

## Evidencias bioquímicas y moleculares de la presencia de un péptido natriurético de plantas en ajo (*Allium sativum* L.)

### Biochemical and molecular evidences of the presence of a plant natriuretic peptide in garlic (*Allium sativum* L.)

Valle-Rodríguez CM<sup>1</sup>, S Valdés-Rodríguez<sup>2</sup>, NL Vasco-Méndez<sup>1</sup>, C Garcidueñas-Piña<sup>1</sup>, RE Soria-Guerra<sup>3</sup>, JF Morales-Domínguez<sup>1</sup>

**Resumen.** Los péptidos natriuréticos (PN) son hormonas de vertebrados involucradas en la regulación de la homeostasis de iones y agua en la célula. En plantas, también se han identificado péptidos natriuréticos por métodos bioquímicos y moleculares. Los péptidos natriuréticos en plantas (PNPs) tienen funciones similares a los PN, ya que median el transporte de iones a través de la célula, la apertura y cierre de canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> por la estimulación y síntesis de Guanosín monofosfato cíclico (GMPc), y están involucrados en la apertura de los estomas. En este estudio, se identificó mediante PCR un fragmento que codifica para un PNP de ajo (*Allium sativum* L.), al que se le denominó *AsPNP* y mostró una similitud del 96% con el *AtPNP-A* de *Arabidopsis thaliana*. La secuencia deducida de *AsPNP*, mostró la presencia de cuatro cisteínas y el motivo K [VI] VD altamente conservado en PNP. El modelado de *AsPNP* mostró una estructura tridimensional similar a *AtPNP-A* y al dominio I de las expansinas. Mediante PCR en tiempo real se identificaron dos posibles copias de este gen en ajo. El análisis de inmunodetección con anticuerpos dirigidos a receptores de PN de células humanas, sugiere la presencia de receptores similares en hojas de ajo. Además, se encontró que una fracción proteica de hojas de ajo purificada por cromatografía de intercambio iónico fue capaz de estimular la apertura de los estomas en cutículas de *Opuntia ficus-indica*. Todas estas evidencias demuestran la presencia de péptidos natriuréticos en plantas de ajo.

**Palabras clave:** Péptido natriurético; *Allium sativum* L.; Estomas; Cromatografía de intercambio iónico; Inmunodetección.

**Abstract.** The natriuretic peptides (NP) are vertebrate hormones involved in the regulation of ion and water homeostasis in the cell. In plants, natriuretic peptides (PNP) have been identified by molecular and biochemical methods. It has been suggested that PNP, have similar functions to the PN, since they mediate (1) ion transport through the cell, (2) the opening and closing of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels through the stimulation and synthesis of a second messenger such as cGMP, and (3) the aperture of stomata. In this study, a PNP gene was partially identified by PCR in garlic (*Allium sativum* L.), which was called *AsPNP*, and showed a similarity of 96% with the *AtPNP-A* of *Arabidopsis thaliana*. The deduced amino acid sequence of *AsPNP* displayed four cysteine and the highly conserved reason (i.e., K [VI] VD) in PNP. The modelling of *AsPNP* in amino acids showed a three-dimensional structure similar to *AtPNP-A* and to the domain I of expansins. The real-time PCR analysis identified at least two possible copies of this gene in garlic. The immunodetection with antibodies directed to human NP receptors suggests the presence of similar receptors in garlic leaves. It was also found that a protein fraction purified by ion exchange chromatography from garlic leaves was able to stimulate stomatal opening in cuticles of *Opuntia ficus-indica*. These evidences demonstrate the presence of NP in garlic plants.

**Keywords:** Natriuretic peptide; *Allium sativum* L.; Stomatal; Ion exchange chromatography; Immunoblotting.

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Química, Av. Universidad 940 C.P. 20131, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, México Tel. 52 (449) 910-74-00 Ext. 8420.

<sup>2</sup> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Km. 9.6 Libramiento Norte, Carretera Irapuato-León, CP 36821, Irapuato Guanajuato, México.

<sup>3</sup> Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Biotecnología Molecular. Av. Dr. Nava #6 Zona Universitaria CP 78200 San Luis Potosí, SLP, México Tel. 52 (444) 8 26 23-00, Ext 6431.

Address correspondence to: José Francisco Morales Domínguez; e-mail: jfmoral@correo.uaa.mx

Received 5.VI.2015. Accepted 14.II.2016.

## INTRODUCCIÓN

Los péptidos natriuréticos (PN) son hormonas y en vertebrados participan en la regulación de la homeostasis de sales y agua en la célula, y en el control de la presión arterial (Patel et al., 2005). La primera evidencia de la presencia de péptidos natriuréticos en plantas (PNPs) surgió a través de radioinmuno ensayos en los cuales anticuerpos dirigidos contra péptidos natriuréticos tipo A de humanos (PNAh) dieron reacción positiva en extractos de plantas de *Dracena gossypifolia* (Vesely y Giordano, 1991; Vesely et al., 1993). Posteriormente Billington et al. (1997) aislaron y purificaron un PNP en *Hedera helix*. En trabajos posteriores se demostró que la aplicación del péptido natriurético tipo A de rata (PNAr) en hojas de *Tradescantia albiflora* inducía la apertura de los estomas (Pharmawati et al., 2001). Este mismo efecto también se observó al utilizar proteínas recombinantes de PNPs de *Xanthomonas axonopodis* (Gottig et al., 2008). Ludidi et al. (2002), utilizando técnicas de biología molecular, identificaron dos genes y los transcritos que codifican para PNPs en *Arabidopsis thaliana*.

Estudios bioinformáticos han demostrado que los PNPs pertenecen a una nueva clase de moléculas, que comparten cierta similitud estructural con el dominio I de las expansinas (Kende et al., 2004). Las expansinas están implicadas en la modificación de la pared celular (Sampedro et al., 2006), mientras que los PNPs actúan en varias respuestas fisiológicas de las células y tejidos tales como: a) movimientos radiales del agua fuera del xilema, b) activación de la ATPasa de protones, c) aumento en el volumen de protoplastos, d) incremento transitorio de GMPc, e) incremento de flujo iónico de H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>, y f) apertura de las células guarda de los estomas a concentraciones nanomolares (Maryani et al., 2001; Gehring e Irving 2003; Ruzvidzo et al., 2011).

Los PNPs juegan un papel similar en la célula vegetal tal como lo hacen los PN en vertebrados. Considerando que el ajo tiene una amplia gama de aplicaciones medicinales, entre ellas la antihipertensiva, es posible que este efecto en parte sea mediado por péptidos natriuréticos. La identificación de este tipo de péptidos y sus genes en ajo plantea la posibilidad de obtener proteínas recombinantes para su futura utilización en el campo de las ciencias de la salud y en la Biotecnología.

En este trabajo se presentan evidencias de la presencia de péptidos natriuréticos en ajo. Por un lado, se logró la identificación y aislamiento de una secuencia nucleotídica parcial que codifica para un PNP, de la cual al parecer existen 2 copias en ajo. Por otra parte, se detectó la presencia de receptores de péptidos natriuréticos en hojas de ajo y se demostró que una fracción proteica parcialmente purificada, es capaz de inducir la apertura de estomas en cutículas de *Opuntia ficus-indica*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Las hojas y bulbos de ajo de la variedad tipo perla fueron donadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agricultura (INIFAP-Unidad Aguascalientes-México). Las plantas de *Opuntia ficus-indica* fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

**Extracción de ADN y amplificación mediante PCR.** Muestras de hojas frescas de ajo fueron congeladas con nitrógeno líquido y posteriormente pulverizadas en mortero. La extracción de ADN fue acorde al protocolo de Lodhi et al. (1994), con algunas modificaciones hechas en el laboratorio. El diseño de los oligonucleótidos fue en base a la secuencia de nucleótido de *AtPNP-A* (AAD08935) utilizando el programa DNASTAR Inc., Madison, WI, USA. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como iniciadores en la reacción de la PCR fueron: F-5'ATGGCAGTAAAATTTGTGGTAG-3' y R-5'CATATCCTGCAGAAGAAAAGAAA-3'. Los parámetros de la amplificación fueron: una pre-desnaturalización a 94 °C por 4 min, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 60s, 50 °C por 60s, 72 °C por 60s, y finalmente una extensión a 72 °C por 10 min. El producto amplificado fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta. La banda amplificada fue recuperada del gel, purificada con el sistema Wizard® (Promega), y clonada en el vector pGEM®-T Easy (Promega) para su secuenciación.

**Análisis bioinformático.** A la secuencia parcial de nucleótidos del producto de la PCR se le nombró *AsPNP* y fue analizada para buscar homólogos en la base de datos del NCBI usando el algoritmo BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>] (Altschul et al., 1990). La secuencia de aminoácidos deducida de *AsPNP* y *AtPNP-A* fue obtenida utilizando la plataforma bioinformática ExPASy (<http://www.expasy.org>) mediante la herramienta Translate. La búsqueda de los dominios conservados se realizó mediante la plataforma de CDART de la NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>] (Geer et al., 2002). El modelado estructural de las secuencias de aminoácidos se realizó mediante dos programas: 1) CPHModels-3.2 [<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>] para obtener el archivo en PDB (Nielsen et al., 2010), y 2) el programa Chimera 1.8 [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>] para obtener el modelo tridimensional (Pettersen et al., 2004). Las secuencias de aminoácidos de *AtPNP-A* de *Arabidopsis thaliana* (AAD08935),  $\beta$ -expansina de maíz (acceso al PDB: 2HCZ) y *AsPNP* de ajo fueron usadas para el modelado.

**Evaluación del número de copias del gen mediante PCR en tiempo real.** Las muestras de ADN se diluyeron con agua

estéril Milli Q antes de su uso en las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real. Todas las reacciones se prepararon por triplicado y se realizaron en una placa de grado óptico de 48 pocillos con el sistema StepOne™ (Applied Biosystems, Mulgrave, VIC, Australia), ADN de doble cadena y SYBR Green para el marcado. Cada reacción contenía 10 µL de reactivo SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 100 ng de ADN genómico y 0,5 pmoles de cada oligonucleótido en un volumen final de 20 µL. Para la PCR se utilizaron las siguientes condiciones: 95 °C 10 min, 30 ciclos de 95 °C durante 15 s, 50 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min, 1 ciclo de 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 15 s, y 95 °C durante 15s. Los datos fueron analizados con el programa Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los datos de referencia se obtuvieron de los ciclos 1-30. Los gráficos de amplificación ( $\Delta R_n$  vs. ciclo) se analizaron con un umbral de 0.04  $R_n$  para obtener todo el valor del ciclo umbral ( $C_t$ ). La eficiencia de la PCR se calculó utilizando el mismo software. El índice del número de copias de genes (GCI) para cada muestra se obtuvo mediante la siguiente fórmula:  $GCI = \frac{Eff^{Ref^{Ct}}}{Eff^{Ct}}$  (Shepherd et al., 2009; Casu et al., 2012). Donde GCI es el índice de número de copias de genes,  $Eff^{Ref^{Ct}}$  es la eficiencia de la PCR obtenida usando oligonucleótidos de un gen de referencia (gen de actina) a la potencia del valor  $C_t$  generado a partir del gen de referencia para cada muestra, y  $Eff^{Ct}$ =eficiencia de la PCR utilizando los oligonucleótidos para el gen del ensayo (PNP) a la potencia del valor  $C_t$  generado a partir del gen de ensayo para cada muestra.

#### Extracción, cuantificación e identificación de proteínas.

Hojas de plantas de ajo (100 g) se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se colocó en buffer de fosfatos ( $Na_2HPO_4$  0,01 M,  $KH_2PO_4$  0,01 M, pH 7,0) con agitación continua durante 12 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante se recuperó por centrifugación a 6000xg durante 20 min y las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio al 80% de saturación incubando durante 12 h a 4 °C. El precipitado recuperado por centrifugación se resuspendió en agua y se dializó en una membrana de celulosa (Spectra / Por 3000 MWCO) contra agua desionizada durante 24 h a 4 °C. El extracto proteico obtenido se colocó en una cámara de microdiálisis BbRL (Bethesda Research Laboratories) provisto con una membrana de celulosa (Spectra / Por MWCO 500) y se dializó con agua desionizada hasta que la conductividad del extracto de proteína y el agua desionizada fue la misma. Para la extracción de proteínas de *A. thaliana* se siguió el mismo procedimiento. En ambos extractos se cuantificó la proteína con el sistema DC Protein Assay (BioRad MR) y se analizaron por electroforesis en geles al 13% (p/v) de poli(acrilamida)-SDS en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol de acuerdo al protocolo de Laemmli (1970). Las proteínas se visualizaron en los geles tiñendo con azul de Coomassie durante 12 h y destiñendo posteriormente con solución decolorante (ácido acético-metanol proporción 1:4) durante 2 h. El gel se analizó en un transiluminador de luz blanca marca CIIASA.

**Obtención de fracciones proteicas.** El extracto de proteínas (120 mg de proteína) de hojas de ajo se fraccionó en columnas de intercambio iónico de 50 mL (2,5 cm diam. x 10,0 cm), marca Macro-Prep High Q y Macro prep High S (BioRad), conectadas en serie y previamente equilibradas con buffer trishidroximetil aminometano 0,01 M pH 8,0 con un flujo de 0,5 mL/min. Después de pasar el extracto, las columnas se desconectaron y se lavaron con buffer Tris 0,01M y la elución de proteínas se realizó secuencialmente utilizando concentraciones crecientes de 0,25 M, 0,50 M, 0,75 M y 1 M de KCl, disuelto en el buffer de corrida Tris 0,01M pH 8. La separación se realizó a temperatura ambiente colectando 50 fracciones de 1 mL a las cuales se les determinó su absorbancia a 214 y 280 nm, en un espectrofotómetro DU-5 marca Beckman. Las fracciones obtenidas fueron dializadas exhaustivamente contra agua desionizada en una cámara de micro diálisis marca BRL Bethesda provista con una membrana O500 Spectra/Por de Celulosa-éster. Las muestras desaladas, se liofilizaron y se cuantificó el contenido de proteína mediante el método de Bradford y posteriormente se utilizaron para evaluar su efecto sobre la apertura de estomas en cutículas de *Opuntia ficus-indica*.

**Análisis de inmunodetección para receptores.** Se realizó la inmunodetección de receptores de péptidos natriuréticos en un extracto crudo de proteínas de hojas de ajo con un anticuerpo dirigido contra receptores de PN de humano [Anti-ANPA (C-term; Sigma-Aldrich)]; como controles positivos se incluyeron secreciones de la mosca (*Lucilia sericata*) y suero humano. Para esto, alícuotas de 10 µL (0,10 mg) de cada muestra se colocaron en una membrana de nitrocelulosa BioRad y se dejaron secar por 10 min. Posteriormente, la membrana se lavó con solución TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5) durante 10 min, y se colocó en solución bloqueadora (leche en polvo marca comercial Nestle Svelty al 5% y seroalbúmina bovina 1% en TBS) durante 1 h en agitación suave. Después de lavar 2 veces durante 10 min con solución TBS-T (Tris buffer salino con tween 20), se incubó 12 h a 4 °C con agitación continua en la solución TBS que contenía el primer anticuerpo Anti-ANPA (C-term) de Sigma-Aldrich, en la concentración recomendada por el fabricante. Al día siguiente, la membrana se lavó cuatro veces durante 10 min con solución TBS-T, y se incubó durante 1 h en TBS con el segundo anticuerpo "Goat Anti-Rabbit IGG" (whole molecule) conjugado a fosfatasa alcalina, de Sigma Aldrich de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después, la membrana se lavó 3 veces durante 10 min con solución TBS-T, y tres veces con TBS y se reveló con solución de nitrozol de tetrazolio / 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (SIGMA FAST™ BCIP / NBT Sigma Aldrich) siguiendo las indicaciones del fabricante.

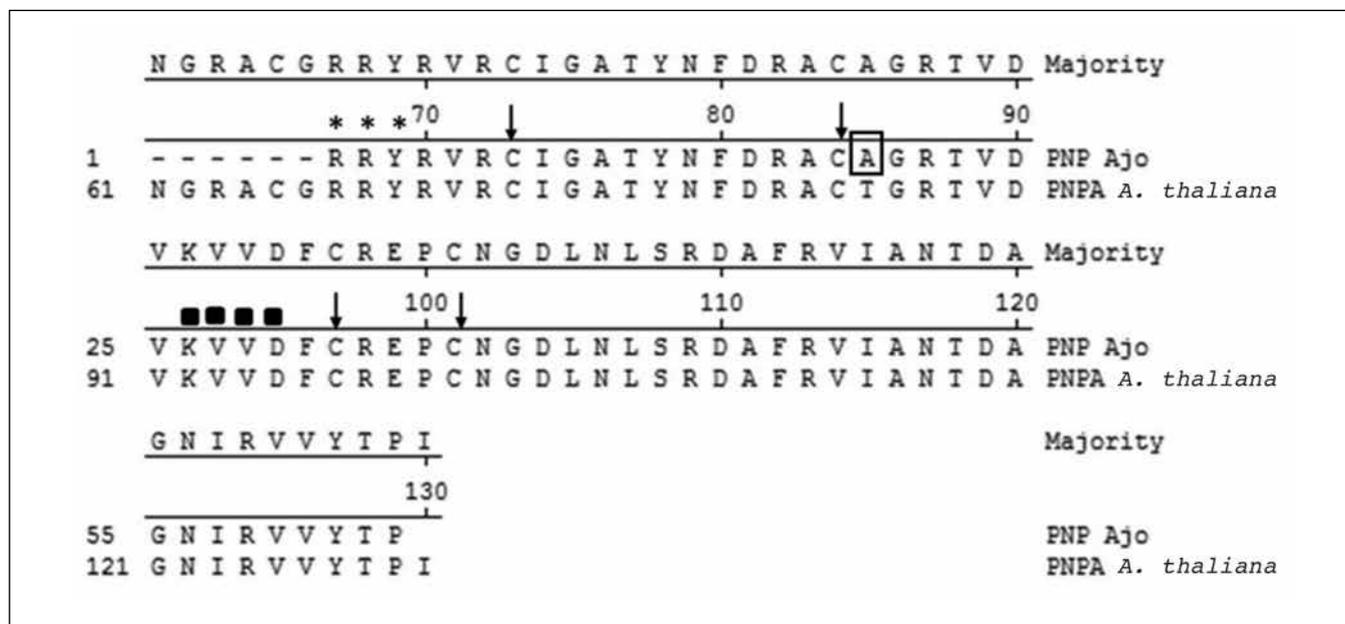
**Actividad biológica de PNP en la apertura estomática de *Opuntia ficus-indica*.** En cada experimento se utilizaron 3 cutículas de *Opuntia ficus-indica* las cuales fueron expues-

tas a concentraciones de 0,01; 0,1 y 1,0 mg/mL de proteínas fraccionadas por intercambio iónico y proteínas totales de ajo, y 0,25 mg/mL del anticuerpo de origen humano Anti-ANP (C-term) de Sigma-Aldrich. Se utilizó como control positivo una solución 100  $\mu$ M de ácido indol acético y se analizó la respuesta de las cutículas cada 5 min durante 15 min. Para esto, se hicieron observaciones al microscopio y se midió la apertura de poro de 20 estomas por cada cutícula con un micrómetro ocular calibrado. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de una vía para establecer diferencias entre los tratamientos utilizando el programa estadístico Minitab 16. Las muestras fueron fotografiadas en un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL 5000 LV.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

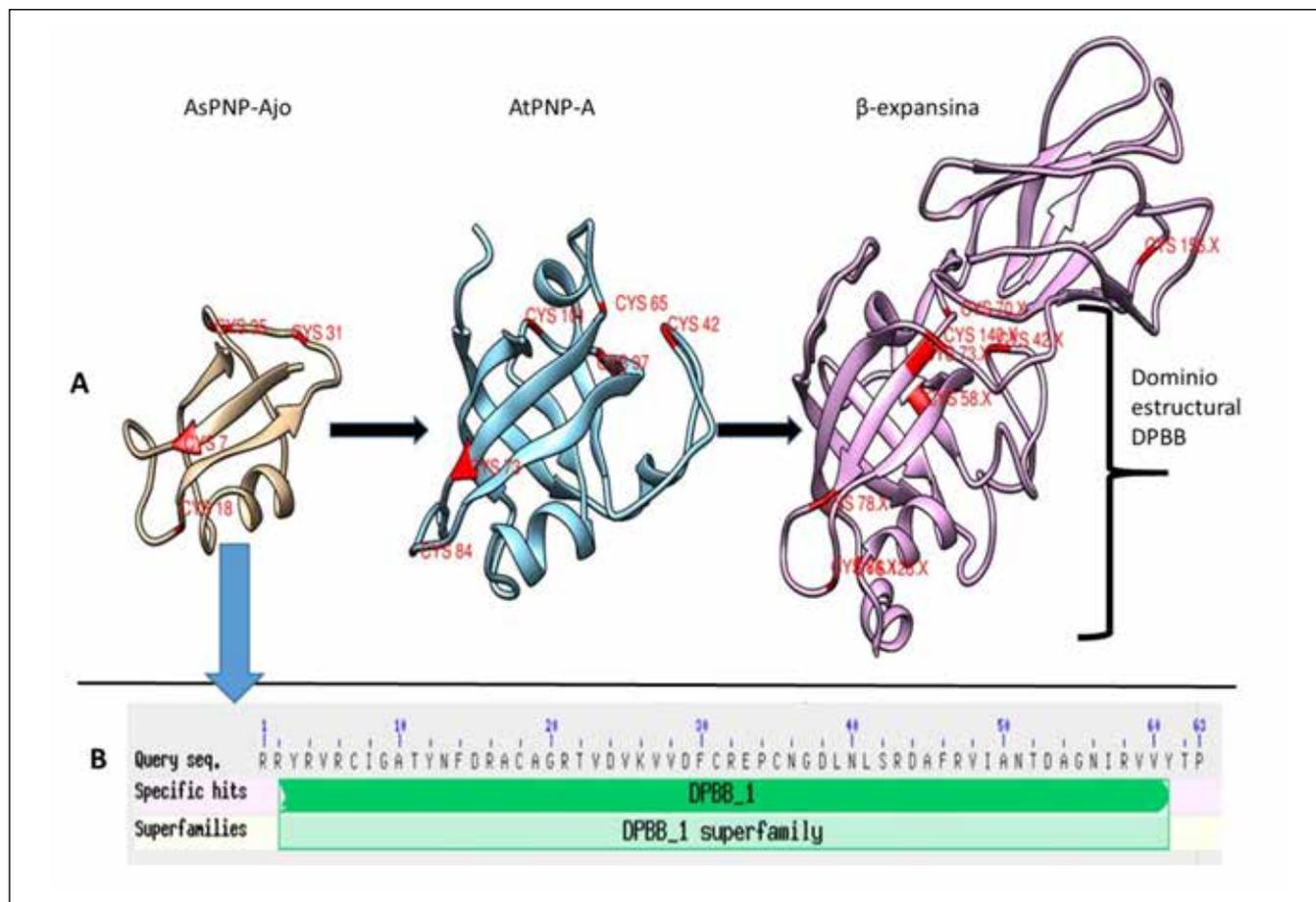
Mediante PCR se logró amplificar una secuencia nucleotídica de 231 pb la cual codifica para una parte de un péptido natriurético de plantas (PNPs) en ajo. Esta secuencia denominada *AsPNP* mostró una identidad del 95% con *AtPNP-A* de *Arabidopsis thaliana*. La traducción virtual de *AsPNP* predijo 63 residuos de aminoácidos y mostró tres aminoácidos RRY hacia el amino terminal. Estos forman parte de una región conservada de 34 aminoácidos en *AtPNP-A* y el péptido natriurético A de humano (PNAh), que se ha postulado como responsable de la actividad homeostática (Fig. 1) (Meier et al., 2008). Esto plantea la posibilidad de aislar el gen completo

de *AsPNP*, y evaluar la importancia de esta secuencia en los efectos atribuidos al ajo. Además, nuestra secuencia muestra cuatro de los seis residuos de cisteínas presentes y el motivo K [VI] VD altamente conservado en PNPs (Fig. 1). Estos resultados son similares a los reportados por Ludidi et al. (2002), quienes realizaron un alineamiento múltiple de secuencias de PNPs y expansinas, y postularon que una glucanasa ancestral dio origen a las expansinas y PNPs. Las expansinas modificaron su sitio catalítico aunque mantuvieron los dominios catalíticos y de unión a carbohidratos de las glucanasas, (Kende et al., 2004; Sampedro et al., 2006, Kerff et al., 2008). En cambio los PNPs que conservaron el plegamiento tipo doble- $\Psi$ - $\beta$ -barrel (DPBB) que presentan las glucanasas, perdieron ambos dominios por un proceso evolutivo, lo cual dio como resultado que sean proteínas móviles, sin unión a polisacáridos y con una función diferente (Gehring et al., 2003; Morse et al., 2004). La estructura doble- $\Psi$ - $\beta$ -barrel (DPBB) consiste de un barril beta formado por 6 láminas envolventes en la cual cada estructura psi consiste de las asas que unen a 3 láminas beta (Interpro database <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR009009>). Para verificar si *AsPNP* mostraba un plegamiento similar al DPBB se realizó primeramente la búsqueda de dominios conservados en el servidor de la NCBI donde se verificó que esta región parcial cuenta con este plegamiento (Fig. 2B). Por otra parte, el modelado tridimensional de la secuencia de aminoácidos deducida de *AsPNP* muestra sólo una estructura psi determinada por sólo 3 láminas beta, la cual



**Fig. 1.** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de PNPs. (A) se muestra el alineamiento de la traducción virtual de la secuencia parcial de *AsPNP* (ajo), con un fragmento de *AtPNPA*. El asterisco (\*) significa aminoácidos conservados entre ambas secuencias y PNAh, las flechas (↓) las cisteínas presentes y los cuadrados sólidos (■) uno de los dos motivos conservados en los PNPs.

**Fig. 1.** Alignment of sequences of amino acids of PNPs. (A) Alignment of the virtual translation of the partial sequence of *AsPNP* (garlic), with a fragment of *AtPNPA* is shown. The asterisk (\*) means amino acids conserved between both sequences and PNAh, arrows (↓) represent cysteines, and solid squares (■) are one of the two motifs in the PNPs.



**Fig. 2.** Modelado de PNPs y una β-expansina. (A) Las figuras representan el modelado estructural con el dominio DPBB presente en: AsPNP (ajo), AtPNP-A (*A. thaliana*) y β-expansina de Maíz (2HCZ; del PDB). En rojo se presentan las cisteínas conservadas. (B) Gráfica donde se muestra el dominio DPBB en la secuencia parcial de ajo obtenida mediante CDART del NCBI.

**Fig. 2.** Modeling of PNPs and a β-expansin. (A) Figures represent the structural modeling with domain DPBB present in: AsPNP (garlic), AtPNP-A (*A. thaliana*) and β-expansina of maize (2HCZ; the PDB). The conserved cysteines are in red. (B) Graphic showing the DPBB domain in the partial sequence of garlic by the CDART software of NCBI.

corresponde a parte de la estructura DPBB que se encuentra en AtPNP-A y en el dominio I de las expansinas (Fig. 2A).

**Número de copias.** Mediante el PCRq en tiempo real cuantitativo se estimó el número aproximado de copias de *AsPNP*, tomando como referente el gen de actina de ajo (AY821677.1). Este gen se ha tomado como referente para análisis de expresión de varios genes en ajo (Zhang et al., 2004), y en el número de copias en diferentes genomas de plantas. Los resultados de la Tabla 1 indican que posiblemente existan dos copias o parálogos. Estos resultados son similares a los reportados por Ludidi et al. (2002) quienes identificaron dos genes de PNPs en *A. thaliana*: *AtPNP-A* (AAD08935) y *AtPNP-B* (CAB79756), cuya función no ha sido todavía bien estudiada. Por otro lado, Wang et al. (2011) mencionan que ambos genes de PNPs en *A. thaliana*, juegan un papel impor-

**Tabla 1.** Número de copias del gen *AsPNP* basado en el índice numérico de copias (GCI) del gen de referencia actina.

El GCI fue obtenido mediante la fórmula:  $GCI = \frac{Eff^{RefCt}}{Eff^{Ct}}$  como se describe en Materiales y Métodos. Ct: número de ciclos.

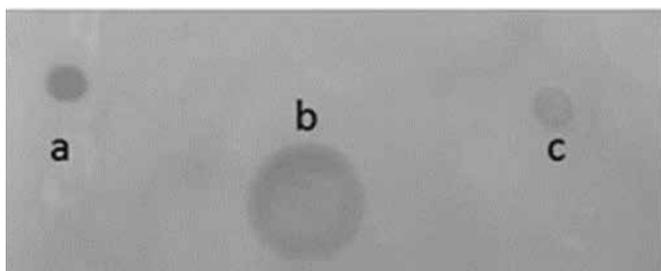
**Table 1.** Number of copies of the *AsPNP* gene based on the numerical index (GCI) copies of reference actin gene.

The GCI was obtained using the formula:  $GCI = \frac{Eff^{RefCt}}{Eff^{Ct}}$  as described in Materials and Methods. Ct: number of cycles.

PCR de eficiencia para el gen de actina	90,2%
PCR de eficiencia para el gen de <i>AsPNP</i>	92,5%
Ct para el gen de actina	25,32
Ct para el gen de <i>AsPNP</i>	24,53
$GCI = \frac{Eff^{RefCt}}{Eff^{Ct}}$	2,1
<b>Número de copias estimado para el gen de <i>AsPNP</i></b>	<b>2</b>

tante en la regulación de la homeostasis ante estrés bióticos y abióticos, y que *AtPNP-A* esta involucrado en la apertura de los estomas (Meier et al., 2008).

**Identificación de receptores para PNPs en ajo detectados con anticuerpos de origen humano.** Para comprobar la presencia de receptores homólogos a  $PN_h$  en hojas de ajo, se realizó una inmunodetección utilizando anticuerpos de origen humano. En la Figura 3 se observa señal positiva para las muestras de extractos proteicos de ajo, suero humano y secreciones de *Lucilia sericata*. Esto indica que este tipo de péptidos está altamente conservado en diferentes especies en los reinos animal y vegetal, tal como lo ha descrito Takei et al. (2001). Estos resultados demuestran la presencia de receptores de PNPs que son homólogos en ajo tal como lo reportado en otros trabajos. Asimismo, Gehring et al. (1996) y Suwastika et al. (2000) también demostraron que un receptor de un PN de rata (rPNA) marcado con el radioisótopo  $^{125}I$  ( $^{125}I$ -rPNA) se

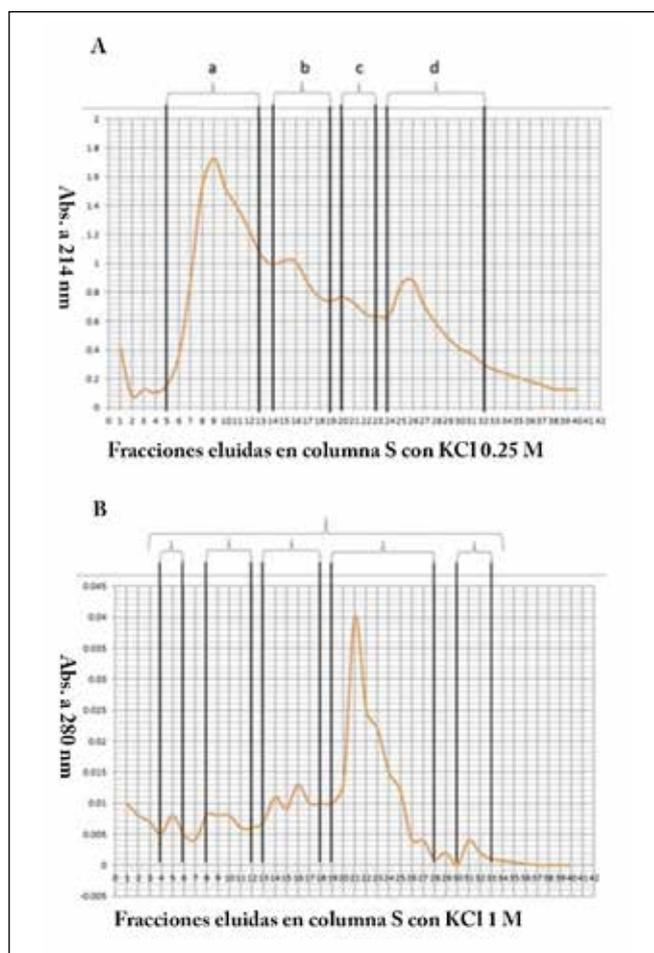


**Fig. 3.** Inmunodetección de posibles receptores de PNPs en ajo. A; (a) extractos totales de proteínas de ajo, (b) suero Humano y (c) extractos de proteínas de *Lucilia sericata*. Se observa señal positiva en todas las muestras, indicando la posible detección de receptores para PNPs.

**Fig. 3.** Immunodetection of potential receptors of PNPs in garlic. A; (a) total extracts of garlic proteins, (b) human serum, and (c) *Lucilia sericata* protein extracts. Positive signal are shown in all samples, indicating the possible detection of receptors for PNPs.

puede unir a las membranas plasmáticas aisladas de las hojas y tallo de *Tradescantia albiflora*, y que tanto el rPNA como un PNP pueden actuar de manera competitiva desplazándose uno a otro.

**Fraccionamiento de proteínas de ajo por Cromatografía de intercambio iónico.** Un extracto crudo de proteínas de hojas de ajo se fraccionó por intercambio iónico con columnas intercambiadoras de cationes y aniones. De la columna Macro prep High Q (intercambiadora de aniones) se eluyó muy poca proteína. En cambio, de la columna Macro prep High S (intercambiadora de cationes) se eluyeron diferentes fracciones con KCl 0,25 y 1M. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 4 en la que se puede observar que se recuperaron 4 fracciones de la elución con KCL 0.25M las cuales se denominaron a, b, c y d. Si bien con KCL 1M se



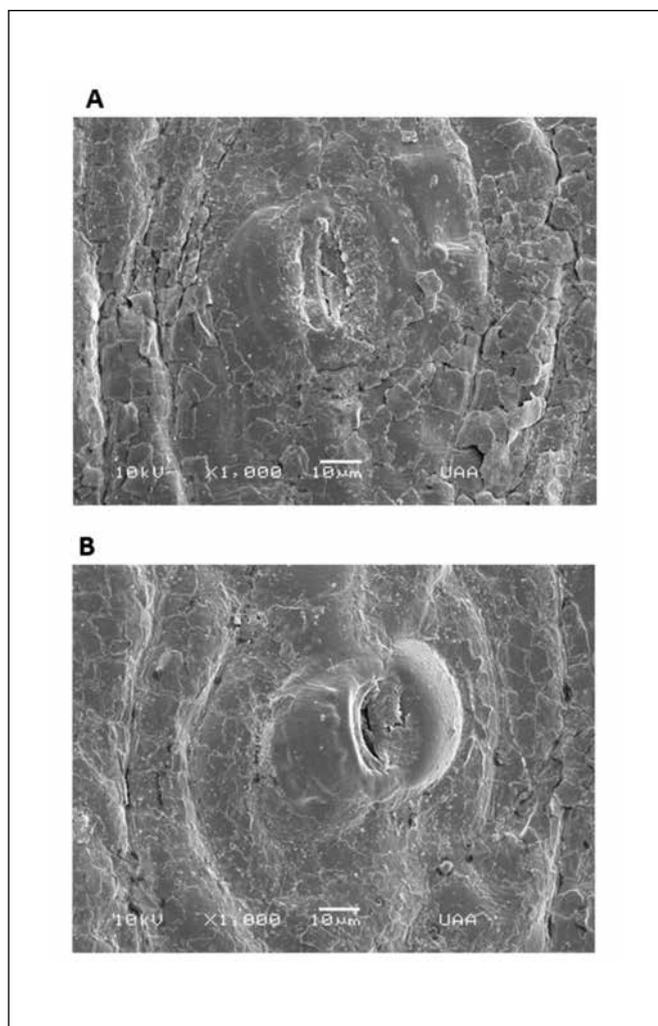
**Fig. 4.** Cromatograma de las fracciones eluidas de la columna Macro prep High S. Después de pasar un extracto crudo de proteínas de hojas de ajo (120 mg), se lavó la columna (2,5 x 10 cm) y las proteínas se eluyeron secuencialmente con diferentes concentraciones de KCL. (A) KCl 0,25M, (B) KCl 1M. Se colectaron fracciones de 1 mL y se leyó su absorbancia a 214 y/o 280 nm.

**Fig. 4.** Chromatogram of the fractions eluted from the column Macro prep High S. After passing a crude extract of proteins from leaves of garlic (120 mg), the column was washed (2.5 x 10 cm) and proteins were eluted sequentially with different concentrations of KCL. (A) KCl 0.25 M, (B) KCl 1 M. Fractions of 1 mL were collected and their absorbance was read at 214 or 280 nm.

recuperaron 6 fracciones como se muestra en la Figura 4B, los valores de absorbancia de cada fracción fueron muy bajos, y para evaluar su actividad biológica se volvieron a juntar (fracción e). Después de dializar las fracciones obtenidas se liofilizaron y se resuspendieron en agua desionizada.

**Fracciones proteicas de ajo promueven la apertura de estomas de *Opuntia ficus-indica*.** De las fracciones obtenidas por intercambio iónico se prepararon soluciones de diferentes concentraciones (0,001; 0,01 y 1,0 mg de proteína/mL) y se aplicaron a las cutículas de *Opuntia ficus-indica*. Los resultados

obtenidos indican que la fracción "a" fue capaz de promover la apertura de los estomas (Fig. 5). La concentración de 0,001 mg/mL durante 5 minutos permitió observar una máxima apertura de las células guarda de los estomas en comparación a las otras concentraciones. La Figura 5A muestra la fotografía al microscopio electrónico de barrido de un estoma cerrado sin la aplicación de ninguna solución, mientras que la Figura 5B muestra un estoma expuesto a 0,001 mg del péptido. Los resultados obtenidos coinciden con los de Billington et al. (1997), quienes trabajaron con fracciones proteicas de *Hedera helix*, las que aplicaron en *Tradescantia* sp, observando una



**Fig. 5.** Efecto de la fracción proteica "a" obtenida por cromatografía de intercambio iónico, sobre la apertura de estomas de *Opuntia indica*. (A) Estoma cerrado sin tratamiento con fracciones proteicas. (B) Estoma abierto después de 5 min con una concentración de 0,001 mg/mL de la fracción proteica "a".

**Fig. 5.** Effect of the "a" protein fraction obtained by ion-exchange chromatography, on the opening of stomata of *Opuntia indica*. (A) Closed stoma untreated with protein fractions. (B) Stoma opened after 5 min with a concentration of 0.001 mg/mL of the protein fraction "a".

mayor apertura de los estomas cuando estos fueron expuestos a concentraciones muy bajas. Esto mismo lo reportan Morse et al. (2004) y Maryani et al. (2003). Estos autores aplicaron un PNP exógeno y observaron que éste estimuló la apertura estomática en *Hedera helix* L. y *Solanum tuberosum* L.

## CONCLUSIONES

Se identificó un fragmento de un gen que codifica para PNP en ajo; en la secuencia de aminoácidos deducidas se identificaron la presencia de cisteínas y motivos conservados en este grupo de proteínas. El modelado tridimensional de la secuencia parcial de aminoácidos mostró el plegamiento doble- $\Psi$ - $\beta$ -barrel (DPBB) característico de los PNP y del dominio I de las expansinas. La inmunodetección con anticuerpos de origen humano demostró la existencia de receptores para PNP en ajo. Diferentes fracciones proteicas de ajo indujeron la apertura estomática en muestras de *Opuntia ficus indica*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Armando Guerrero-Rangel por la ayuda en los análisis de cromatografía de intercambio iónico; a Mario Mejía Mendoza por la ayuda en la preparación de muestras para el análisis de la apertura de estomas; al CONACYT México por la beca otorgada a Montserrat Valle Rodríguez, y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el financiamiento en el proyecto.

## REFERENCIAS

- Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myers y D. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology* 215: 403-410.
- Billington, T., M., C. Pharmawati y C. Gehring (1997). Isolation and immunoaffinity purification of biologically active plant natriuretic peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 235: 722-725.
- Casu, R.E., A. Selivanova y J.M. Perroux (2012). High-throughput assessment of transgene copy number in sugarcane using real-time quantitative PCR. *Plant Cell Reporter* 31: 167-177
- Gehring, C., K. Khalid, T. Toop y J.A. Donald (1996). Rat natriuretic peptide binds specifically to plant membranes and induces stomatal opening. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228: 739-744.
- Gehring, C. y R. Irving (2003). Natriuretic peptides a class of heterologous molecules in plants. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35: 1318-1322.
- Geer, L., D. Domrachev y B.S. Lipman (2002). CDART: protein homology by domain architecture. *Genome Reserach* 12: 1619-1623.
- Gottig, N., B.S. Garavaglia, L.D. Daurelio, A. Valentine, C. Gehring, E.G. Orellano y J. Ottado (2008). *Xanthomonas axonopodis* pv. citri uses a plant natriuretic peptide-like protein to modify host homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 18631-18636.

- Kende, H., K. Bradford, D. Brummell, H. Cho, D. Cosgrove, A. Fleming, C. Gehring, Y. Lee, S. McQueen-Mason, J. Rose y L. Voese-nek (2004). Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Molecular Biology* 55: 311-314.
- Kerff, F., A. Amoroso, R. Herman, E. Sauvage, S. Petrella, P. Filee, B. Joris, A. Tabuch, N. Nikolaidis y D.J. Cosgrove (2008). Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 16876-16881.
- Lodhi, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden y B.I. Reisch (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 6-13.
- Ludidi, N., J. Heazlewood, C. Seoighe, H. Irving y C. Gehring (2002). Expansin-Like Molecules: Novel Functions Derived from Common Domains. *Journal of Molecular Evolution* 54: 587-594.
- Maryani, M.M., G. Bradley, D.M. Cahill y C. Gehring (2001). Natriuretic peptides and immunoreactants modify osmoticum-dependent volume changes in *Solanum tuberosum* L. mesophyll cell protoplasts. *Plant Science* 161: 443-452.
- Maryani, M.M., M.V. Morse, G. Bradley, H.R. Irving, D.M. Cahill y C. Gehring (2003). *In situ* localization associates biologically active plant natriuretic peptide immuno-analogues with conductive tissue and stomata. *Journal of Experimental Botany* 54: 1553-1564.
- Meier, S., H. Irving y C. Gehring (2008). Natriuretic peptides-emerging roles in fluid and salt balance. Cardiac Hormones. En: Edit Vaseley DL (ed) Plant. Transworld Research network. Kerala, India, pp. 1-17.
- Morse, M., G. Pironcheva y C. Gehring (2004). AtPNP-A is a systemically mobile natriuretic peptide immunoanalogue with a role in *Arabidopsis thaliana* cell volume regulation. *FEBS Letters* 556: 99-103.
- Nielsen, M., C. Lundegaard y T. N. Lund Petersen (2010). CPH-models-3.0-Remote homology modeling using structure guided sequence profiles. *Nucleic Acids Research* 38: W578-W581.
- Patel, J., M. Valencik, A.P. Burnett, J. Jr. McDonald y M. Redfield (2005). Cardiac-specific attenuation of natriuretic peptide A receptor activity accentuates adverse cardiac remodeling and mortality in response to pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H777-H784.
- Pharmawati, M., M. Maryani, T. Nikolakopoulos, C. Gehring y H. Irving (2001). Cyclic GMP modulates stomatal opening induced by natriuretic peptides and immunoreactive analogues. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 385-394.
- Pettersen, E., T. Goddard, C. Huang, G. Couch, D. Greenblatt, E. Meng y T. Ferrin (2004). UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal Computational Chemistry* 25: 1605-1612.
- Ruzvidzo, O., L. Donaldson, A. Valentine y C. Gehring (2011). The *Arabidopsis thaliana* natriuretic peptide AtPNP-A is a systemic regulator of leaf dark respiration and signals via the phloem. *Journal of Plant Physiology* 168: 1710-1714.
- Sampedro, J. y D.J. Cosgrove (2006). The expansin superfamily. *Genome Biology* 6: 242.
- Shepherd, C.T., A. Lauter y M.P. Scott (2009). Methods in Molecular Biology: Transgenic Maize. En: Scott P. (ed), pp. 129134. Determination of transgene copy number by real time quantitative PCR. Humana Press USA.
- Suwastika, I.N. y C. Gehring (1998). Natriuretic peptide hormones promote radial water movements from the xylem of *Tradescantia* shoots. *Cellular and Molecular Life Science* 54: 1161-1167.
- Takei, Y. (2001). Does the natriuretic peptide system exist throughout the animal and plant kingdom? *Comparative Biochemistry and Physiology part B* 129: 559-573.
- Vesely, D. y A. Giordano (1991). Atrial natriuretic hormonal system in plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 179: 695-700
- Vesely, D., J.R. Gower y A.T. Giordano (1993). Atrial natriuretic peptides are present throughout the plant kingdom and enhance solute flow in plants. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 265: E465-E477.
- Wang, Y.H., C. Gehring, D.M. Cahill y H.R. Irving (2007). Plant natriuretic peptide active site determination and effects on cGMP and cell volume regulation. *Functional Plant Biology* 34: 645-653.
- Zhang, H., W. Xu, J. Guo, Z. He y M. Ma (2005). Coordinated responses of phytochelatin and metallothioneins to heavy metals in garlic seedlings. *Plant Science* 169: 1059-1065.