

Silenciamiento del gen de la prosistemina

en callos de *Physalis philadelphica*

(Solanaceae)

Silencing of the prosystemin gene in

the calluses of *Physalis philadelphica*

(Solanaceae)

María Fernanda Esparza-Soltero¹, Fernando Santacruz-Ruvalcaba¹, Abel Gutiérrez-Ortega², José Luis Cabrera-Ponce³ y Carla Sánchez-Hernández¹✉

¹Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez No. 2100, La Venta del Astillero, 45221, Zapopan, Jalisco; México.

²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Irapuato, Laboratorio de Transformación Genética de Plantas, Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León Irapuato 36821, Guanajuato, México.

³Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), Biotecnología Médica y Farmacéutica, Av. Normalistas 800 Colinas de La Normal, Guadalajara 44270, Jalisco, México.

✉ shc32289@cucba.udg.mx

Citar

Resumen

Las plantas responden al ataque de los insectos herbívoros mediante la activación de la expresión de genes involucrados en defensa, los cuales ejercen un efecto sobre el desarrollo, reproducción y comportamiento de los insectos herbívoros. La sistemina es un péptido de 18 aminoácidos, sintetizado a partir del extremo C-terminal de una proteína precursora conocida como prosistemina, que promueve en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) la expresión de proteínas relacionadas con defensa cruciales en la resistencia contra insectos herbívoros. El análisis genético de la respuesta a daño en jitomate sugiere que la prosistemina forma parte de una ruta de señalización de defensa que involucra una compleja regulación de la biosíntesis y percepción del ácido jasmónico (AJ). Con el propósito de entender si los mecanismos que regulan la respuesta defensiva en tomate de cáscara (*Physalis philadelphica* Lam.) corresponden con el modelo de señalización planteado para jitomate, en esta investigación se evaluó la funcionalidad de la prosistemina de tomate de cáscara durante la modulación de respuestas asociadas a AJ. Para ello, se generaron callos transgénicos silenciados en la expresión de la prosistemina, en

los cuales se analizó la expresión de genes marcadores de la ruta de señalización del AJ.

Palabras clave: ácido jasmónico, genes de defensa, prosistemina, Solanaceae, CUCBA.

Abstract

Plants respond to the attacks of herbivorous insects by activating the expression of genes involved in defense, which exert an effect on the development, reproduction and behavior of those insects. Systemin is an 18-amino acid peptide synthesized from the C-terminus of a protein precursor called prosystemin that in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) promotes the expression of defense-related proteins that are crucial in resistance to herbivorous insects. Genetic analyses of the response to damage in tomato suggests that prosystemin forms part of a defense signaling pathway that involves a complex regulation of the biosynthesis and perception of jasmonic acid (JA). In order to determine whether the mechanisms that regulate the defensive response in tomatillo (*Physalis philadelphica* Lam.) correspond to the signaling model posited for tomato, this study evaluated the functionality of the prosystemin in tomatillo during

modulation of responses associated with JA. To this end, silenced transgenic calluses were generated in the expression of prosystemin, in which the expression of marker genes of the signaling pathway of JA was analyzed.

Key words: jasmonic acid, defense genes, prosystemin, Solanaceae, CUCBA.

Introducción

Las plantas responden al ataque de los insectos herbívoros mediante la activación de la expresión de genes involucrados en defensa. Estos genes tienen un efecto sobre el desarrollo, reproducción y comportamiento de los insectos herbívoros y/o de sus enemigos naturales, que permite contrarrestar los efectos negativos de dicha interacción (War *et al.* 2012). La defensa sistémica requiere de un sistema de reconocimiento del agresor en el sitio de daño, que a su vez active una vía de transducción de señales capaz de generar, transportar e interpretar señales de alarma para modular a distancia una respuesta de defensa.

Hace más de 20 años, se descubrió en “jitomate” (*Solanum lycopersicum*) la primera hormona peptídica en plantas involucrada en la regulación de una respuesta defensiva (Pearce *et al.* 1991). La sistemina es un péptido de 18 aminoácidos que promueve la expresión de inhibidores de proteasas y emisión de compuestos volátiles, cruciales para la resistencia contra Lepidópteros (Ryan 2000). Este péptido se sintetiza a partir del extremo C-terminal de una proteína precursora de 200 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 23kDa, conocida como prosistemina (Pearce *et al.* 1991). El análisis genético de la respuesta a daño en jitomate sugiere que la prosistemina y la sistemina son elementos de una ruta de señalización de defensa que involucra una compleja regulación de la biosíntesis y percepción del ácido jasmónico (AJ) en la célula (Li *et al.* 2001; Pearce & Ryan 2003). La interacción de la sistemina con su receptor en membrana da origen a una compleja cascada de eventos intracelulares, tales como la apertura de

Introduction

Plants respond to the attacks of herbivorous insects by activating the expression of genes involved in defense. These genes exert an effect on the development, reproduction and behavior of herbivorous insects and/or their natural enemies that makes it possible to counteract the negative effects of that interaction (War *et al.* 2012). Systemic defense requires a system that recognizes the aggressor at the damage site and, in turn, activates a signal transduction pathway that is able to generate, transport and interpret alarm signals to remotely modulate a defense response.

Over 20 years ago, studies of “tomato” (*Solanum lycopersicum*) discovered the first peptide hormone in plants that is involved in regulating a defensive response (Pearce *et al.* 1991). Systemin is an 18-amino acid peptide that promotes the expression of protease inhibitors and the emission of volatile compounds that are crucial in resistance against Lepidoptera (Ryan 2000). This peptide is synthesized from the C-terminus of a pre-cursor, 200-amino acid protein with an approximate molecular weight of 23kDa, called prosystemin (Pearce *et al.* 1991). Genetic analyses of the response to damage in tomatoes suggest that prosystemin and systemin are elements of a defensive signaling pathway that involves a complex regulation of the biosynthesis and perception of jasmonic acid (JA) in the cell (Li *et al.* 2001; Pearce & Ryan 2003). Interaction of systemin with its receptor in the membrane produces a complex cascade of intracellular events, including the aperture of ionic channels, changes in the concentration of cytosolic calcium, depolarization of the membrane, and activation of MAP kinases. All these events converge in the

canales iónicos, cambios en la concentración de calcio citosólico, despolarización de membrana y activación de MAP cinasas. Todos estos eventos convergen en la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana, la liberación del ácido linoléico y la síntesis del AJ a través de la ruta octadecanoica. Se ha propuesto que la señalización a distancia se transmite mediante una amplificación que se produce a través de la activación de genes que codifican para la síntesis de AJ en el tejido vascular de manera dependiente de sistemina (Schilmiller & Howe 2005). Se han identificado homólogos de la prosistemina de “jitomate” en “papa” (*Solanum tuberosum* L.), “hierba mora” (*S. nigrum* L.) “chile” (*Capsicum annuum* L.) y “tomate de cáscara” (*Physalis philadelphica*). El análisis de las secuencias aminoácidas reveló una similitud entre el 68–88 % respecto a la de “jitomate” (Constabel *et al.* 1998; Rosales-Campos *et al.* 2008). Al analizar la actividad biológica de los péptidos, se observó que la sistemina de “chile” y “papa”, inducían en jitomate la síntesis de inhibidores de proteasas (Constabel *et al.* 1998).

Los resultados de distintos trabajos resaltan la función de la prosistemina en la regulación de las respuestas defensivas asociadas a herbivoría en “jitomate”. Plantas transgénicas transformadas con el gen de la prosistemina en antisentido mostraron una reducción considerable de las respuestas sistémicas asociadas a defensa y presentaron un incremento en susceptibilidad hacia herbívoros (Orozco-Cardenas *et al.* 1993). Por otro lado, la sobreexpresión del gen de la prosistemina ocasionó una expresión constitutiva de numerosos genes de defensa (McGurl *et al.* 1994) y un aumento en la resistencia a herbívoros (Li *et al.* 2002). Además, se comprobó que mutaciones en la señalización intermediada por prosistemina modificaban la expresión inducida de genes de respuesta a herbivoría (Sun *et al.* 2011). No obstante, en “hierba mora”, Schmidt & Baldwin (2006), al utilizar líneas transgénicas silenciadas en prosistemina demostraron la nula participación de este gen en la regulación de defensas contra insectos herbívoros, reportando niveles similares de inhibidores de proteasas y de AJ, así como el número de herbívoros y porcentaje de daño, entre plantas silenciadas y plantas control (no transformadas).

hydrolysis of phospholipids in the membrane, the release of linolenic acid, and the synthesis of JA through the octadecanoid pathway. It has been suggested that remote signaling is transmitted through an amplification produced by the activation of genes that codify for the synthesis of JA in the vascular tissue in a systemin-dependent manner (Schilmiller & Howe 2005). Homologues of the prosystemin of “tomato” have been identified in the “potato” (*Solanum tuberosum* L.), “nightshade” (*S. nigrum* L.), “chili peppers” (*Capsicum annuum* L.), and “tomatillo” (*Physalis philadelphica*). Analyses of the amino acid sequences revealed a 68–88% similarity with respect to “tomato” (Constabel *et al.* 1998; Rosales-Campos *et al.* 2008). Upon analyzing the biological activity of the peptides, the systemin in “chili peppers” and “potato” was seen to induce synthesis of protease inhibitors in tomato (Constabel *et al.* 1998).

Results from several studies emphasize the function of prosystemin in regulating defensive responses associated with herbivory in “tomato”. Transgenic plants transformed with the prosystemin gene in antisense showed a considerable reduction of the systemic responses associated with defense, and presented increased susceptibility to herbivores (Orozco-Cardenas *et al.* 1993). In addition, the over-expression of the prosystemin gene produced an expression that was constitutive of numerous defense genes (McGurl *et al.* 1994), and an increase in resistance to herbivores (Li *et al.* 2002). Also, it has been proven that mutations in the signaling mediated by prosystemin modified the induced expression of response genes to herbivory (Sun *et al.* 2011). Nonetheless, working with “nightshade” and using transgenic lines silenced in prosystemin, Schmidt & Baldwin (2006) demonstrated the null participation of this gene in the regulation of defenses against herbivorous insects, reporting similar levels of protease inhibitors and JA, as well as the number of herbivores and the percentage of damage, between silenced and control (*i.e.*, non-transformed) plants.

To determine whether the mechanisms that regulate the defensive response in tomatillo correspond to the signaling model posited for “tomato”, this study evaluated the functionality of

Con el objetivo de entender si los mecanismos que regulan la respuesta defensiva en tomate de cáscara corresponden con el modelo de señalización planteado para “jitomate”, en este trabajo se evaluó la funcionalidad de la prosistemina durante la modulación de respuestas asociadas a AJ. Para ello, se generaron callos transgénicos silenciados en la expresión de la prosistemina, en los cuales se analizó la expresión de genes marcadores de la ruta de señalización del AJ.

Materiales y métodos

Material biológico

Para la generación de callos, se germinaron semillas de *Physalis philadelphica* variedad Yoreme, en medio MS (Murashige y Skoog 1962) en cámara de crecimiento con condiciones controladas de fotoperiodo de 16 h luz a 28 °C y 8 h de oscuridad a 16 °C. Para la obtención de explantes se utilizaron las hojas cotiledonares; los explantes fueron colocados en medio MS adicionado con ácido naftalenacético (ANA) 1 µM y bencil aminopurina (BAP) 12.5 µM. Para la transformación se utilizó la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el plásmido pFGC5941 o pFGC5941SYSFR (Figura 1) crecida en agitación por 48 h en medio YM líquido, adicionado con 50 mg/L de kanamicina y 50 mg/L de rifampicina. Los plásmidos contienen los genes de selección *nptII* (kanamicina) para bacterias y *Bar* (bialafos) para callos, pFGC5941SYSFR contienen además los fragmentos repetidos invertidos de la secuencia de la prosistemina que formará el RNAi (SYSFR).

Para los ensayos con plantas, se germinaron las semillas en musgo descompuesto (Sunshine) y las plántulas trasplantadas a macetas de 350 mL, con una mezcla de musgo descompuesto, perlita (Dicamex) y suelo agrícola en partes iguales. Se mantuvieron las plantas en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo (16 h luz a 28 °C y 8 h de oscuridad a 16 °C) hasta llegar a desarrollar 5 a 6 hojas verdaderas.

Transformación vía *Agrobacterium*

La transformación se realizó de acuerdo al protocolo de Assad-García *et al.* (1992). Para ello, se tomaron 50 explantes y se mantuvieron 48 h

prosystemin during modulation of responses associated with JA. To do so, transgenic calluses silenced in the expression of prosystemin were generated, and the expression of marker genes of the JA signaling pathway was analyzed.

Materials and Methods

Biological material

To produce the calluses, seeds of *Physalis philadelphica*, variety Yoreme, were germinated in MS medium (Murashige and Skoog 1962) in a growth chamber under controlled conditions for a photoperiod of 16 h of light at 28°C and 8 h of darkness at 16°C. Cotyledon leaves were used to obtain explants, which were then placed in MS medium with 1 µM of *naphthaleneacetic acid* (ANA) and 12.5 µM of benzyl aminopurine (BAP) added. For the transformation, the study used the LBA4404 strain of *Agrobacterium tumefaciens* transformed with the pFGC5941 or pFGC5941SYSFR plasmid (Figure 1) cultured under agitation for 48 h in liquid YM medium, adding 50 mg/L of kanamycin and 50 mg/L of rifampicin. The plasmids contain *nptII* selection genes (kanamycin) for bacteria and *Bar* (bialafos) for calluses, while pFGC5941SYSFR contains as well the inverted repeat fragments of the prosystemin sequence that will form RNAi (SYSFR).

For the trials with plants, seeds were germinated in decomposed moss (Sunshine) and the seedlings were transplanted to 350-mL pots with a mixture of equal parts of decomposed moss, perlite (Dicamex) and agricultural soil. The plants were kept under controlled conditions of temperature and photoperiod (16 h of light at 28°C and 8 h of darkness at 16°C) until they had developed 5-to-6 true leaves.

Transformation via *Agrobacterium*

Transformation was performed following Assad-García *et al.*'s protocol (1992), as follows. A total of 50 explants were placed for 48 h in agitation at 160 rpm in liquid MS medium that contained 1 mL of the bacteria previously grown to 0.7 of DO_{600nm}. The cotyledons were transferred to solid MS medium and 1 µM of ANA (*naphthaleneacetic acid*) and 12.5 µM of BAP (6 benzyl

en agitación a 160 rpm en medio MS líquido que contenía 1 mL de la bacteria previamente crecida hasta 0.7 de DO_{600nm} . Los cotiledones fueron transferidos a medio MS sólido adicionado con ANA (ácido naftalenacético) 1 μM y BAP (6 bencilaminopurina) 12.5 μM por 14 d para fomentar la regeneración de brotes y formar callos organogénicos. Para acelerar la eliminación de la bacteria, posterior al cocultivo, los cotiledones se lavaron con Claforan (cefotaxima) 500 mg/L por 48 h a 160 rpm. En ensayos preliminares se realizó una curva de tolerancia de los callos organogénicos al bialafos, con concentraciones de 0.1 a 10 mg/L. En los experimentos de transformación genética los callos fueron seleccionados en medio MS adicionado con ANA 1 μM y BAP 12.5 μM , 4mg/L de bialafos y 500mg/L de Claforan durante 4 semanas. Los callos se mantuvieron en condiciones controladas en cámara de crecimiento (16 h luz a 28 °C y 8 h de oscuridad a 16 °C), con una frecuencia de subcultivo de 2 semanas.

Confirmación molecular de la transformación

La confirmación molecular se realizó mediante la amplificación por PCR de un fragmento del gen *Bar* (242pb) y de un fragmento de la construcción correspondiente a una sección del promotor 35S y de la secuencia SYSF (319pb) (Figura 1). Partiendo de 200 mg de callo organogénico se extrajo DNA siguiendo el protocolo de Dellaporta (1983). Los oligonucleótidos utilizados para la

aminopurine) were added for 14 d to foster the regeneration of sprouts and form organogenic calluses. To accelerate elimination of the bacteria, after the co-culture, the cotyledons were washed with 500 mg/L of Claforan (cefotaxime) for 48 h at 160 rpm. In preliminary trials, a tolerance curve of the organogenic calluses to the bialaphos was elaborated using concentrations of 0.1-to-10 mg/L. In the genetic transformation experiments, the calluses were selected in MS medium with 1 μM of ANA, 12.5 μM of BAP, 4mg/L of bialaphos and 500mg/L of Claforan added during 4 weeks. The calluses were kept under controlled conditions in a growth chamber (16 h of light at 28°C and 8 h of darkness at 16°C), with a sub-culture frequency of 2 weeks.

Molecular confirmation of the transformation

Molecular confirmation was conducted using PCR amplification of a fragment of the *Bar* gene (242pb) and a fragment of the construction that corresponded to a section of the 35S promoter and the SYSF sequence (319pb) (Figure 1). Beginning with 200 mg of organogenic callus, DNA was extracted following Dellaporta's protocol (1983). The oligonucleotides used for amplification were: 5'-ACGCACAATCCACTATCCT-3'/5'-TTTCTTGTGCATCCTCCCT-3' for SYSFR and 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAC-3'/5'-AGTCGACCGTGTACGTCTCC-3' for *Bar*. The program employed to conduct amplification was: denaturalization at



Figura 1. Plásmido pFGC5941SYSFR utilizado para silenciar el gen de la prosistemina en explantes de tomate de cáscara. Se destacan los fragmentos de los repetidos invertidos (SYSF y SYSR) de la secuencia de la prosistemina (verde) y del intrón de la chalcona sintasa *ChsA* de *Petunia hybrida* (morado), necesarios para la formación del precursor del RNAi. El plásmido posee los genes *Kan* de resistencia a kanamicina (amarillo) y *Bar* de resistencia a bialafos (azul). En negro se señalan los fragmentos esperados utilizados para confirmar por PCR la transformación.

Figure 1. The pFGC5941SYSFR plasmid used to silence the gene of prosystemin in explants of tomatillo, showing the fragments of the inverted repeats (SYSF and SYSR) of the prosystemin sequence (green), and of the intron of the chalcone synthase, *ChsA*, of *Petunia hybrida* (purple), necessary for the formation of the precursor of the RNAi. The plasmid possesses the *Kan* genes of resistance to kanamycin (yellow) and *Bar* of resistance to bialaphos (blue). The black color shows the expected fragments utilized to confirm transformation by PCR.

amplificación fueron: 5'-ACGCACAATCCCAC-TATCCT-3'/5'-TTTCTTGTGCATCCTCCCCT-3' para SYSFR y 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAA-AC-3'/5'-AGTCGACCGTGTACGTCTCC-3' para *Bar*. El programa que se utilizó para amplificar fue: desnaturalización a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización 94 °C por 30 s, alineamiento a 56 °C para SYSFR o 60 °C para *Bar* por 30 s, extensión a 72 °C y 30 s; seguida de una extensión final a 72 °C por 10 min. La reacción de PCR se realizó al utilizar la enzima GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), de acuerdo a las especificaciones del producto.

Análisis de expresión por PCR cuantitativo (qPCR)

La inducción de los genes a evaluar se realizó a callos o plantas, asperjando una solución de ácido jasmónico 1 mM hasta punto de saturación. Las muestras permanecieron dentro de cámara de crecimiento bajo condiciones controladas y se colectaron y pulverizaron con nitrógeno líquido a las 0 h (control), 2, 4, 8, 12 y 24 h. El material vegetal se mantuvo a -70 °C hasta su procesamiento.

La extracción de RNA total se realizó a partir de 200 mg de callo (o tejido foliar) y el reactivo TRIzol Reagent (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del producto. La calidad e integridad de RNA se evaluó por espectrofotometría a 260/280 nm y electroforesis desnaturalizante. El cDNA se sintetizó mediante la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Para el qPCR se utilizó el termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems). La mezcla se llevó a cabo en placas de 96 pozos en un volumen total de 15 µL utilizando una concentración de 150 nM de cada oligonucleótido. Cada una de las muestras contenía 2x SYBR Green Mastermix, oligonucleótidos sentido y antisentido, cDNA y agua. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s, alineación a 58 °C por 1 min y una extensión de 95 °C por 15 s. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. El análisis de expresión se realizó mediante el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, en donde $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gen a evaluar} - Ct \text{ gen de referencia})$ de callos control - $(Ct \text{ gen a evaluar} - Ct \text{ gen de referencia})$

94 °C for 5 min, 35 denaturalization cycles at 94 °C for 30 s, alignment at 56 °C for SYSFR or 60 °C for *Bar* for 30 s, extension at 72 °C for 30 s, followed by a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR reaction was performed with the enzyme GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), following product specifications.

Analysis of quantitative expression by PCR (qPCR)

Induction of the genes to be evaluated was carried out with calluses or plants by sprinkling a 1 mM solution of jasmonic acid up to the saturation point. The samples remained in the growth chamber under controlled conditions until collected and pulverized with liquid nitrogen at 0 (control), 2, 4, 8, 12 and 24 h. The vegetable material was held at -70 °C until processing.

Total RNA extraction was performed with 200 mg of callus (or foliar tissue) and the TRIzol Reagent (Invitrogen), following product specifications. The quality and integrity of the RNA was evaluated by spectrophotometry at 260/280 nm and denaturalizing electrophoresis. The cDNA was synthesized by the M-MLV Reverse Transcriptase enzyme (Promega). The StepOne Plus thermocycler (Applied Biosystems) was utilized for qPCR. Mixing was conducted in 96-well plates at a total volume of 15 µL using a 150 nM concentration of each oligonucleotide. Each sample contained 2x SYBR Green Mastermix, sense and antisense oligonucleotides, cDNA and water. The amplification conditions were: denaturalization at 95 °C for 10 min, followed by 40 denaturalization cycles at 95 °C for 15 s, alignment at 58 °C for 1 min, and an extension at 95 °C for 15 s. All samples were analyzed in triplicate. Expression analysis was conducted using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ comparative method, where $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gene to be evaluated} - Ct \text{ reference gene})$ of control calluses - $(Ct \text{ gene to be evaluated} - Ct \text{ reference gene})$ of the induced calluses, following Livak and Schmittgen (2001), and employing 18S as the reference gene of (5'-TAGCAGGCTGAGGTCTCGTT-3'/5'-ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG-3'). The 5'-AGGGAGGATGCACAAGAAA-3'/5'-ATTGTGCTCCCTCTCCTCCT-3' and 5'-GGCCTAGTTAGCTCAATGGC-3'/5'-TGAAGTGAAGGGACACAAC-3' oligonucleotides were used to

de callos inducidos de acuerdo a Livak y Schmittgen (2001), empleando el 18S como gen de referencia (5'-TAGCAGGCTGAGGTCTCGTT-3'/5'-ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG-3'). Los oligonucleótidos 5'-AGGGGAGGATGCACAA-GAAA-3'/5'-ATTGTGCTCCCTCTCCTCCT-3' y 5'-GGCCTAGTTAGCTCAATGGC-3'/5'-TGA-ACTGAAAGGGACACA-3', se utilizaron para evaluar la expresión de los genes de prosistema y lipoxigenasa (*Lox*), respectivamente.

Resultados y discusión

Se logró el establecimiento de los callos sin modificación alguna a protocolo propuesto por Assad-García *et al.* (1992). Los primeros indicios de la formación de callos se apreciaron a partir de la segunda semana de iniciado el cultivo. Cuatro semanas después, los explantes se transformaron completamente en callo. Los resultados obtenidos de la curva de tolerancia del agente de selección mostraron que 7 días de exposición, y una concentración de 0.5 mg/L de bialafos, reducían el crecimiento de los callos y generaban clorosis en comparación con un control (sin tratamiento). Concentraciones superiores resultaban tóxicas e inhibían en su totalidad el crecimiento (Figura 2). Para la selección del material transformado se utilizó una concentración inhibitoria óptima de 4 mg/L.

evaluate the expression of the genes of prosystemin and lipoxigenase (*Lox*), respectively.

Results and Discussion

The calluses were established with no modifications whatsoever, according to the protocol proposed by Assad-García *et al.* (1992). The first indications of the formation of calluses appeared during the second week after culture began. Four weeks later, the explants were completely transformed into calluses. The results obtained from the tolerance curve of the selection agent showed that 7 days of exposure with a concentration of 0.5 mg/L of bialaphos, reduced the growth of the calluses and produced chlorosis, compared to an untreated control. Higher concentrations proved to be toxic, inhibiting growth completely (Figure 2). An optimal inhibitory concentration of 4 mg/L was used to select the transformed material.

Of the 50 explants subjected to transformation with the empty plasmid (pFGC5941), only 4 individual calluses showed tolerance to bialaphos. However, molecular confirmation by PCR was only positive in 1 callus (Figure 3a). From the 50 explants subjected to transformation with the silencing construction (SYSRF), 5 bialaphos-tolerant calluses were obtained, of which only 2 turned out to be positive upon confirma-

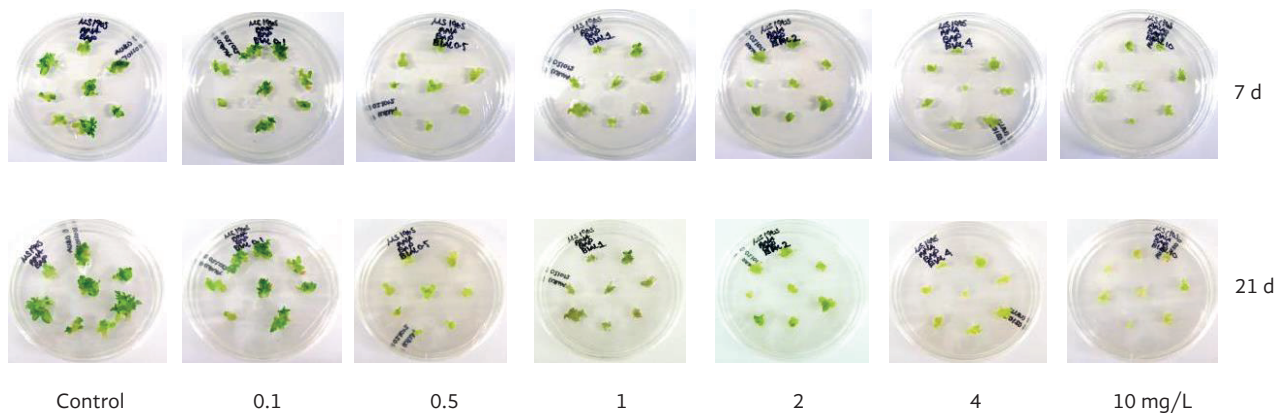


Figura 2. Curva de tolerancia de los callos organogénicos 7 y 21 días posteriores al contacto con el agente de selección. La evaluación incluyó concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 2, 4 y 10 mg/L de bialafos y un control (sin bialafos).

Figure 2. Tolerance curve of the organogenic calluses at 7 and 21 days after contact with the selection agent. Evaluation included concentrations of 0.1, 0.5, 1, 2, 4 and 10 mg/L of bialaphos and a control (without bialaphos).

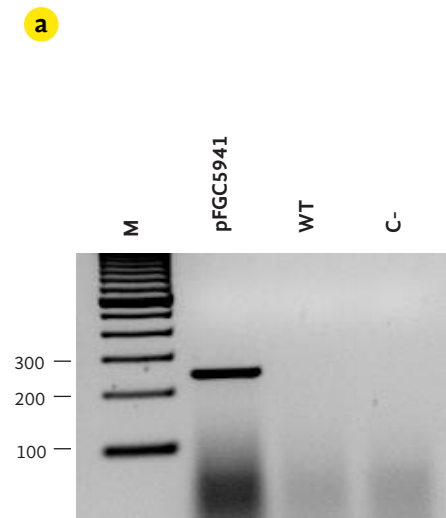


Figura 3. Confirmación de la transformación mediante amplificación por PCR. Detección del producto de amplificación de un fragmento del gen *Bar* (242 pb) en callos transformados con el plásmido pFGC5941 (a). Detección del producto de amplificación de un fragmento del gen *Bar* y de un fragmento de la construcción de silenciamiento (SYSFR), que incluye parte de la secuencia del promotor 35S y de uno de los repetidos invertidos de la secuencia de la prosistemin (319 pb), en callos transformados con el plásmido pFGC5941SYS (b). M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), WT: Callos no transformados, C: Controles técnicos (+ y -), SysFR-1 y SysFR-2: Clonas transformadas con la construcción de silenciamiento, pFGC5941: Clona transformada con el plásmido vacío.

De los 50 explantes sometidos a transformación con el plásmido vacío (pFGC5941), sólo 4 callos individuales presentaron tolerancia hacia el bialafos. Sin embargo, la confirmación molecular por PCR sólo fue positiva en 1 callo (Figura 3a). A partir de los 50 explantes sometidos a transformación con la construcción de silenciamiento (SYSRF), se obtuvieron 5 callos tolerantes a bialafos, de los cuales sólo 2 resultaron positivos al confirmar por PCR la incorporación del gen *bar*, así como de un fragmento de la construcción correspondiente a una sección del promotor 35S y uno de los repetidos invertidos de la prosistemin (Figura 3b). No se observaron alteraciones fenotípicas en los callos transformados, aunque en ningún caso se logró una regeneración hasta planta. La eficiencia de transformación en ambos casos es baja (menor al 5%). Estos resultados coinciden con lo reportado por Assad-García *et al.* (1992) y Martínez-Oceguera *et al.* (2006) también en “tomate de cáscara”.

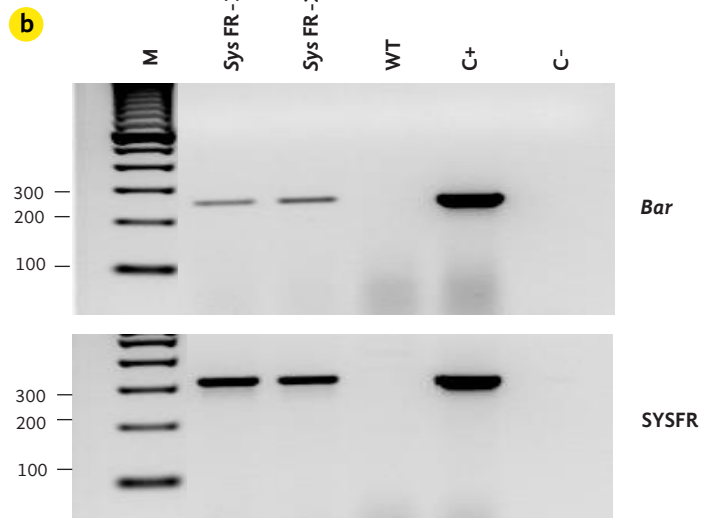


Figure 3. Confirmation of the transformation by PCR amplification. Detection of the amplification product of a fragment of the *Bar* gene (242 pb) in calluses transformed with the plasmid pFGC5941 (to). Detection of the amplification product of a fragment of the *Bar* gene and of a fragment of the silencing construction (SYSFR), that includes part of the sequence of the 35S promoter and one of the inverted repeats of the prosystemin sequence (319 pb) in calluses transformed with the pFGC5941SYS plasmid (b). M: Marker of molecular weight of 100 pb (Invitrogen), WT: Non-transformed calluses, C: Technical controls (+ and -), SysFR-1 and SysFR-2: Clones transformed by the silencing construction, pFGC5941: Clone transformed with the empty plasmid.

tion of the incorporation of the gene *bar* by PCR, together with one fragment of the construction that corresponded to a section of the 35S promoter, and one of the inverted repeats of prosystemin (Figure 3b). No phenotypical alterations were observed in the transformed calluses, but in no case was regeneration to a plant achieved. Transformation efficiency in both cases was low (below 5%). These results coincide with those reported by Assad-García *et al.* (1992) and Martínez-Oceguera *et al.* (2006) also using “tomatillo”.

In the non-transformed “tomatillo” plants, the levels of expression of prosystemin increased notably in foliar tissue in response to treatment with JA. The accumulation of transcript began 2 h after treatment, reaching maximum levels at 24 h (Figure 4). Similar results were reported for the prosystemin of “tomatillo” in response to mechanical damage (McGurl *et al.* 1992). The expression pattern observed in plants was modified in the calluses transformed with the plas-

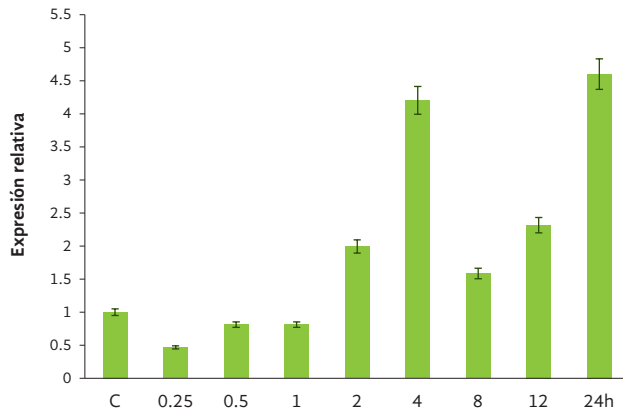


Figura 4. Cinética de expresión del gen de la prosistemina en plantas de tomate de cáscara tratadas con ácido jasmónico 1mM. C: Control (tratamiento 0h).

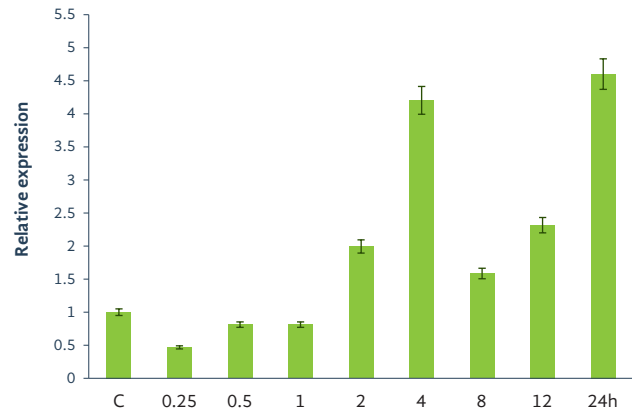


Figure 4. Kinetics of the expression of the prosystemin gene in tomatillo plants treated with 1mM of jasmonic acid. C: Control (0h treatment).

En plantas de “tomate de cáscara” no transformadas, se incrementan notablemente en tejido foliar los niveles de expresión de la prosistemina en respuesta al tratamiento con AJ. La acumulación de transcrito comienza 2 h posterior al tratamiento, llegando a niveles máximos a las 24 h (Figura 4). Se reportaron resultados similares para la prosistemina de “jitomate” en respuesta a daño mecánico (McGurl *et al.* 1992). El patrón de expresión observado en plantas se modifica en los callos transformados con el plásmido pFGC5941 en donde prevalece el incremento de la prosistemina pero se observa hasta las 12 h. Como era de esperarse, en los callos silenciados (SysFR-1) no se observa ningún incremento en los niveles de transcrito, con lo cual se confirma el silenciamiento del gen de la prosistemina (Figura 5a). La clona SysFR-2 se perdió por problemas de contaminación durante un subcultivo y no fue posible continuar con su análisis.

Los incrementos de la actividad enzimática de inhibidores de proteasas, polifenol oxidasa y peroxidasas en plantas de “tomate de cáscara” expuestas a herbivoría o tratadas con AJ (Medina-Andrade 2012) y el análisis de expresión de los genes aislados a partir de una biblioteca sustractiva de plantas sometidas a herbivoría por larvas de *Manduca sexta* (Quezada-Camargo 2015) indican que la respuesta defensiva presente en esta planta comparte elementos con la ruta de señalización mediada por sistemina en “jitomate”. De acuerdo con lo anterior, la respuesta defensiva de *Physalis philadelphica* involucra la regulación

mid pFGC5941 where what prevailed was an increase in prosystemin that was observed up to 12 h. As was expected, no increase in the levels of transcript were observed in the silenced calluses (SysFR-1), a finding that confirms the silencing of the gene of prosystemin (Figure 5a). The clone SysFR-2 was lost due to problems of contamination during the sub-culture, so it was not possible to continue with its analysis.

The increases in the enzymatic activity of the protease inhibitors, polyphenol oxidase and peroxidases in “tomatillo” plants exposed to herbivory or treated with JA (Medina-Andrade 2012) and the analysis of the expression of the genes isolated from a subtractive library of plants subjected to herbivory by the larvae of *Manduca sexta* (Quezada-Camargo 2015) indicate that the defensive response present in this plant shares elements with the systemin-mediated signaling pathway in “tomatillo”. Accordingly, the defensive response of *Physalis philadelphica* entails the positive regulation of genes that codify for trypsin, lipoxygenase and *threonine deaminase* inhibitors, among others. To determine whether accumulation of these genes depends on prosystemin levels in the plant, we decided to analyze their expression patterns in the silenced calluses. Unfortunately, it was not possible to determine the levels of any trypsin or *threonine deaminase* inhibitors, perhaps because the degree of differentiation present in the calluses did not favor their expression (data not shown). However, upon evaluating the expression of the *Lox* gene

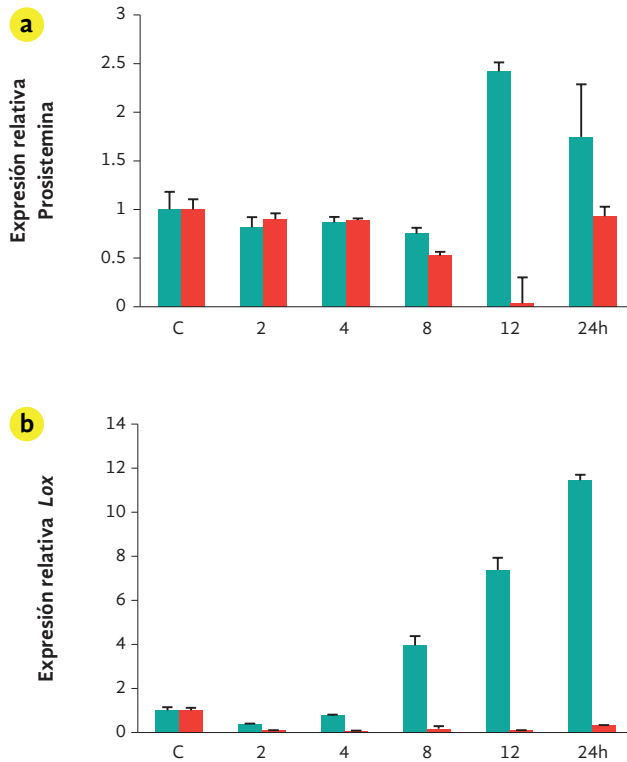


Figura 5. Cinéticas de expresión de los genes prosistemia (a) y lipoxigenasa (b) en callos de tomate de cáscara tratados con ácido jasmónico 1mM. *SysFR-1* (■): Clona transformada con la construcción de silenciamiento, pFGC5941 (■): Clona transformada con el plásmido vacío, C: Control (tratamiento 0h).

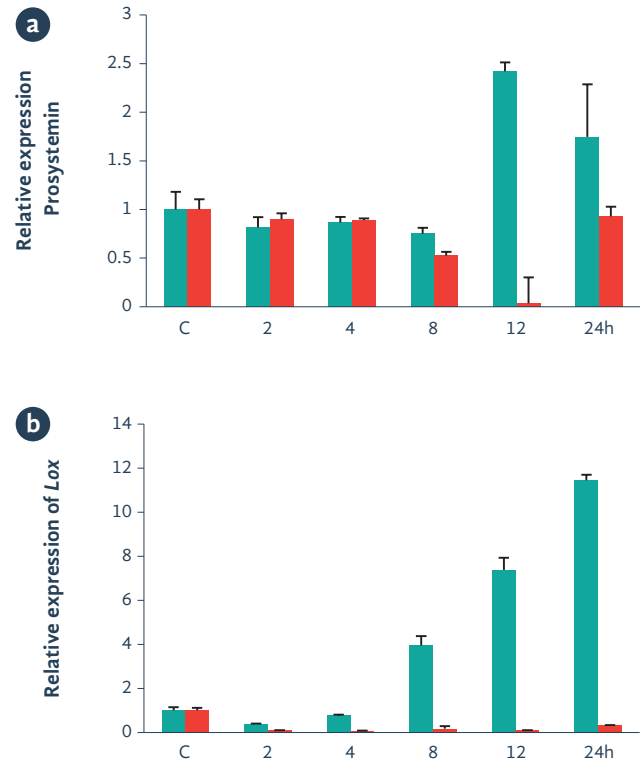


Figure 5. Kinetics of the expression of the prosystemin genes (a) and lipoxigenase (b) in calluses of tomatillo treated with 1mM of jasmonic acid. *SysFR-1* (■): Clone transformed with the silencing construction, pFGC5941 (■): Clone transformed with the empty plasmid, C: Control (0h treatment).

positiva de genes que codifican para inhibidores de tripsina, lipoxigenasa y treonina desaminasa, entre otros. Para determinar si la acumulación de estos genes depende de los niveles de prosistemia en la planta, se decidió analizar sus patrones de expresión en los callos silenciados. Infortunadamente, no fue posible determinar los niveles de ningún inhibidor de tripsina, ni de la treonina desaminasa, tal vez debido a que el grado de diferenciación presente en el callo no favorece su expresión (datos no mostrados). Sin embargo, al evaluar la expresión del gen *lox* que codifica para una lipoxigenasa indispensable e involucrada en la síntesis de AJ (Yan *et al.* 2013), se observó, exclusivamente en los callos transformados con el plásmido pFGC5941, un incremento de transcrito en respuesta a AJ, 8 h posteriores al estímulo (Figura 5b). La ausencia de mensajero en los callos silenciados (*SysFR-1*) confirma la regulación de la prosistemia en la expresión del gen *Lox* en *P. philadelphica*.

that codifies for a lipoxigenase that is indispensable for, and involved in, JA synthesis (Yan *et al.* 2013), the study found, only in the calluses transformed with the pFGC5941plasmid, an increase of the transcript in response to JA, 8 h after stimulation (Figure 5b). The absence of a messenger in the silenced calluses (*SysFR-1*) confirms the regulation of prosystemin in the expression of the *Lox* gene in *P. philadelphica*.

These observations allow us to suggest that the prosystemin present in “tomatillo” is functional and regulates defensive responses through JA, in a manner similar to the model posited for “tomato”, where the release and recognition of systemin promote accumulation of JA that, in turn, induces the expression of various genes that codify for a variety of related defense proteins (Ryan 2000). This suggestion is strengthened by identification of the systemin receptor (SR160) in the transcriptional analysis of plants of *Physalis philadelphica* exposed to treatments with JA (Mario Arteaga, pers. comm.).

Lo anterior permite sugerir que la prosistemina presente en tomate de cáscara es funcional y regula las respuestas defensivas a través del AJ, en forma similar al modelo planteado en “jitomate” donde la liberación y reconocimiento de sistemina promueve la acumulación de AJ, que a su vez induce la expresión de varios genes que codifican para una diversidad de proteínas de defensa relacionadas (Ryan 2000). Esta sugerencia se fortalece por la identificación del receptor de la sistemina (SR160) en el análisis transcripcional de plantas de *Physalis philadelphica* expuestas a tratamientos con AJ (Mario Arteaga, comunicación personal).

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACyT por el financiamiento otorgado (Proyecto CB-83859) y por la beca otorgada a MFES (No. 273962). ❖

Acknowledgments

The authors thank CONACyT for the funding provided (Proyecto CB-83859) and the scholarship granted to MFES (No. 273962). ❖

Bibliografía | Bibliography

ANDRADE-MEDINA MARIANA. 2012.

Determinación de la actividad de proteínas de defensa en tomate de cáscara (*Physalis philadelphica* Lam.) y su inducción por herbivoría, daño mecánico y moléculas señales. Director: Carla Vanessa Sánchez Hernández. Tesis Licenciatura en Biología. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

ASSAD-GARCÍA, N., N. OCHOA-ALEJO, E. GARCÍA-HERNÁNDEZ, L. HERRERA-ESTRELLA & J. SIMPSON. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem.) and tissue specific and developmental

expression of the CaMV 35S promoter in transgenic tomatillo plants. *Plant Cell Reports* **1**: 558–562. [ISSN (Print) 0721-7714; (Online) 1432-203X]

CONSTABEL, C.P., L. YIP & C.A. RYAN. 1998. Prosystemin from potato, black nightshade, and bell pepper: primary structure and biological activity of predicted systemin polypeptides. *Plant Molecular Biology* **36**: 55–62. [ISSN (Print) 0167-4412; (Online) 1573-5028]

DELLAPORTA, S.L., J. WOOD & J.B. HICKS. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**: 19–21. [ISSN: 0735-9640]

LI, L., C. LI & G.A. HOWE. 2001. Genetic analysis of wound sig-

naling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. *Plant Physiology* **127**: 1414–1417. [ISSN: 0032-0889]

LI, L., C. LI, G.I. LEE & G.A. HOWE. 2002. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemin wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**: 6416–6421. [ISSN: 0027-8424]

LIVAK, K.J. & T.D. SCHMITTGEN. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* **25**: 402–408. [(ISBN: 978-0-12-181887-6)]

MARTÍNEZ-OCEGUERA, J.M., R. GUTIÉRREZ-CAMPOS & E. GARCÍA-PINEDA. 2006. Transfor-

- mación de plantas de tomate verde (*Physalis ixocarpa* var. *rendidora*) con el gen *oc-I* (Orizacistatina I). *Revista Mexicana de Fitopatología* **24**: 13–19. [ISSN: 0185-3309]
- MCGURL, B., M. OROZCO-CARDENAS, G. PEARCE & C.A. RYAN. 1994.** Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**: 9799–9802. [ISSN: 0027–8424]
- MCGURL, B., G. PEARCE, M. OROZCO-CARDENAS & C.A. RYAN. 1992.** Structure, expression and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* **255**: 1570–1573. [ISSN: 0036-8075]
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962.** A revised medium for growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497. [ISSN: 1399-3054]
- OROZCO-CARDENAS, M., B. MCGURL & C.A. RYAN. 1993.** Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 8273–8276. [ISSN: 0027-8424]
- PEARCE, G. & C.A. RYAN. 2003.** Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 30044–30050. [ISSN (Print) 0021-9258; (Online) 1083-351X]
- PEARCE, G., D. STRYDOM, S. JOHNSON & C.A. RYAN. 1991.** A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**: 895–898. [ISSN: 0036-8075]
- QUEZADA-CAMARGO VÍCTOR URIEL. 2015.** Análisis de la expresión de genes implicados en defensa de *Physalis philadelphica* en respuesta a herbivoría y ácido jasmónico. Director: Carla Vanessa Sánchez Hernández. Tesis Licenciatura en Biología. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
- ROSALES-CAMPOS, A.L., J. SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. DÉLANO-FRIER & C. SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ. 2008.** Identificación del gen de la prosistemina en *Physalis ixocarpa*. En: Carvajal, Servando & Enrique Pimienta Barrios (eds.), *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA* (Zapopan, Jalisco, 24–28 de noviembre de 2008). Universidad de Guadalajara. Pp. 71–74. [ISBN: 978-607-00-2083-4]
- RYAN, C.A. 2000.** Review: The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**: 112–121. [ISSN: 0006-3002]
- SCHILLMILLER, A. & G. HOWE. 2005.** Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 369–377. [ISSN (Print) 1369-5266; (Online) 1879-0356 (Electronic) 1369-5266].
- SCHMIDT, S. & I.T. BALDWIN. 2006.** Systemin in *Solanum nigrum*. The tomato-homologous polypeptide does not mediate direct defense responses. *Plant Physiology* **142**: 1751–1758. [ISSN: 0032-0889]
- SUN, J.Q., H.L. JIANG & C.Y. LI. 2011.** Review: Systemin/Jasmonate-mediated systemin defense signaling in tomato. *Molecular Plant* **4**: 607–615. [ISSN: 1752-9867]
- WAR, A.R., M.G. PAULRAJ, T. AHMAD, A.A. BUHROO, B. HUSSAIN, S. IGNACIMUTHU & H.C. SHARMA. 2012.** Mechanism of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal and Behavior* **7**: 1306–1320. [ISSN: 1559-2324]
- YAN, L., Q. ZHAI, J. WEI, S. LI, B. WANG, T. HUANG, M. DU, J. SUN, L. KANG, C.B. LI & C. LI. 2013.** Role of tomato lipoxigenase D in wound-induced jasmonate biosynthesis and plant immunity to insect herbivores. *PLOS Genetics* **9**: e1003964. [ISSN (Print) 1553-7390; (Online) 1553-7404]