

EXPRESIÓN DEL GEN PROSISTEMINA DE TOMATE EN PAPA (*Solanum tuberosum*)

Araujo-Burgos T.¹ y Rao R.²

¹ Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Carrera de Ingeniería Agronómica, Universidad Autónoma del Beni, Trinidad, Beni. Correo de contacto: agrotania@gmail.com

² Departamento de Ciencias del Suelo, de la Planta, del Ambiente y de la Producción Animal, Universidad de los Estudios de Nápoles Federico II, Nápoles, Italia

RESUMEN

La sistemina es una molécula de señal presente en el tomate y deriva de la región terminal C del precursor prosistemina. Involucrada en la respuesta local y sistémica de la planta a la masticación, regula la activación de diversos genes de defensa en respuesta al ataque de herbívoros en plantas de tomate. Homólogos de ésta molécula se han encontrado en otras Solanáceas como la papa, pero con menor actividad que la del tomate. Para conocer el rol biotecnológico de la prosistemina de tomate en la mejora de la resistencia endógena de la planta a situaciones de estrés biótico, el ADN complementario (ADNc) de prosistemina de tomate se expresó en papa, al igual que una prosistemina incompleta sin el exón que codifica para la sistemina (Sys) para definir la posible función de la región terminal N del precursor en la activación de la respuesta de defensa. La transformación genética de papa se realizó mediante *Agrobacterium* y luego de la caracterización molecular de los transgénicos, se analizó un grupo de genes involucrados en la respuesta de la planta a estrés biótico mediante PCR en tiempo real. El análisis de expresión génica mostró que la modificación de la expresión de algunos genes en papa no se debe solo a la secuencia Sys, sino también a la terminal N de la prosistemina que jugaría un rol en la activación de algunos genes de defensa.

Palabras clave: sistemina, genes de defensa, papa transgénica, expresión génica

ABSTRACT

Systemin, a peptide isolated from tomato, derives from the C-terminal region of the prosystemin precursor. It is a signaling molecule involved in local and systemic wound response. It regulates the activation of several defensive genes in tomato plants in response to herbivore attacks. Prosystemin homologues have been found in other Solanaceae species such as potato, but they were less active than the tomato one. The aim of this project was to increase the understanding of the possible biotechnological role of the tomato prosystemin, with a particular emphasis to the exploitation of this precursor to increase the endogenous resistance against biotic stress. To this goal, the tomato prosystemin ADNc was expressed in potato. Moreover, a mutated prosystemin ADNc lacking the systemin encoding exon (Sys) was also expressed to understand the possible function of the N-terminal region of the precursor in the activation of the defense response. Transgenic plants were obtained after an *Agrobacterium* mediated plant transformation. Potato transformants were characterized and a group of genes involved in plant response against biotic stress was analyzed by real time PCR. The gene expression analysis suggested that modification in gene expression in potato is not only due to the Sys sequence and that the N-terminal is also involved.

Key words: systemin, defense genes, transgenic potato, gene expression

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos de defensa de la planta pueden ser de tipo constitutivo, es decir, que están siempre presentes en la planta, pero como esto incluye un costo metabólico no se puede mantener continuamente en el tiempo, así la planta ha desarrollado respuestas de defensa inducidas por la actividad alimentaria de los insectos como la síntesis de nuevos compuestos que obstaculizan los procesos digestivos y de absorción de nutrientes (Felton, 2005). Esta variedad de compuestos como inhibidores de proteasas, lipoxigenasas, compuestos orgánicos volátiles (VOC), terpenos, taninos, etc. comprometen el crecimiento del insecto fitófago (Ryan, 2000; Chen *et al.*, 2005). Al respecto un papel central lo ocupa la vía metabólica de los octadecanoides, bien caracterizada en Solanáceas, la cual se induce mediante ataque de insectos fitófagos y termina produciendo especialmente ácido jasmónico y sus derivados (Walling, 2000). En el tomate una molécula señal de ésta vía es la sistemina, proteína de 18 aminoácidos que es liberada del precursor prosistemina (Pearce *et al.*, 1991). El gen prosistemina contiene 11 exones, de los cuales el último codifica para sistemina y está ubicado en la región terminal C del precursor (McGurl *et al.*, 1992). La molécula está involucrada en la respuesta local y sistémica de la planta a la masticación, además regula la activación más de 20 genes de defensa en respuesta al ataque de herbívoros en tomate (Ryan y Pearce, 2003). Igualmente, otros péptidos fueron aislados dentro de la familia Solanácea (Pearce y Ryan, 2003; Pearce *et al.*, 2007; Pearce *et al.*, 2009) con función similar a la prosistemina, glicopéptidos o sisteminas ricos en hidroxiprolina que inducen genes de defensa después del ataque de herbívoros (Narváez-Vásquez *et al.*, 2007).

El presente trabajo se basa en el estudio de la expresión del gen prosistemina de

tomate en papa y del mismo gen al cual se le ha borrado la porción que codifica para la sistemina. Los genotipos transgénicos de papa PR presentan la inserción del ADNc de prosistemina de tomate y los genotipos transgénicos PRx contienen el mismo gen incompleto. El objetivo de la investigación es ampliar el conocimiento sobre el rol biotecnológico de la prosistemina, sobretodo, la función de este precursor para incrementar la resistencia endógena de la planta frente al estrés biótico en una especie diferente al tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Transformación genética de *Agrobacterium*. Los vectores binarios PR (ADNc de prosistemina) y PRx (prosistemina incompleta) se encontraban disponibles en células de *Escherichia coli* cepa DH5 α . La bacteria se inoculó en medio LB (Sambrook y Russell, 2001) con la adición de 15 g/l de agar bacteriológico y 50 μ g/ml tetraciclina, las placas se incubaron por 16 horas a 37°C. Una sola colonia de bacteria transformada se inoculó en tubos de 100 ml con caldo LB y 50 μ g/ml tetraciclina, luego se incubaron durante 16 horas a 37°C y 200 rpm de rotación. El ADN del plasmidio se aisló con el kit NucleoBond Midi Plasmid DNA purification (Macherey-Nagel). La integridad y la cantidad del ADN se controlaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, en solución tampón TAE al 1%. El ADN de plasmidio conservado a -20°C se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404.

Las células competentes se obtuvieron por método químico. La bacteria se inoculó en caldo LB e incubó por 20 horas a 28°C y 200 rpm, luego 2 ml de ésta suspensión se adicionó a 50 ml de caldo YEP (10 g peptona, 10 g extracto de levadura, 5 g NaCl para 1 litro). El cultivo se colocó en cámara de crecimiento a 28°C y 200 rpm por ~8 horas hasta que la suspensión alcanzó

una $OD_{600} \sim 1.0$. Luego se centrifugaron las células a 3000 rpm, a 4°C durante 5 min y se resuspendieron en 1 ml $CaCl_2$ 20 mM. Las células competentes obtenidas se dividieron en alícuotas de 1 ml y se conservaron a -80°C. Para la transformación, 1 µg de ADN plasmídico se añadió a cada uno de los tubos, las células se congelaron en nitrógeno líquido e inmediatamente se incubaron en baño María a 37°C por 5 min. Luego se añadió caldo LB a cada tubo y se incubaron a 28°C y 200 rpm por 2 horas. Las células se colectaron por centrifugación a 3000 rpm y el pellet se resuspendió en 0.2 ml de caldo LB. Las posibles células transformadas se inocularon en LB agar con los antibióticos selectivos (tetraciclina 5 µg/ml y rifampicina 50 µg/ml) e incubaron a 28°C por 3 días.

Control de células de *Agrobacterium* transgénico. Una colonia solitaria de las células cultivadas en LB agar con antibióticos se inoculó en 10 ml de caldo LB con los mismos antibióticos selectivos. Los tubos se incubaron a 28°C y 200 rpm por 24 horas. De cada tubo, 2 ml se conservaron en glicerol (300 µl de suspensión y 600 µl de glicerol al 50%) y congelaron a -80°C. Para controlar el transgen, se extrajo ADN plasmídico mediante protocolo mini-prep, se centrifugaron 8 ml de la suspensión a 4300 rpm por 10 min, el pellet de células se resuspendió en 533 µl de Solución I (glucosa 50 mM, TrisCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0). Los tubos se enfriaron por 10 min y se añadieron 1100 µl de Solución II (NaOH 0.2M y SDS 1%), después de mezclar y enfriar por 5 min, se añadieron 800 µl de Solución III (60 ml acetato de potasio 5M, 11.5 ml ácido acético glacial y 28.5 ml agua bi-destilada), se enfrió y centrifugó. Todos los pasos de centrifugación se realizaron a 4°C, con 13200 rpm durante 5 min. Al sobrenadante se añadieron 500 µl de fenol-cloroformo (1:1), se centrifugó y al nuevo sobrenadante se le añadieron 10 µl ARNsa (10 mg/ml) lo cual se incubó a 37°C por 30 min. Luego se mezcló con 500 µl de

fenol-cloroformo y al sobrenadante obtenido por centrifugación, se le añadieron 500 µl de cloroformo para centrifugar nuevamente. Al nuevo sobrenadante se le añadió 1 ml de etanol al 100% y luego se enfrió por 5 min. Después de centrifugar, el pellet de ADN colectado se lavó con etanol al 70%, se lo recuperó por centrifugación para finalmente resuspenderlo en 50 µl de agua bidestilada. La calidad y cantidad del ADN plasmídico se controló mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, en tampón TAE al 1%. La solución de ADN se almacenó a -20°C para ser analizado por PCR. Luego se realizó el test de ketolactosa, basado en la diferencia metabólica entre el género *Agrobacterium* y *Escherichia*, para controlar la pureza de las colonias transformadas. Transformantes de *A. tumefaciens* y *E. coli* (control negativo) se inocularon en agar lactosa (lactosa 1%, extracto de levadura 0.1% y bacto agar 2%) y se incubaron a 30°C por 3 días. Todas las colonias se cubrieron con solución de Benedict (132 g citrato de sodio, 256 g carbonato anhidro de sodio y 13.5 g de sulfato cúprico para 1 litro) e incubaron a temperatura ambiente por 30 min.

Transformación genética de papa. *Solanum tuberosum*, variedad Desirée creció *in vitro* en caldo MS20 (4.3 g mezcla de sales MS con vitaminas y 20 g sacarosa para 1 litro, pH 5.8) a 21°C, fotoperiodo de 16 horas, 100 rpm, durante 4 semanas. Las cepas de *Agrobacterium* conservadas a -80°C se inocularon en LB agar con los mismos antibióticos selectivos, e incubaron a 28°C por 2 días. Una simple colonia se inoculó en caldo LB con antibióticos, las células crecieron a 28°C con ~200 rpm de rotación por 24 horas hasta que la concentración del cultivo alcanzó una OD_{600} entre 0.8 y 1.0. La virulencia de la bacteria se indujo usando el medio simplificado de inducción, SIM (citrato de sodio 20 mM, acetosiringona 0.3 mM y sacarosa 2%). El cultivo se centrifugó a 3000 rpm, el pellet se resuspendió en SIM e

incubó a 28°C por 16 horas con movimiento rotacional; después se centrifugó a 3000 rpm y el pellet se resuspendió en 20 ml de caldo LB con los antibióticos selectivos para realizar el co-cultivo.

Las plantas de papa se transformaron como describen Narváez-Vásquez y Ryan (2002) con algunas modificaciones. Se cortaron entrenudos de 0.5 cm provenientes del tallo. Se colocaron los entrenudos sobre papel filtro que cubría el medio MS30 agar (4.3 g mezcla de sales MS con vitaminas, 30 g sacarosa, 8 g micro agar para 1 litro, pH 5.8) e incubaron a 22°C, fotoperiodo de 16 horas y en semioscuridad por 24 horas. A continuación, los entrenudos se sumergieron en la suspensión de células de *Agrobacterium* por 10 min y se colocaron en contacto directo con el medio MS30 a 22°C, 16 horas de fotoperiodo por 3 días en semioscuridad. Después se transfirieron a medio fresco P55 (4.3 g mezcla de sales MS con vitaminas, 30 g sacarosa, 8 g micro agar, 3 mg/l zeatina riboside, 3 mg/l ácido giberélico y 0,1 mg/l ácido indolacético para 1 litro, pH 5.8), con la adición de 200 mg/l cefotaxime para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium* y 100 mg/l kanamicina para seleccionar transformantes. Las placas se mantuvieron a semisombra, 22°C y fotoperiodo de 16 horas. Apenas aparecieron los primeros brotes, se eliminó la semisombra y cuando éstos alcanzaron ~2 cm de largo se extrajeron para colocarlos en MS30 agar con 100 mg/l kanamicina hasta la emisión de raíces. Posibles transformantes que desarrollaron raíces en el medio selectivo, se propagaron *in vitro* y crecieron en MS30 agar con 50 mg/l kanamicina, a 22°C y 16 horas de fotoperiodo. Luego las vitroplantas se transfirieron a suelo estéril y crecieron bajo las mismas condiciones hasta la producción de tubérculos.

Material vegetal. Plantas transformadas y no transformadas de papa (*Solanum tuberosum*) variedad Desirée, crecieron a partir de tubérculos en invernadero de 23°C

a 25°C y 16 horas de fotoperiodo. Plantas de 4 a 6 semanas de edad se utilizaron en todos los experimentos. Las líneas transgénicas debidamente caracterizadas, se seleccionaron a partir de la homogeneidad de los tubérculos.

Extracción y análisis de ADN genómico.

Se colectó material vegetal en nitrógeno líquido y se molieron 100 mg de hojas, el ADN genómico se aisló usando el kit Gen Elute Plant Genomic DNA miniprep (Sigma-Aldrich), luego se cuantificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, comparando con un ADN Lambda (Promega) de cantidad conocida. Para la amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), 50 µl de solución madre se prepararon con 25-100 ng ADN, primers 0.4 µM, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 100 µM y 1 U Taq ADN Polimerasa (Promega) en tampón PCR 1X (Promega). Los primers específicos reportados en la tabla 1 se usaron para la amplificación del gen prosistemia en los transformantes. La reacción de PCR se llevó a cabo en una Mastercycler Gradient (Eppendorf) con el ciclo termal correspondiente (tabla 1). Todos los productos de la amplificación mediante PCR y RT-PCR se observaron en gel de agarosa al 2% matizado con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. Para la secuenciación de ADN, los productos de la amplificación (50 µl) se cargaron en gel de agarosa al 0.8% con el marcador 1Kb plus ADN Ladder (Invitrogen) para ver el tamaño del amplicón. Las bandas objetivo se cortaron hasta obtener 0,4 g de gel, después el ADN se aisló del gel con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) para obtener 50 µl de solución de ADN y después de cuantificarlo, el ADN y los primers fueron enviados a la concentración y cantidad requerida por el servicio de secuenciación de ADN PRIMM (Nápoles). La secuenciación se hizo en el ADN Analyzer (ABI) Sequencer 3730 y las secuencias se analizaron con ayuda del software Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>).

Tabla 1. Primers para la amplificación de los genes EF1- α y prosistemina.

PRIMERS	SECUENCIA (5' – 3')	GEN (ESPECIE)	NUM. ACC. (REFERENCIA)	CICLO TERMAL	L.A. (bp)
Prosyst fw Prosyst rv	GGGAGGGTGCCTAGAAATAA TTGCATTTTGGGAGGATCAG	TomProsyst <i>S. lycopersicum</i>	M84801 (McGurl <i>et al.</i> , 1992)	94°C 30" 51°C 30" 72°C 2'30"	110
EF1 St fw EF1 St rv	AAGCTGCTGAGATGAACAAG CAGTGTC AACACGACCAAC	EF 1- α <i>S. tuberosum</i>	AB061263 (Nakane <i>et al.</i> , 2003)	94°C 45" 53°C 45" 72°C 45"	639
SYSdel fw SYSdel rv	GAAGGAGATGATGATGCACAA CACCTCCCCTTCCATCT	TomProsyst <i>S. lycopersicum</i>	M84801 (McGurl <i>et al.</i> 1992)	94°C 45" 60°C 45" 72°C 30"	208

NUM. ACC. = número de accesoión; L.A.= largo del amplicón

Extracción y análisis de ARN total. El ARN total se aisló de las hojas usando un método estándar de extracción en base a fenol/cloroformo. Las hojas colectadas se congelaron en nitrógeno líquido, 0.5 g de hojas se molieron y colocaron en tubos con 750 μ l de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8.5, NaCl 100 mM, EDTA 20 mM, SDS 1%) y 750 μ l de fenol-cloroformo (1:1). Todos los pasos de centrifugación se realizaron a 14000 rpm por 10 min a 4°C. Después de mezclar y centrifugar, la fase líquida se colectó y se repitió la extracción fenol/cloroformo. El sobrenadante se transfirió a un tubo con 750 μ l de cloroformo y se centrifugó; al nuevo sobrenadante se le añadieron 750 μ l de isopropanol para que precipite el ARN. El pellet colectado por centrifugación se resuspendió en 200 μ l de agua bidestilada para lavarlo, se precipitó mediante la adición de 1 volumen de LiCl 4M y enfrió por al menos 4 horas. Se centrifugó nuevamente por 15 min, el pellet de ARN se resuspendió en 400 μ l de agua y se añadieron 40 μ l de NaAc 3M pH 7.0 y 1 ml de etanol 96%. La solución se congeló y finalmente el pellet se recuperó por centrifugación. El ARN total se resuspendió por última vez en 42 μ l de agua y cuantificó en espectrofotómetro, 2 μ l de ARN total se diluyeron 1:100 y su concentración se midió a 260 nm; la pureza de ARN se verificó según la relación A_{260}/A_{280} .

La calidad de ARN se observó mediante electroforesis en gel de agarosa 1.2% en

tampón desnaturizante (400 μ l formamida, 120 μ l formaldehído, 80 μ l TAE 1%, 1.2 μ l bromuro de etidio y 20 μ l Loading Dye 6X); 4 μ g de ARN en solución tampón se desnaturizó a 65°C por 2 min antes de la electroforesis. Comprobada la óptima calidad del ARN, se adicionó ADNasa para eliminar cualquier contaminación de ADN, 10 μ g de ARN total se trataron con 1U ADNasa/3 μ g ARN, (RNase-free DNase I, BioLabs), según las instrucciones del producto. El ARN se precipitó con la adición de 1/10 volúmenes NaAc 3M pH 7.0, 2 volúmenes de etanol 100%, y luego de enfriarlo, se centrifugó a frío por 15 min a 14000 rpm. El pellet se lavó con 1 volumen de etanol 70% y luego de enfriarse, se centrifugó a 14000 rpm por 10 min. El pellet resuspendido en 20 μ l de agua, se lo usó para la transcripción inversa de ARNm con el kit RevertAid First Strand cDNA synthesis (Fermentas), siguiendo las instrucciones. El primer filamento de ADNc se sintetizó partiendo de 2 μ g de ARN total. La calidad de la síntesis de ADNc se verificó usando los primers Elongation Factor-1 alpha (EF-1 α) para *S. tuberosum*, diseñados para anillarse entre dos exones consecutivos y así detectar cualquier contaminación de ADN. Los primers específicos reportados en la tabla 1 se usaron para el control de la síntesis de ADNc y para amplificar el gen prosistemina en orden de verificar la transcripción de los transgenes. La reacción de PCR se preparó en 25 μ l con 1 μ l ADNc patrón, primers 0.4 μ M, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 100 μ M y 0.5 U

Taq DNA Polymerase (Promega) en tampón para PCR 1X (Promega). El ciclo térmico fue el que se indica en la tabla 1, realizado en una Mastercycler Gradient (Eppendorf), con 30 ciclos de amplificación. Los productos de amplificación se controlaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Extracción y análisis de proteínas totales.

0.5 g de hojas de papa congeladas en nitrógeno líquido se molieron hasta obtener un polvo fino. Un litro de solución de tampón salino fosfato (PBS) 10X se preparó con 87 g NaCl, 22.5 g Na_2HPO_4 y 2 g KH_2PO_4 , pH 7.4 (Sambrook y Russell, 2001). Las proteínas se extrajeron en 300 μl de tampón PBS diluido 1:10, y conteniendo NaCl 0.5 M, EDTA 10 mM, PMSF 1 mM. La suspensión se mezcló vigorosamente en vortex y las muestras se centrifugaron a 13000 rpm, a 4°C por 20 min. El sobrenadante compuesto por proteínas solubles totales se cuantificó mediante espectrofotometría con el método Bradford y albumina de suero bovino (BSA) como proteína estándar (Bradford, 1976).

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) las proteínas solubles totales se colocaron en geles de apilamiento al 5%, preparados con 670 μl de acrilamida 30%, 500 μl de Tris 1.0 M pH 6.8, 40 μl de SDS 10%, 40 μl de persulfato de amonio 10% y 4 μl de TEMED en 4 ml. Los geles de resolución al 12% se prepararon con 8 ml de acrilamida 30%, 5 ml de Tris 1.5 M pH 8.8, 0.2 de SDS 10%, 0.2 de persulfato de amonio 10%, 8 μl de TEMED y agua hasta 20 ml. Un volumen de 15 μl conteniendo 40 μg de proteínas solubles totales se mezcló con igual volumen de tampón de muestra 2X (0.8 ml de tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 2 ml glicerol, 0.2 ml de bromofenol azul 0.01% y volumen final de 10 ml). Estas muestras se desnaturalizaron a 100°C por 5 min antes de ponerlas al gel. Se usó la solución tampón de carrera Tris-Glicina-SDS 5X (94 g Glicina, 15.1 g Tris, 50 ml SDS 10% para 1 litro, pH 8.8) diluida

1X. La carrera electroforética se realizó en la Mini Protean Tetra Cell (BioRad) a 100 voltios por ~1 hora. Con el Precision Plus Protein standard (BioRad) se determinaron los pesos moleculares. Así, se obtuvieron dos geles idénticos para el análisis Western, uno se tiñó con azul brillante de Coomassie para visualizar proteínas, el otro gel se usó en la transferencia electroforética con membranas de nitrocelulosa (BioRad) para el Western blot.

La transferencia de las proteínas se llevó a cabo en el Trans-Blot Tranfer Medium (BioRad) con el tampón de transferencia 1X (Trizma 50 mM, Glicina 380 mM y metanol 10%) a 100 voltios por 1 hora. En seguida, se bloquearon los sitios no específicos sumergiendo la membrana de nitrocelulosa en una solución tampón A (PBS 1X con leche en polvo descremada 5% y Tween20 0.5%) por 1 hora. Todos los pasos de incubación y lavado se hicieron con movimiento de rotación suave, a temperatura ambiente. Luego, las membranas se incubaron por 3 horas con el anticuerpo primario anti-prosistemina (Delano *et al.*, 1999) diluido 1:1000 en solución tampón A y se lavaron en PBS 1X con Tween20 0.5%. Después se incubó por 1 hora con el anticuerpo secundario, peroxidasa etiquetada con anti-IgG de conejo (Amersham), diluido 1:10000 en solución tampón A, se lavaron de igual modo adicionando un último lavado con PBS 1X por 10 min. Las proteínas de prosistemina se observaron con el kit ECL Western Blotting Detection System (Amersham) a 30 min de exposición, siguiendo las instrucciones del kit.

Análisis de expresión génica. Se llevó a cabo mediante RT-PCR en tiempo real, en el Fast Real-Time PCR System 7900 (Applied Biosystem) con 12,5 μl de Power Sybr Green PCR Master Kit 2X (Applied Biosystem), 0,3 μl del primer filamento de ADNc, 0,35 μM de primers específicos y agua hasta un volumen de 25 μl .

El ciclo termal comenzó con 50°C por 2 min, 95°C por 4 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 1 min a la temperatura de anillamiento de los primers (tabla 1). Se analizaron 3 réplicas biológicas por cada genotipo y 3 repeticiones para cada evento de amplificación. Para el control de los productos de amplificación se incluyó un paso de disociación con 15 seg a 95°C, 15 seg a 58°C y una desnaturalización lenta a 95°C por 15 seg, para comparar las curvas obtenidas con la Tm de cada par de primers mostrados en la tabla 2. Los productos también se observaron en gel de agarosa al 2%, cuyo tamaño de amplicón debe ser igual a los indicados en la tabla 2. Los datos emitidos fueron analizados mediante el software 7900HT Sequence Detection Systems, versión 2.3 (Applied Biosystem), usando el método comparativo de Ct con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), donde:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen objetivo}} - Ct_{\text{control endógeno}} \qquad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$$

El gen Elongation Factor 1-alpha (Nicot *et al.*, 2005) fue el gen endógeno de referencia usado para normalizar los niveles de expresión de los genes objetivo en papa. Los primers de los genes específicos reportados en la tabla 2 se usaron para el análisis de la expresión génica de las plantas transgénicas. Estos se diseñaron con el software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) y el fragmento amplificado se eligió entre 90 y 135 pares de bases (bp).

Tabla 2. Primers de genes específicos usados para el análisis de la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real.

PRIMERS	SECUENCIA (5' – 3')	GEN	NUM. ACC. (REFERENCIA)	Ta °C	L.A. (bp)
PotCaM fw PotCaM rv	TCATGACAAACCTAGGCGAAAA CGTCGTAGTTGATCTGCCCAT	Calmodulina	U20295 (Takezawa <i>et al.</i> , 1995)	58	96
PotEF fw PotEF rv	TTGGAAACGGATATGCTCCAG CCTTACCTGAACGCCTGTCAA	Elongation Factor 1- alpha	AB061263 (Nakane <i>et al.</i> , 2003)	58	98
PotGluB2 fw PotGluB2 rv	TGCATTTGGTGCCACACAA AGGTCCAGGCTTTCTCGGA	Endo-1,3-beta-D-glucanasa	U01901 (Beerhues y Kombrink, 1994)	58	91
PotHPL fw PotHPL rv	CGGCGTAAATCCAGAAAACCTT ACTTGGCACTGGTGGAGTAAGC	Hidroperoxido liasa	AJ310520 (Vancanneyt <i>et al.</i> , 2001)	58	102
PotLox3 fw PotLox3 rv	GTCGAAGATTCATGCCTGAGC TGTCTGCAGTTGAGGAGTGATTGT	Lipoxigenasa 3	U60202 (Kolomiets <i>et al.</i> , 1996)	58	101
PotPR-1b fw PotPR-1b rv	CTGGCGCAACTCAGTTCTGA GTCCGACCCAGTTTCCAACA	Pathogenesis-related protein 1b	AY050221 (Hoegen <i>et al.</i> , 2002)	58	101
PotProHypSys fw PotProHypSys rv	GCCAGAGCCACAAGATGAGC GGGCTGAGGTCCAATTCAAC	Glicopeptidos ricos en hidroxiprolina	EU482409 (Bhattacharya <i>et al.</i> , 2008)	58	101
PotProsyls fw PotProsyls rv	AGGTGGTATGTGAGGAAAGAG TTATTAGATTTGGATATTCTAGAG	Prosistemia de papa 1 y 2	AF000373/4 (Constabel <i>et al.</i> , 1998)	53	135

NUM. ACC. = número de accesoión; Ta= temperatura de anillamiento; L.A.= largo del amplicón

Análisis estadístico. Los datos recolectados se analizaron mediante one-way ANOVA, seguido por Tukey HSD post-hoc-test para comparaciones múltiples. Todos los análisis se hicieron con ayuda del software SPSS, versión 16.0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación vegetal y caracterización molecular de los transgénicos. Los vectores binarios pPR con el casete de expresión que contenía el ADNc de prosistemina de tomate bajo el control del promotor CaMV35S, y el vector binario similar pPRx con el ADNc de prosistemina sin el exón que codifica para la sistemina, se insertaron en la bacteria *A. tumefaciens*, cepa LBA4404. Las posibles colonias transformadas que crecieron en medio selectivo se controlaron mediante PCR (no mostrado) y mediante el test de ketolactosa o de Benedict (fig. 1) donde se observó un anillo amarillo de Cu_2O en colonias puras de *Agrobacterium* debido a la producción de 3-ketolactosa.

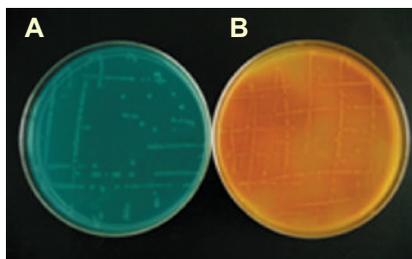


Fig. 1. Test de ketolactosa. **A:** células de *E. coli* con el vector binario pPRx como control negativo. **B:** células de *A. tumefaciens* con el vector binario pPRx mostrando un color amarillo intenso.

Luego, las bacterias con ambos vectores binarios se usaron para la transformación de *Solanum tuberosum*, variedad Desirée. Un ejemplo de entrenudos 7 semanas después del co-cultivo se muestra en la fig. 2. Luego de la formación de los callos, los brotes diferenciados se cortaron y transfirieron al medio selectivo hasta el enraizamiento. Los transformantes se nombraron como los constructos, PR y PRx.

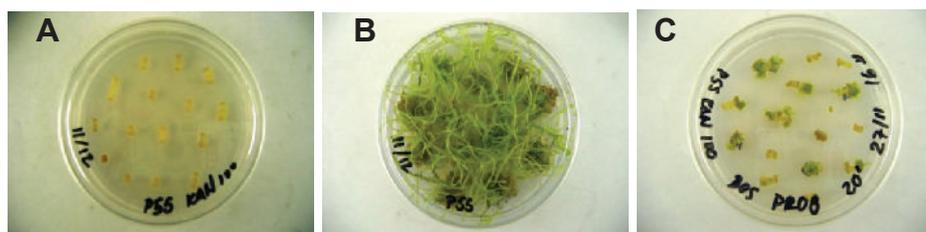


Fig. 2. Transformación genética de la papa. Entrenudos de papa 7 semanas después del co-cultivo. **A:** control negativo, entrenudos sin inoculación en medio selectivo. **B:** control positivo, entrenudos sin inoculación en medio no selectivo. **C:** entrenudos con inoculación de *A. tumefaciens* LBA4404 portando el vector binario pPRx, en medio selectivo (100 mg/l kanamicina)

Posibles transformantes que fueron capaces de desarrollar raíces en medio selectivo se analizaron mediante PCR para detectar la presencia del transgen de prosistemina de tomate. Los primers usados fueron Prosys para distinguir el ADNc completo de prosistemina y Sysdel para amplificar la prosistemina incompleta. La electroforesis en gel de agarosa de la PCR de los transformantes se muestra en las figuras 3 y 4.

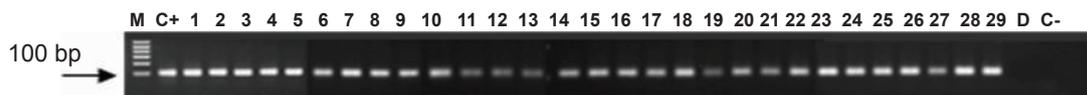


Fig. 3. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR de plantas transgénicas de papa con los primers Prosys para el control del ADNc de prosistemina. **M:** marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), **C+:** tabaco transgénico PR como control positivo, **1-29:** líneas de papa PR (ADNc de prosistemina), **D:** planta de papa no transformada, **C-:** agua como control negativo de la PCR

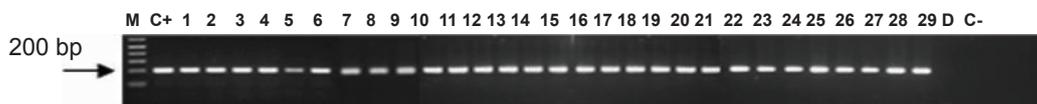


Fig. 4. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR de plantas transgénicas de papa con los primers Sysdel para el control de prosistemina incompleta. **M:** marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), **C+:** tabaco transgénico PRx como control positivo, **1-29:** líneas de papa PRx (prosistemina incompleta), **D:** planta de papa no transformada, **C-:** agua como control negativo de la PCR

Un total de 29 líneas PR y 29 líneas PRx fueron positivas en el análisis PCR, todos los transformantes positivos se transfirieron *in vivo* en invernadero. A las 4 semanas, el ARN total se extrajo y la síntesis de ADNc se controló usando los primers Elongation Factor-1 alpha, diseñados para anillar en dos exones consecutivos y detectar una posible contaminación de ADN genómico. La transcripción de ambos transgenes fue controlada usando los primers Prosys y Sysdel mediante RT-PCR. La electroforesis del gel de agarosa de la RT-PCR de los transformantes se muestra en la fig. 5 y 6.

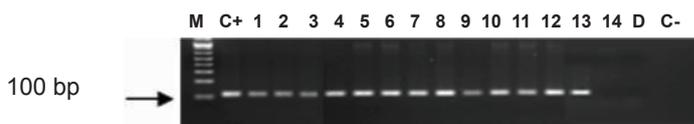


Fig. 5. Electroforesis de gel de agarosa de la RT-PCR de plantas transgénicas de papa con los primers Prosys para controlar la presencia del ADNc de prosistemina. **M:** marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), **C+:** línea de papa PR como control positivo, **1-13:** líneas PR (ADNc de prosistemina), **14:** falso transgénico, **D:** planta no transformada como control, **C-:** agua como control negativo de la PCR

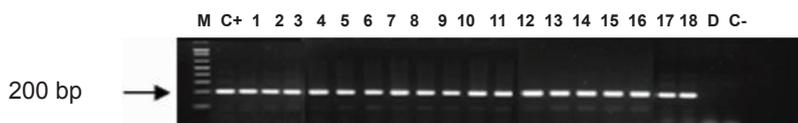


Fig. 6. Electroforesis de gel de agarosa de la RT-PCR de plantas transgénicas de papa con los primers Sysdel para controlar la presencia de prosistemina incompleta. **M:** marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), **C+:** línea de papa PRx como control positivo, **1-18:** líneas PRx (prosistemina incompleta), **D:** planta no transformada como control, **C-:** agua como control negativo de la PCR

En 13 líneas PR, el transgen prosistemina se transcribía y 18 líneas PRx fueron positivas al mismo análisis. De todos los transformantes RT-PCR positivos se obtuvieron tubérculos para análisis posteriores. Los datos de la transformación genética de papa incluyendo el análisis molecular se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Resumen de la transformación y análisis molecular de papa transgénica PR y PRx. Los porcentajes se refieren al número total de entrenudos usados para la transformación genética.

Ítem	Genotipo			
	PR		PRx	
	N°	%	N°	%
Entrenudos	216	100	198	100
Callos	158	73	170	85
Brotos	91	42	64	32
Brotos con raíces	48	22	40	20
PCR positivos	29	13	29	14
RT-PCR positivos	13/14	-	18/18	-

Para controlar si la proteína prosistemina de tomate era producida por las plantas transgénicas, se realizó un análisis Western blot usando el anticuerpo apropiado, la anti-prosistemina (Delano *et al.*, 1999) que se liga a la prosistemina completa. Un ejemplo del Western blot con algunas líneas transgénicas se muestra en la fig. 7.

Una banda de proteína con un peso molecular aparente de 37 kDa se detectó en controles positivos de tomate (McGurl *et al.*, 1994) y en líneas PR portadoras del ADNc de prosistemina (fig. 7), lo cual es diferente al peso molecular real de 23 kDa. Esta migración inesperada ya fue observada previamente en mutantes de prosistemina producidos por *E. coli* y fue explicada debido al carácter altamente hidrofílico de la prosistemina, lo cual modifica su movilidad (Delano *et al.*, 1999). Una banda tenue de aproximadamente 25 kDa también

se observó en las líneas PRx. Ninguna de las dos bandas de proteínas se observó en plantas de papa no transformada.

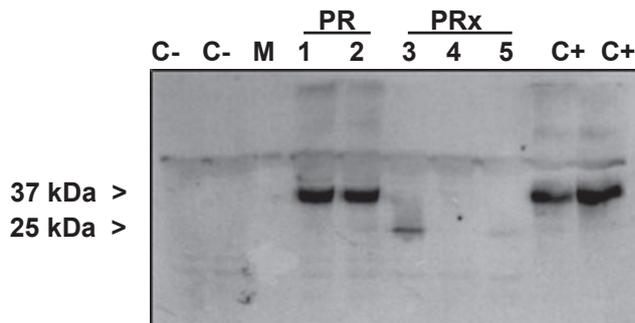


Fig. 7. Análisis Western blot de las líneas transgénicas. **PR:** líneas con ADNc de prosistemina. **PRx:** líneas con prosistemina incompleta. **C-:** plantas de papa no transformadas como control negativo. **M:** marcador Precision Plus Protein (BioRad). **1-2:** línea M4, **3:** línea T13, **4:** línea T47, **5:** línea T48, **C+:** plantas de tomate con sobre-expresión del ADNc de prosistemina como control positivo.

Plantas transgénicas mostraron un efecto específico en la expresión de genes de defensa. Para el análisis de expresión génica las plantas se obtuvieron a partir de tubérculos y las hojas se colectaron a las 4 semanas. Los genotipos PR y PRx se analizaron conjuntamente con plantas de papa no transformadas usadas como control. Se seleccionaron 3 líneas PR y PRx. El fenotipo de las plantas transgénicas (fig. 8) no mostró ninguna diferencia visible comparado con el de las plantas no transformadas.

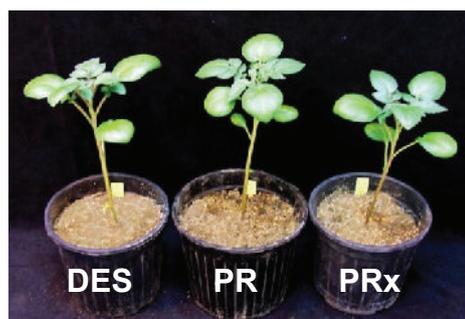


Fig. 8. Plantas de papa transgénica de 4 semanas: **DES:** *S. tuberosum* var. Desirée no transformada, **PR:** plantas transgénicas expresando el ADNc de prosistemina, **PRx:** plantas transgénicas expresando la prosistemina incompleta

El ARN total extraído de hojas de 27 plantas, 3 plantas por cada línea transgénica, se analizaron mediante RT-PCR en tiempo real. La electroforesis de gel de agarosa de ARN total de algunas muestras se observa en la fig. 9.

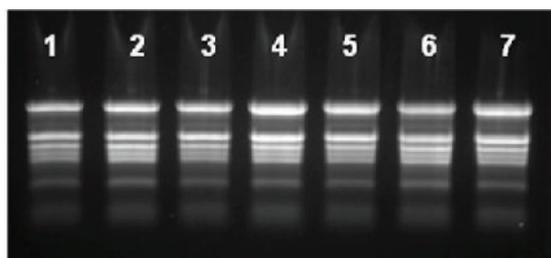


Fig. 9. Electroforesis de gel de agarosa de ARN total extraído de hojas de papa (4µg/fila) 1- 4: líneas PR expresando el ADNc de prosistemina, 5-7: líneas PRx expresando la prosistemina incompleta.

Después de la transcripción inversa del ARNm, la calidad del ADNc se controló mediante RT-PCR con los primers Elongation Factor 1-α para revelar cualquier contaminación de ADN. Un ejemplo de electroforesis de gel de agarosa de RT-PCR con los primers EF1-α se observa en la fig. 10.

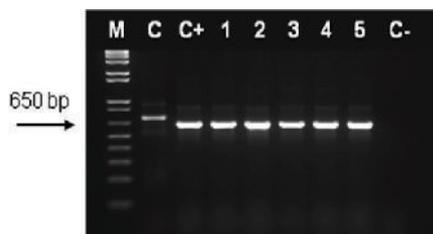


Fig. 10. Control de la síntesis de ADNc, RT-PCR de las líneas transgénicas con los primers EF1-α. **M:** marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), **C:** ADN genómico de plantas no transformadas como control de la contaminación, **C+:** ADNc de papa no transformada como control positivo, **1-5:** líneas PRx expresando la prosistemina incompleta. **C-:** agua como control negativo de la PCR.

La transcripción de los transgenes se controló de nuevo mediante RT-PCR con los primers Prosys y Sysdel (no mostrado). El gen Elongation Factor 1-alpha se usó como una referencia endógena para normalizar el nivel de expresión de los genes analizados, dado

que mostró tener un nivel consistente en todas las muestras (Nicot *et al.*, 2005). Plantas no transformadas se usaron como calibrador. Los valores Ct se usaron para calcular la cantidad relativa (valores RQ) de cada gen en estudio, usando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los productos de la PCR también se controlaron en gel de agarosa al 2% (no mostrado). Durante el análisis de las curvas de disociación, se confirmó que un único producto fue amplificado y que las temperaturas T_m correspondían al valor calculado en la tabla 2.

Tres grupos de genes se analizaron mediante RT-PCR en tiempo real, todos relacionados con el mecanismo de defensa de la planta. El primer grupo formado por *calmodulina* (*CaM*), *hidroperoxido liasa* (*HPL*), y *lipoxigenasa 3* (*Lox3*), todos genes asociados al inicio de la vía de los octadecanoides. *CaM* y *Lox* involucrados con la generación de ácido 13-hidroperoxi-octadecatrienoico y subsecuente producción de 12-OPDA, componente esencial para la generación de ácido jasmónico, y el gen *HPL* esencial para la generación de VOCs. El segundo grupo de genes incluyó algunos relacionados al ataque de patógenos, el gen *pathogenesis-related protein1b* (*PR1b*) y *endo-1,3-beta-D-glucanasa* (*GluB2*). El último grupo consistió en las prosisteminas endógenas de papa 1 y 2 (*PotProsys*) y los glicopéptidos endógenos o prosisteminas ricos en hidroxipolina (*ProHypSys*), todos involucrados en la respuesta de la planta a la masticación.

La expresión génica de *CaM* y *HPL* no mostraron diferencias en las líneas transgénicas respecto a los controles no transformados (fig. 11). Por el contrario, el gen *Lox3* se sobre-expresó 11 veces en las líneas PR y 6 veces en las líneas PRx con respecto a las plantas no transformadas usadas como control (DES). La expresión de los genes entre las líneas transgénicas PR y PRx no mostraron diferencias importantes.

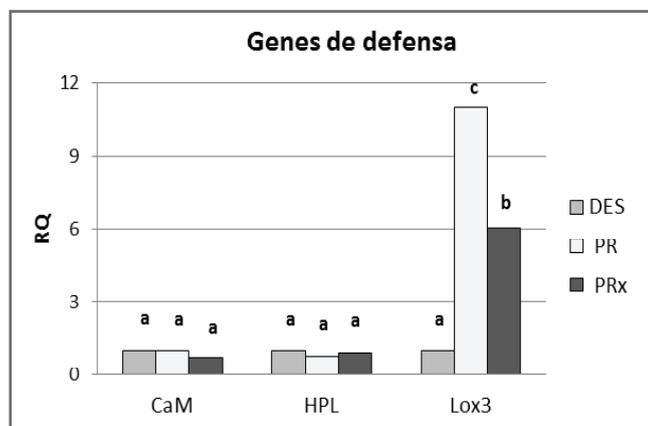


Fig. 11. Análisis de expresión de genes relacionados con la defensa. En el eje x se indican los genes analizados, **CaM**: calmodulina. **HPL**: ácido hidroperoxido liasa. **Lox3**: lipoxigenasa 3. En el eje y se reporta la cuantificación relativa (RQ). **DES**: papa no transformada, **PR**: líneas PR con el ADNc de prosistemina. **PRx**: líneas PRx con la prosistemina incompleta. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$

Estos resultados sugieren que la terminal N de prosistemina también juega un rol en la activación de algunos genes de defensa en papa, así como Dombrowski y otros (1999) encontraron que la terminal C es importante en la inducción de inhibidores de proteasas. La sobre expresión de *Lox3* en ambas líneas transgénicas sugiere la inducción de algunos genes que participan al inicio de la cascada de eventos.

De los genes relacionados con la respuesta a patógenos, el gen *PR1b* mostró alguna inhibición en las líneas PRx, y *GluB2* tuvo una expresión diferente en las líneas PR comparadas con el control, aun así, después del análisis estadístico los datos no mostraron diferencias significativas (fig. 12).

Las dos prosisteminas endógenas de papa (*PotProsys 1* y *2*) se analizaron juntas debido a la semejanza de sus secuencias. La prosistemina de papa y los glicopéptidos ricos en hidroxiprolina (péptidos similares a la prosistemina), ambos relacionados con la defensa, no mostraron diferencias en el nivel de expresión en ambas líneas transgénicas en comparación con el control no transformado,

sugiriendo que la prosistemina de tomate no produce una activación de estos genes específicos de papa (fig. 13).

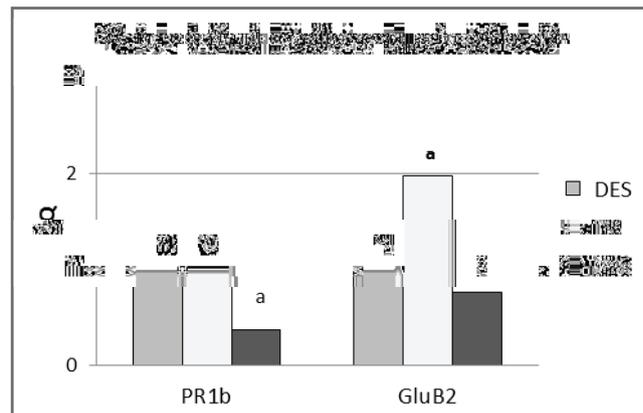


Fig. 12. Análisis de expresión de genes relacionados con la respuesta a patógenos. En el eje x se indican los genes analizados. **PR1b**: pathogenesis-related protein1b. **GluB2**: 1,3-beta-D-glucanasa. En el eje y se reporta la cuantificación relativa (RQ). **DES**: papa no transformada. **PR**: líneas PR con el ADNc de prosistemina. **PRx**: líneas PRx con la prosistemina incompleta. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$

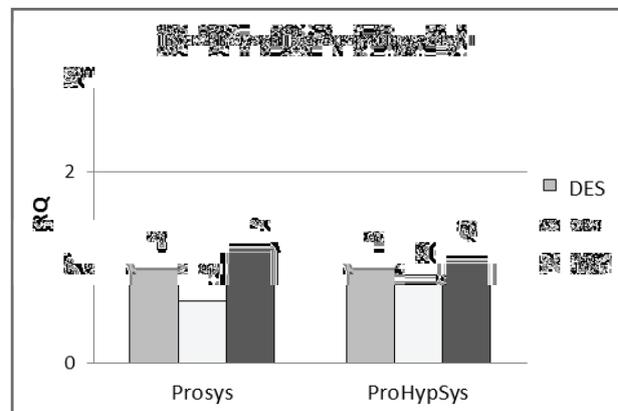


Fig. 13. Análisis de expresión génica de la prosistemina endógena y glicopéptidos ricos en hidroxiprolina. En el eje x se indican los genes analizados. **Prosys**: prosistemina endógena de papa 1 and 2. **ProHypSys**: glicopéptidos o prosisteminas ricos en hidroxiprolina. En el eje y se reporta la cuantificación relativa (RQ). **DES**: papa no transformada. **PR**: líneas PR con el ADNc de prosistemina. **PRx**: líneas PRx con la prosistemina incompleta. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$

Previamente, se demostró que la sistemina del tomate, un potente activador de la vía de

los octadecanoides, produce una activación sistémica de genes de defensa mediante la amplificación del ácido jasmónico en tomate (Li *et al*, 2002; Ryan y Pearce, 2003; Corrado *et al*, 2007). Cuando se expresa en papa, la sistemina parece provocar un efecto específico. Todos los genes analizados tienen relación con la defensa de la planta, pero solo *Lox3* fue sobre-expresado. Halitschke y Baldwin, (2003) demostraron en *Nicotiana attenuata* que *Lox3* provee de ácidos grasos hidroperóxidos para la síntesis de jasmonatos, el cual es una señal clave para la transcripción de proteínas defensivas. Este planteamiento coincide con Narváez-Vásquez y Ryan (2002) quienes observaron que la expresión del ADNc de prosistemina en papa regula la síntesis de inhibidores de proteasas en hojas. Así, estos datos sugieren que la prosistemina de tomate provoca en papa, de modo parcial, un efecto similar al que provoca en tomate. Las dos líneas transgénicas de papa mostraron una sobre expresión en *Lox3*, indicando que la terminal N de la proteína prosistemina juega un rol en la activación de *Lox3*.

CONCLUSIONES

La expresión del gen prosistemina en papa, no afecta los genes relacionados con respuesta a patógenos como *GluB2* y *PR1b*. Los genes de las prosisteminas endógenas relacionadas con el mecanismo de defensa, *Prosyls* y *ProHypSys* no fueron afectados por el transgen. Solamente *Lox3* se sobre expresó en ambos transformantes 11 veces más, lo cual indica que la terminal N también contribuye en la activación de algunos genes de defensa en papa. El estudio demuestra que la expresión heteróloga de precursores de una molécula señal puede provocar efectos inesperados, en este caso, potencialmente útiles para fines biotecnológicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Giandomenico Corrado por sus valiosos consejos y

constante apoyo, al Prof. Teodoro Cardi por sus sugerencias en la transformación genética de papa y al Prof. Andreas Schaller por suministrar el antisuero de prosistemina.

REFERENCIAS

Beerhues L. and Kombrink E., 1994. Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3-beta-glucanase in potato. *Plant Molecular Biology* 24(2): 353-367.

Bhattacharya R., Pearce G., Ryan C.A., 2008. A polyprotein precursor of defense-related hydroxyproline-rich glycopeptides in *Solanum tuberosum*. Unpublished.

Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Chen H., Wilkerson C.G., Kuchar J.A., Phinney B.S., Howe A.W., 2005. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *PNAS, USA* 102(52): 19237-19242.

Constabel C.P., Lynn Y. and Ryan C.A., 1998. Prosystemin from potato, black nightshade, and bell pepper: primary structure and biological activity of predicted systemin polypeptides. *Plant Molecular Biology* 36: 52-62.

Corrado G., Sasso R., Pasquariello M., Iodice L., Carretta A., Cascone P., Ariati L., Digilio M.C., Guerrieri E., Rao R., 2007. Systemin regulates both systemic and volatile signaling in tomato plants. *Journal of Chemical Ecology* 4: 669-681.

Delano J.P., Dombrowski J.E., Ryan C.A., 1999. The expression of tomato prosystemin in *Escherichia coli*: a structural challenge.

Protein Expression and Purification 17: 74-82.

Dombrowski J.E., Pearce G., Ryan C.A., 1999. Proteinase inhibitor-inducing activity of the prohormone prosystemin resides exclusively in the C-terminal systemin domain. *PNAS, USA* 96 (22): 12947-12952.

Felton G.W., 2005. Indigestion is a plant's best defense. *PNAS, USA* 102(52): 18771-18772.

Halitschke R. and Baldwin I.T., 2003. Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal* 36: 794-807.

Hanley M.E., Lamont B.B., Fairbanks M.M., Rafferty C.N., 2007. Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 8: 157-178.

Hoegen E., Stroemberg A., Pihlgren U. and Kombrink E., 2002. Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato. *Mol. Plant Pathol.* 3(5): 329-345.

Howe G.A., Jander G., 2007. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59: 41-66.

Kolomiets, M.V., Hannapel, D.J. and Gladon, R.J., 1996. Nucleotide Sequence of a cDNA Clone for a Lipxygenase from Abscisic Acid-Treated Potato Leaves (Accession No. U60202). *Plant Physiology* 112: 445.

Livak K.L., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25: 402-408.

Li L., Li C., Lee G.I., Howe G.A., 2002. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *PNAS, USA* 99: 6416-6421.

McGurl B., Ryan C.A., 1992. The organization of the prosystemin gene. *Plant Molecular Biology* 20: 405-409.

McGurl B., Pearce G., Orozco-Cárdenas M., Ryan C.A., 1992. Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* 255: 1570-1573.

McGurl B., Orozco-Cárdenas M., Pearce G., Ryan C.A., 1994. Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *PNAS, USA* 91: 9799-9802.

Nakane E., Kawakita K., Doke N., Yoshioka H., 2003. Elicitation of primary and secondary metabolism during defense in the potato. *Journal of General Plant Pathology* 69: 378-384.

Narváez-Vásquez J. and Ryan C.A., 2002. The systemin precursor gene regulates both defensive and developmental genes in *Solanum tuberosum*. *PNAS, USA* 99: 15818-15821.

Narváez-Vásquez J., Orozco-Cárdenas M.L., Ryan C.A., 2007. Systemic wound signaling in tomato leaves is cooperatively regulated by systemin and hydroproline-rich glycopeptide signals. *Plant Mol Biol.* 65: 711-718.

Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D., 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56(421): 2907-2914.

Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan C.A., 1991. A polypeptide from tomato leaves

- induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253(5022): 895-897.
- Pearce G., Ryan C.A., 2003. Systemic signalling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling glycopeptides hormones coded in a single precursor gene. *The Journal of Biological Chemistry* 278(32): 30044-30050.
- Pearce G., Siems W.F., Bhattacharya R., Chen Y.C., Ryan C.A., 2007. Three hydroxyproline-rich glycopeptides derived from a single petunia polyprotein precursor activate *defensin I*, a pathogen defense response gene. *The Journal of Biological Chemistry* 284(24): 17777-17784.
- Pearce G., Bhattacharya R., Chen Y.C., Barona G., Yamaguchi Y., Ryan C.A., 2009. Isolation and characterization of hydroxyproline-rich glycopeptides signals in black nightshade leaves. *Plant Physiology* 150(3): 1422-1433.
- Rotenberg D., Thompson T.S., German T.L., Willis D.K., 2006. Methods for effective real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. *Journal of Virological Methods* 138: 49-59.
- Ryan C.A., 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 112-121.
- Ryan C. A. y Pearce G., 2003. Systemins: a functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. *PNAS, USA* 100: 14577-14580.
- Sambrook J. and Russell D.W., 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual 3rd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* pp. 999.
- Takezawa D., Liu Z.H., An G., Poovaiah B.W., 1995. Calmodulin gene family in potato: developmental and touch-induced expression of the mRNA encoding a novel isoform. *Plant Mol. Biol.* 27(4): 693-703.
- Vancanneyt G., Sanz C., Farmaki T., Paneque M., Ortego F., 2001. Hydroperoxyde lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *PNAS, USA* 98: 8139-8144.
- Walling L.L., 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 195-216.