(Scheme 1), 1197–1212. <https://doi.org/10.3762/bjoc.10.118>
- Magliano Alconada, T., & Chulze, S. N. (2013). Fusarium head blight in Latin America. In *Fusarium Head Blight in Latin America*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7091-1>
- Malbrán, I., Mourellos, C. A., Girotti, J. R., Alicino, M. B., Balatti, P. A., & Lori, G. A. (2012). Aggressiveness variation of *Fusarium graminearum* isolates from Argentina following point inoculation of field grown wheat spikes. *Crop Protection*, *42*, 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.05.025>
- Malbrán, I., Mourellos, C. A., Girotti, J. R., Balatti, P. A., & Lori, G. A. (2014). Toxigenic capacity and trichothecene production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentina and their relationship with aggressiveness and fungal expansion in the wheat spike. *Phytopathology*,



- 104(4), 357–364. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-13-0172-R>
- Malbrán, Ismael, Mourellos, C. A., Girotti, J. R., Balatti, P. A., & Lori, G. A. (2014). Toxigenic Capacity and Trichothecene Production by *Fusarium graminearum* Isolates from Argentina and Their Relationship with Aggressiveness and Fungal Expansion in the Wheat Spike. *Phytopathology*, 104(4), 357–364. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-13-0172-R>
- Matkawala, F., Nighojkar, A., & Kumar, A. (2019). *Antimicrobial Peptides in Plants : Classes , Databases , and Importance*. 3, 158–168.
- Merrifield, B. (1986). BcNC-HN-C-E-O-CH₂. *Science*, 232. <https://doi.org/10.1126/science.3961484>
- Mesquita, N., Portugal, A., Piñar, G., Loureiro, J., Coutinho, A. P., Trovão, J., Nunes, I., Botelho, M. L., & Freitas, H. (2013). Flow cytometry as a tool to assess the effects of gamma radiation on the viability, growth and metabolic activity of fungal spores. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 84, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.008>
- Min, K., Son, H., Lee, J., Choi, G. J., Kim, J. C., & Lee, Y. W. (2012). Peroxisome function is required for virulence and survival of *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(12), 1617–1627. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-12-0149-R>
- Moschini, R.C., Bischoff, S., Martínez, M. I. (2008). Caso de estudio: Fusariosis de la espiga de trigo. *Revista Horizonte A. Magazine de Las Ciencias Agrarias. Investigación. Variabilidad Climática y Ocurrencia de Enfermedades*, N° 21, 10–15.
- Mourellos, C. (2015). *Fusariosis de la espiga del trigo : dinámica del inóculo de Fusarium graminearum ante un manejo sustentable*.
- Muller, L., Jackson, S. N., & Woods, A. S. (2019). Histidine, the less interactive cousin of arginine. *European Journal of Mass Spectrometry*, 25(2), 212–218. <https://doi.org/10.1177/1469066718791793>
- Muñoz, A., Chu, M., Marris, P. I., Sagaram, U. S., Kaur, J., Shah, D. M., & Read, N. D. (2014). Specific domains of plant defensins differentially disrupt colony initiation, cell fusion and calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 92(6), 1357–1374. <https://doi.org/10.1111/mmi.12634>
- Navarro-Espíndola, R., Suaste-Olmos, F., & Peraza-Reyes, L. (2020). Dynamic regulation of peroxisomes and mitochondria during fungal development. *Journal of Fungi*, 6(4), 1–30. <https://doi.org/10.3390/jof6040302>
- Newman, M.-A., Sundelin, T., Nielsen, J. T., & Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4(May), 139. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00139>



- Niarchou, A., Alexandridou, A., Athanasiadis, E., & Spyrou, G. (2013). C-PAMP: Large scale analysis and database construction containing high scoring computationally predicted antimicrobial peptides for all the available plant species. *PLoS ONE*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079728>
- Nicholson, P., Chandler, E. A., Draeger, R. C., Gosman, N. E., Simpson, D. R., Thomsett, M., & Wilson, A. H. (2003). Molecular tools to study epidemiology and toxicology of fusarium head blight of cereals. *Eur. J. Plant Pathol.*, *109*, 691–703.
- Nilsson, B. L., Soellner, M. B., & Raines, R. T. (2005). Chemical Synthesis of Proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, *34*, 91–118. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.34.040204.144700.Chemical>
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., & Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, *198*, 249–266. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0119.x>
- Ochiai, A., Ogawa, K., Fukuda, M., Ohori, M., Kanaoka, T., Tanaka, T., Taniguchi, M., & Sagehashi, Y. (2018). Rice Defensin OsAFP1 is a New Drug Candidate against Human Pathogenic Fungi. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29715-w>
- Odintsova, T. I., Rogozhin, E. A., Baranov, Y., Kh, A., Yalpani, N., Egorov, T. A., & Grishin, E. V. (2008). Seed defensins of barnyard grass *Echinochloa crusgalli* (L .) Beauv . *Biochimie*, *90*(11–12), 1667–1673. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.06.007>
- Omotayo, O. P., Omotayo, A. O., Mwanza, M., & Babalola, O. O. (2019). Prevalence of mycotoxins and their consequences on human health. *Toxicological Research*, *35*(1), 1–7. <https://doi.org/10.5487/TR.2019.35.1.001>
- Osborn, R. W., Samblanx, G. W. De, Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Leuven, F. Van, Attenborough, S., & Rees, S. B. (1995). *Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae*, *368*, 257–262.
- Parisi, K., Shafee, T. M. A., Quimbar, P., van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. A. (2018). The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.004>
- Pereyra, S. A., Dill-Macky, R., & Sims, A. L. (2004). Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Disease*, *88*(7).
- Perfect, J. R. (2016). “Is there an emerging need for new antifungals?” *Expert Opinion on Emerging Drugs*, *21*(2), 129–131. <https://doi.org/10.1517/14728214.2016.1155554>
- Pirtskhalava, M., Vishnepolsky, B., Grigolava, M., & Managadze, G. (2021). Physicochemical features and peculiarities of interaction of amp with the membrane. *Pharmaceuticals*,



- 14(5). <https://doi.org/10.3390/ph14050471>
- Poon, I. K. H., Baxter, A. A., Lay, F. T., Mills, G. D., Adda, C. G., Payne, J. a E., Phan, T. K., Ryan, G. F., White, J. a., Veneer, P. K., van der Weerden, N. L., Anderson, M. a., Kvensakul, M., & Hulett, M. D. (2014). Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. *ELife*, 2014(3). <https://doi.org/10.7554/eLife.01808>
- Powers, J. P. S., Tan, A., Ramamoorthy, A., & Hancock, R. E. W. (2005). Solution structure and interaction of the antimicrobial polyphemusins with lipid membranes. *Biochemistry*, 44(47), 15504–15513. <https://doi.org/10.1021/bi051302m>
- Quarantin, A., Hadelér, B., Kröger, C., Schäfer, W., Favaron, F., Sella, L., & Martínez-Rocha, A. L. (2019). Different hydrophobins of fusarium graminearum are involved in hyphal growth, attachment, water-air interface penetration and plant infection. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00751>
- Ramamoorthy, V., Cahoon, E. B., Li, J., Thokala, M., Minto, R. E., & Shah, D. M. (2007). *Glucosylceramide synthase is essential for alfalfa defensin-mediated growth inhibition but not for pathogenicity of Fusarium graminearum*. 66(October), 771–786. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05955.x>
- Sagaram, U. S., El-Mounadi, K., Buchko, G. W., Berg, H. R., Kaur, J., Pandurangi, R. S., Smith, T. J., & Shah, D. M. (2013). Structural and functional studies of a phosphatidic acid-binding antifungal plant defensin MtDef4: Identification of an RGFRRR motif governing fungal cell entry. *PLoS ONE*, 8(12), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082485>
- Sagaram, U. S., Pandurangi, R., Kaur, J., Smith, T. J., & Shah, D. M. (2011). Structure-activity determinants in antifungal plant defensins MsDef1 and MtDef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*. *PloS One*, 6(4), e18550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018550>
- Sathoff, A. E., Velivelli, S., Shah, D. M., & Samac, D. A. (2019). Plant Defensin Peptides have Antifungal and Antibacterial Activity Against Human and Plant Pathogens. *Phytopathology*, 109(3), 402–408. <https://doi.org/10.1094/phyto-09-18-0331-r>
- Schaaper, W. M. M., Posthuma, G. A., Meloen, R. H., Plasman, H. H., Sijtsma, L., Van Amerongen, A., Fant, F., Borremans, F. A. M., Thevissen, K., & Broekaert, W. F. (2001). Synthetic peptides derived from the β 2- β 3 loop of *Raphanus sativus* antifungal protein 2 that mimic the active site. *Journal of Peptide Research*, 57(5), 409–418. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2001.00842.x>
- Schmitt, P., Rosa, R. D., & Destoumieux-Garzón, D. (2016). An intimate link between antimicrobial peptide sequence diversity and binding to essential components of bacterial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(5), 958–970.



- <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.011>
- Seelig, A. (1987). Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. *BBA - Biomembranes*, 899(2), 196–204. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(87\)90400-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(87)90400-7)
- Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Hulett, M. D., & Anderson, M. A. (2016). The defensins consist of two independent, convergent protein superfamilies. *Molecular Biology and Evolution*, 1–23. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw106>
- Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Phan, T. K., Anderson, M. A., & Hulett, M. D. (2017). Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(4), 663–682. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2344-5>
- Silverstein, K. A. T., Graham, M. A., Paape, T. D., & Vandenbosch, K. A. (2005). *Genome Organization of More Than 300 Defensin-Like Genes in Arabidopsis 1 [w]*. 138(June), 600–610. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060079.600>
- Silverstein, K. A. T., Moskal, W. A., Wu, H. C., Underwood, B. A., Graham, M. A., Town, C. D., & VandenBosch, K. A. (2007). Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 51(2), 262–280. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03136.x>
- Slavokhotova, A. a, Odintsova, T. I., Rogozhin, E. a, Musolyamov, A. K., Andreev, Y. a, Grishin, E. V, & Egorov, T. a. (2011). Isolation, molecular cloning and antimicrobial activity of novel defensins from common chickweed (*Stellaria media* L.) seeds. *Biochimie*, 93(3), 450–456. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.10.019>
- Struyfs, C., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2021). Membrane-Interacting Antifungal Peptides. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(April), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.649875>
- Su, T., Han, M., Cao, D., & Xu, M. (2020). Molecular and Biological Properties of Snakins : The Foremost Cysteine-Rich Plant Host. *Journal of Fungi*, 7–11.
- Tavares, L. S., Santos, M. D. O., Viccini, L. F., Moreira, J. S., Miller, R. N. G., & Franco, O. L. (2008). Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides*, 29(10), 1842–1851. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.06.003>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–177. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). *Péptidos antimicrobianos*. 14(1), 55–67.
- Thevissen, K, Osborn, R. W., Acland, D. P., & Broekaert, W. F. (2000). Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for



- antifungal activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 13(1), 54–61. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)80024-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)80024-2)
- Thevissen, Karin, Cammue, B. P. A., Lemaire, K., Winderickx, J., Dickson, R. C., Lester, R. L., Ferket, K. K. A., Even, F. Van, Parret, A. H. A., & Broekaert, W. F. (2000). *A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of Saccharomyces cerevisiae to an antifungal plant defensin from dahlia (Dahlia merckii)*. 97(17).
- Thevissen, Karin, François, I. E. J. a, Takemoto, J. Y., Ferket, K. K. a, Meert, E. M. K., & Cammue, B. P. a. (2003). DmAMP1, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 226(1), 169–173. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00590-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00590-1)
- Thevissen, Karin, Kristensen, H.-H., Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. a, & François, I. E. J. a. (2007). Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discovery Today*, 12(21–22), 966–971. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.016>
- Thevissen, Karin, Tavares, P. D. M., Xu, D., Blankenship, J., Idkowiak-baldys, J., Govaert, G., Bink, A., Rozental, S., Groot, P. W. J. De, Davis, T. R., Kumamoto, C. A., Vargas, G., Coenye, T., Mitchell, A., Roemer, T., Hannun, Y. A., & Cammue, P. A. (2013). *NIH Public Access*. 84(1), 166–180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08017.x>.The
- Thevissen, Karin, Warnecke, D. C., François, I. E. J. a, Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zähringer, U., Thomma, B. P. H. J., Ferket, K. K. a, & Cammue, B. P. a. (2004). Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 3900–3905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311165200>
- Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. a, & Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta*, 216(2), 193–202. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0902-6>
- Toledo, E. B., Lucas, D. R., Simão, T. L. B. V., Calixto, S. D., Lassounskaia, E., Muzitano, M. F., Damica, F. Z., Gomes, V. M., & de Oliveira Carvalho, A. (2021). Design of improved synthetic antifungal peptides with targeted variations in charge, hydrophobicity and chirality based on a correlation study between biological activity and primary structure of plant defensin γ -cores. *Amino Acids*, 53(2), 219–237. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02929-x>
- Trail, F. (2009). *For Blighted Waves of Grain : Fusarium graminearum in the Postgenomics Era*. 149(January), 103–110. <https://doi.org/10.1104/pp.108.129684>
- Van Der Lee, T., Zhang, H., Diepeningen, A. Van, & Waalwijk, C. (2015). Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes : a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(4), 453–460. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.984244>
- Van der Weerden, N. L., & Anderson, M. a. (2013). Plant defensins: Common fold, multiple functions. *Fungal Biology Reviews*, 26(4), 121–131.



- <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.08.004>
- Van Der Weerden, N. L., Hancock, R. E. W., & Anderson, M. A. (2010). Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(48), 37513–37520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.134882>
- Velivelli, S. L. S., Islam, K. T., Hobson, E., & Shah, D. M. (2018). Modes of action of a Bi-domain plant defensin MtDef5 against a bacterial pathogen *Xanthomonas campestris*. *Frontiers in Microbiology*, *9*(MAY), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00934>
- Vriens, K., Cammue, B. P. a, & Thevissen, K. (2014). Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *19*(8), 12280–12303. <https://doi.org/10.3390/molecules190812280>
- Weerden, N. L. Van Der, Lay, F. T., & Anderson, M. A. (2008). The Plant Defensin , NaD1 , Enters the Cytoplasm of *Fusarium Oxysporum* Hyphae *. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(21), 14445–14452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709867200>
- Wegulo, S. N., Baenziger, P. S., Hernandez Nopsa, J., Bockus, W. . W., & Hallen-Adams, H. (2015). Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. *Crop Prot.*, *73*, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.025>
- Wegulo, Stephen N., Baenziger, P. S., Hernandez Nopsa, J., Bockus, W. W., & Hallen-Adams, H. (2015). Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. *Crop Protection*, *73*, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.025>
- Whitmore, L., & Wallace, B. A. (2007). *Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Protein Secondary Structure Analyses from Circular D.* *89*(5). <https://doi.org/10.1002/bip.20853>
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, *35*(SUPPL.2), 407–410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>
- Wut, P. G. M. (2014). *Greene's protective groups in organic synthesis* (Fifth edit). Wiley.
- Yount, N. Y., & Yeaman, M. R. (2004). Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(19), 7363–7368. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401567101>
- Yuen, G. Y., & Schoneweis, S. D. (2007). Strategies for managing *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Int J Food Microbiol.*, *119*(1–2), 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.033>
- Zhang, J., Lu, H., Li, X., Li, Y., Cui, H., Wen, C.-K., Tang, X., Su, Z., & Zhou, J.-M. (2010). Effector-triggered and pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity differentially contribute to basal resistance to *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe*



Interactions : *MPMI*, 23(7), 940–948. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-7-0940>

