

T
634.772
PEN

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS

PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

INFORME DE PRACTICAS PROFESIONALES

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
TECNÓLOGO EN ALIMENTOS



Realizado en : CIBE – ESPOL

BIB. CIBCA
DE ESCUELA DE TECNOLOGÍAS

Autor:

Dolores Daniela Peñafiel Anchundia

Profesor guía :


Ing. Angela Naupay

Segunda Revisión:


Dra. Gloria Bajaña Jurado

**AÑO LECTIVO
2001 – 2002
Guayaquil - Ecuador**

Guayaquil, 7 de Enero del 2002

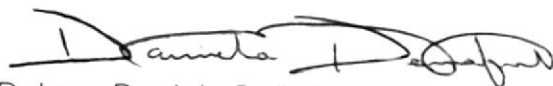
Ing.
Angela Naupay de Yáñez
Coordinadora (e) del Programa de Tecnología en Alimentos
En su despacho

De mis consideraciones:

Por medio de la presente pongo a su conocimiento y disposición mi informe de prácticas profesionales realizados en el Centro de Investigación Biotecnológicas de Ecuador (CIBE) con el tema de "Aislamiento de péptidos antimicrobianos" por los meses de Marzo, Abril, Mayo, y Octubre del 2001 cumpliendo con el requisito para la obtención del Título de Tecnólogo en Alimentos.

Esperando que este sea de su agrado y que satisfaga las expectativas del programa me suscribo.

Atentamente,



Dolores Daniela Peñafiel Anchundia

Guayaquil, 3 de Enero del 2002

CERTIFICADO

Por medio de la presente certifico que la Srta. DOLORES DANIELA PEÑAFIEL ANCHUNDIA estudiante del Programa de Tecnología en Alimentos ha realizado sus Prácticas Profesionales en el Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador por los meses de Marzo, Abril, Mayo, y Octubre del 2001.

La practicante se desempeñó en el laboratorio de Inmunoquímica desarrollando investigación y mostrando disciplina en las labores encomendadas.

Atentamente,



Dr. Rodolfo Maribona
Director del CIBE-ESPOL



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

*Agradezco por todo su apoyo y amor a :
papi Dios,
mis progenitores Fernando y Hanna,
mi ñaño Wilson
y mi amigo Efrén.*

EVALUACION DEL PRACTICANTE

NOMBRE DEL PRACTICANTE: DOLORÉS DANIELA PEÑAFIEL AUCHUNDIA
 DENOMINACION DEL CARGO: PRACTICANTE DEL LABORATORIO DE INMUNOGÉNICOS
 FECHA: 3 de Enero del 2002

A.- Asigne una calificación entre 1 al 10 en cada uno de los siguientes aspectos. Si alguno no es aplicable, por favor no lo califique.

1.- Interés en el trabajo	-----	9
2.-Conocimientos	-----	5
3.- Organización	-----	8
4.- Habilidad para aprender	-----	9
5.- Creatividad	-----	9
6.- Puntualidad	-----	8
7.- Cumplimiento de las normas de seguridad	-----	8
8.-Cantidad de trabajo (rendimiento)	-----	8
9.- Relaciones con el personal	-----	9
10.- Habilidad para comunicarse	-----	9
11.- Responsabilidad	-----	9
12.- Trabaja bajo presión	-----	

B.- MARQUE CON UNA CRUZ

1.- Durante el desarrollo de la práctica el estudiante acogió favorablemente críticas y sugerencias.

Siempre A menudo Rara Vez Nunca

2.- De los 90 días hábiles inasistió al trabajo?

0 - 10% ----- Más del 10% -----

3.- La jornada de trabajo semanal fue de:

5 días ----- 6 días -----

4.- El promedio de horas trabajadas por día fue:

Menos de 6 horas ----- 6 - 8 horas -----

C.-COMENTARIOS ADICIONALES:

D.- LLENADA POR: Washington Cárdenas **PROYECTO VLIR - ESPOL**
 CARGO: JEFE INMUNOGÉNICOS **Dr. Washington Cárdenas**
 FIRMA Y SELLO:  **AREA MOLECULAR - COMPONENTE No. 3**
 NOMBRE DE LA EMPRESA: CIBE - ESPOL TELF. 2269610

INDICE

CAPITULO 1 :

1.1 CARÁTULA	I
1.2 CARTA DE PRESENTACIÓN	II
1.3 CERTIFICADO DE PRACTICAS	III
1.4 AGRADECIMIENTO	IV
1.5 ÍNDICE	V
1.6 ABREVIATURAS	VII
1.7 RESUMEN	VIII
1.8 INTRODUCCIÓN	IX

CAPITULO 2 :

2. DESCRIPCIÓN DE LAS LABORES REALIZADAS	1
--	---

CAPITULO 3 :

3. GENERALIDADES DE LA EMPRESA

3.1 Antecedentes históricos	2
3.2 Organigrama	4
3.3 Localización	5
3.4 Objetivos	5
3.5 Misión	5
3.6 Visión	5



4. BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

CAPITULO 4 :

4.1 DIAGRAMA DE FLUJO	6
4.2 BREVE DESCRIPCIÓN DEL PROCESO	7

CAPITULO 5 :

5. TÉCNICAS REALIZADAS EN EL LABORATORIO

5.1 Extracción proteica - - - - -	8
5.2 Cromatografía de filtración por gel - - - - -	11
5.3 Determinación de concentración proteica - - - - -	14
5.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida - - - - -	16
5.5 Siembra de <i>E. coli</i> - - - - -	21
5.6 Ensayo experimental - - - - -	23

CAPITULO 6 :

6.1 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES - - - - -	25
6.2 BIBLIOGRAFÍA - - - - -	26

CAPITULO 7 :

ANEXOS

Anexo A: Generalidades Banano - - - - -	30
Anexo B : Generalidades Sigatoka Negra - - - - -	32
Anexo C : CIBE - - - - -	33
Anexo D : Proteínas de plantas relacionadas con patogenia -	35
Anexo E : Péptidos antimicrobianos - - - - -	36
Anexo F : Centrífuga refrigerada - - - - -	37
Anexo G: Cromatografía - - - - -	38
Anexo H: Bradford - - - - -	39
Anexo I : Electroforesis - - - - -	40
Anexo J : Clases de péptidos antimicrobianos - - - - -	41



BIBLIOTECA DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ABS	absorbancia
ASB	Albúmina Serica Bovina
°C	grados centígrados
c/u	cada uno
Dr.	Doctor
EDTA	ácido dietilaminotetracético
ELISA	Enzyme - linked inmunosorbent assay
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
g	gramo
INIBAP	Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y Plátano
Ing.	Ingeniero
ITC	Centro Internacional de Tránsito
Km	Kilómetro
l	litro
M	molar
μ l	microlitro
μ M	micromolar
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
ms	mili-siemens
NaCl	cloruro de sodio
nm	nanómetro
pH	potencial de hidrogeno
Ph.D	Phylosophical Doctor
PM	peso molecular
PMFS	Phenyl sulfonylfluoride
PR	proteínas relacionadas a la patogenia
rpm	revoluciones por minuto
S1	proteínas solubles
S2	proteínas asociadas a la membrana
Tris BASE	Tris hidroximethyl aminomethane
UV	ultravioleta
VLIR	Unión de Universidades Flamencas

RESUMEN

El presente informe contiene en detalle la metodología de la aplicación inmunoquímica para el estudio de los sistemas de resistencia del banano frente a la enfermedad foliar denominada Sigatoka Negra, para lo cual el aislamiento de péptidos antimicrobianos de las hojas de la planta comprende un importante paso para el entendimiento de estos sistemas.

Para tal efecto en el laboratorio se han establecido técnicas de electroforesis de poliacrilamida que sirven para obtener patrones proteicos de las plantas en estudio y posteriormente poder identificar proteínas de defensa mediante ensayos fisiológicos. Éste y demás procedimientos han sido establecidos después de una serie de experimentos logrando así una adecuación y óptimo empleo de cada una de las técnicas, de las cuales se encuentran detalladas individualmente en este informe con sus fundamentos, procedimientos, equipos, reactivos y ejemplos.

En su contenido se presenta un diagrama de flujo aplicado para el aislamiento de los péptidos antimicrobianos, además de generalidades de la empresa y anexos.

INTRODUCCIÓN

Las plantas producen varias moléculas proteicas en respuesta a ataques patógenos, entre estas se encuentran las proteínas relacionadas con la patogenia (PR) que poseen una acción enzimática frente a polisacáridos de la pared celular de los hongos, y además los péptidos antimicrobianos que son moléculas de menos de 100 aa que comprenden los sistemas de resistencia (Ver ANEXO E y J).

El laboratorio de inmunoquímica es el encargado de investigar estas proteínas con el objetivo principal de identificarlas y conocer sus funciones para establecer soluciones aplicables a diversas fitopatologías. Ésto realizando estudios en diversos genotipos de *Musa* spp. que comprenden 22 variedades traídas del Centro Internacional de Tránsito (ITC) de la Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y Plátano (INIBAP), frente a la enfermedad foliar más importante conocida como Sigatoka Negra (JONES, 1999) causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* que afecta hasta en un 50% en pérdidas para exportación del banano (NAVARRO, 1998).

De aquí nace la importancia de desarrollar investigación, ya que este alimento se ubica en los países en vías de desarrollo como el cuarto alimento de mayor importancia después del arroz, trigo, maíz (INIBAP, 2000), y es el primer producto agrícola de exportación en el Ecuador.

2. DESCRIPCION DE LAS LABORES REALIZADAS

Las prácticas realizadas comprenden el desarrollo de las técnicas de identificación proteica para lo cual se me asignó el tema de "Identificación y aislamiento de péptidos antimicrobianos" para lo cual me desempeñaba en un horario de 8H30 a 17H30 en el Laboratorio de Inmunoquímica del CIBE a cargo del Ph.D Washington Cárdenas.

Las labores realizadas no eran de manera contractual, y se detallan a continuación:

- § Estudio bibliográfico sobre técnicas de aislamiento de péptidos antimicrobianos
- § Entrenamiento sobre técnicas de inmunoquímica
- § Desarrollo de ensayos aplicando métodos electroforéticos
- § Aplicación de cromatografía de filtración por gel
- § Cuantificación proteica por espectrofotometría
- § Siembra de microorganismos
- § Ensayos de metodología para el aislamiento de péptidos antimicrobianos



BIBLIOTECA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CHIHUAHUA

3. GENERALIDADES DE LA EMPRESA

3.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Por iniciativa de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), atendiendo una convocatoria de la Unión de Universidades Flamencas (VLIR), fue presentado un proyecto en el cual se concebía la ejecución de 6 actividades denominadas componentes. Entre estos componentes, el número 3, aborda la investigación en biotecnología; con un mandato inicial de hacer investigación para la resistencia genética de *Musa* para el control de la Sigatoka Negra, con el fin de lograr una agricultura ambientalmente sustentable.

En el desarrollo de este proyecto, que fue financiado por el fondo Belga y una contraparte de ESPOL, el componente 3 ejecutó un curso de diplomado en biotecnología, y 4 cursos de postgrado. Del grupo de estudiantes fueron seleccionados 3 a cursos "sandwich" de Ph.D en las universidades belgas de Gante y Lovaina.

Esta actividad avanzó en paralelo con la adaptación y construcción de los laboratorios e instalaciones para entrenar especialistas capaces de ejecutar los objetivos de investigación del proyecto.

La integración del sector productivo en las estrategias y ejecución de las actividades de investigación, logró desde el mismo inicio del proyecto, una excelente comunicación y participación, definiendo los programas de investigación coparticipada.

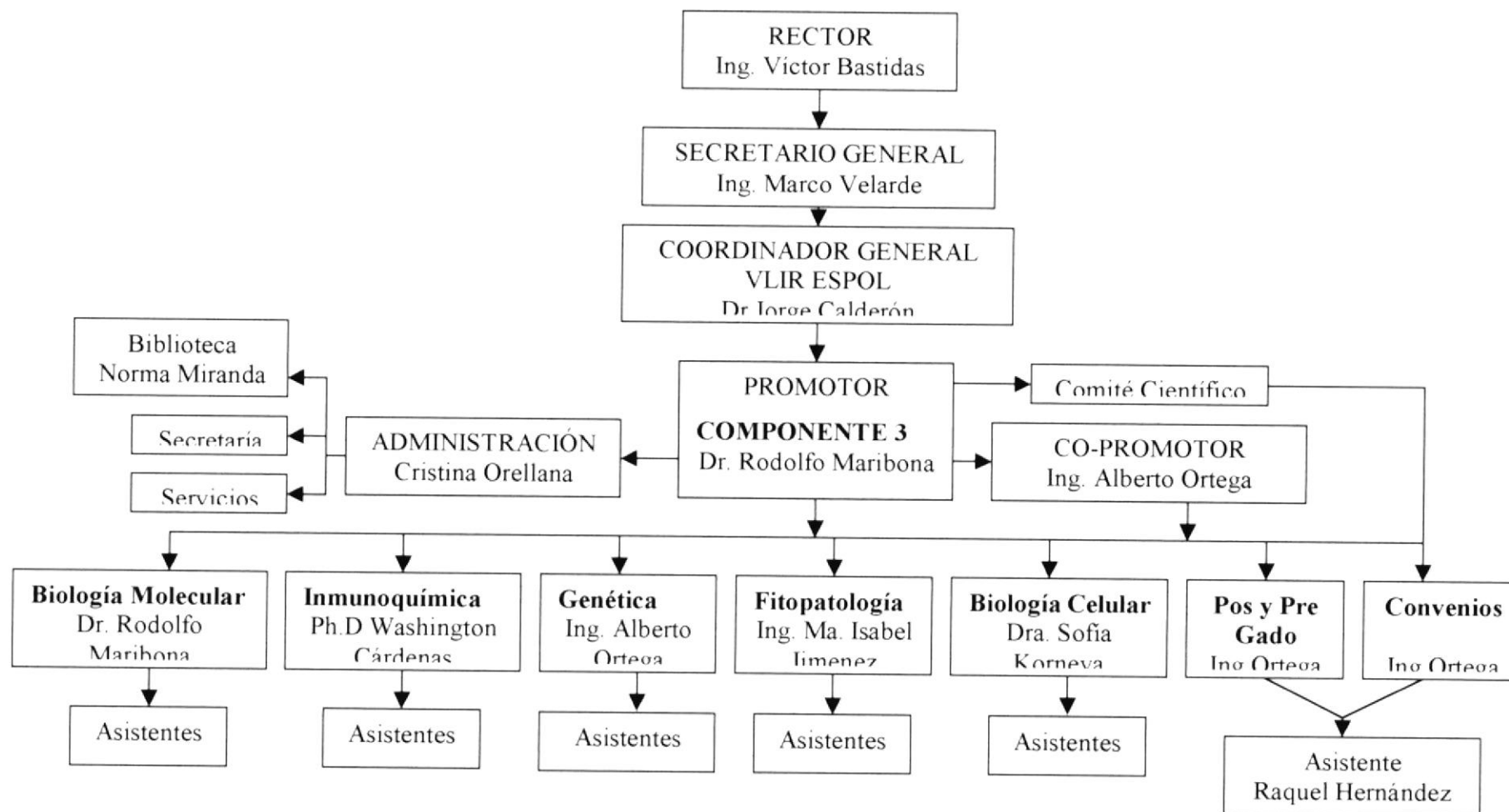
Adicionalmente, se han conseguido recursos para reforzar el desarrollo de los proyectos de investigación y capacitación. Se siguen generando

propuestas para la formación de recursos humanos de cuarto nivel en la óptica de convertir a este centro en una entidad auto sustentable para la investigación, la enseñanza y la extensión participativa.

En el breve plazo de 1 año, con un staff de 21 colaboradores, en pleno desempeño de las investigaciones, con la presencia de las máximas autoridades de la ESPOL, representantes de los productores y de la contraparte belga, fue inaugurado el *17 de Enero del 2001*, como el "Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador" de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.



3.2 ORGANIGAMA



3.3 LOCALIZACIÓN

El CIBE tiene sus instalaciones en el Campus Gustavo Galindo Km 30.5 vía Perimetral en la planta alta del Programa de Tecnología en Alimentos (Bloque N° 47)

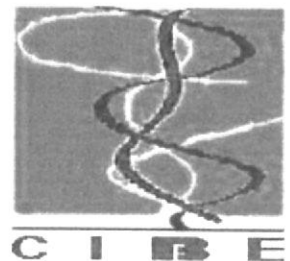


3.4 OBJETIVO

Hacer investigación biotecnológica para el mejoramiento genético de plantas, los agentes causales de enfermedades y su interacción con las plantas huéspedes, las tecnologías de producción con el uso de microorganismos benéficos y las oportunidades de tecnologías para incorporar valor agregado a las cosechas partiendo del primero y gran mandato *Musa* resistente a Sigatoca Negra en un ambiente sustentable.

3.5 MISIÓN

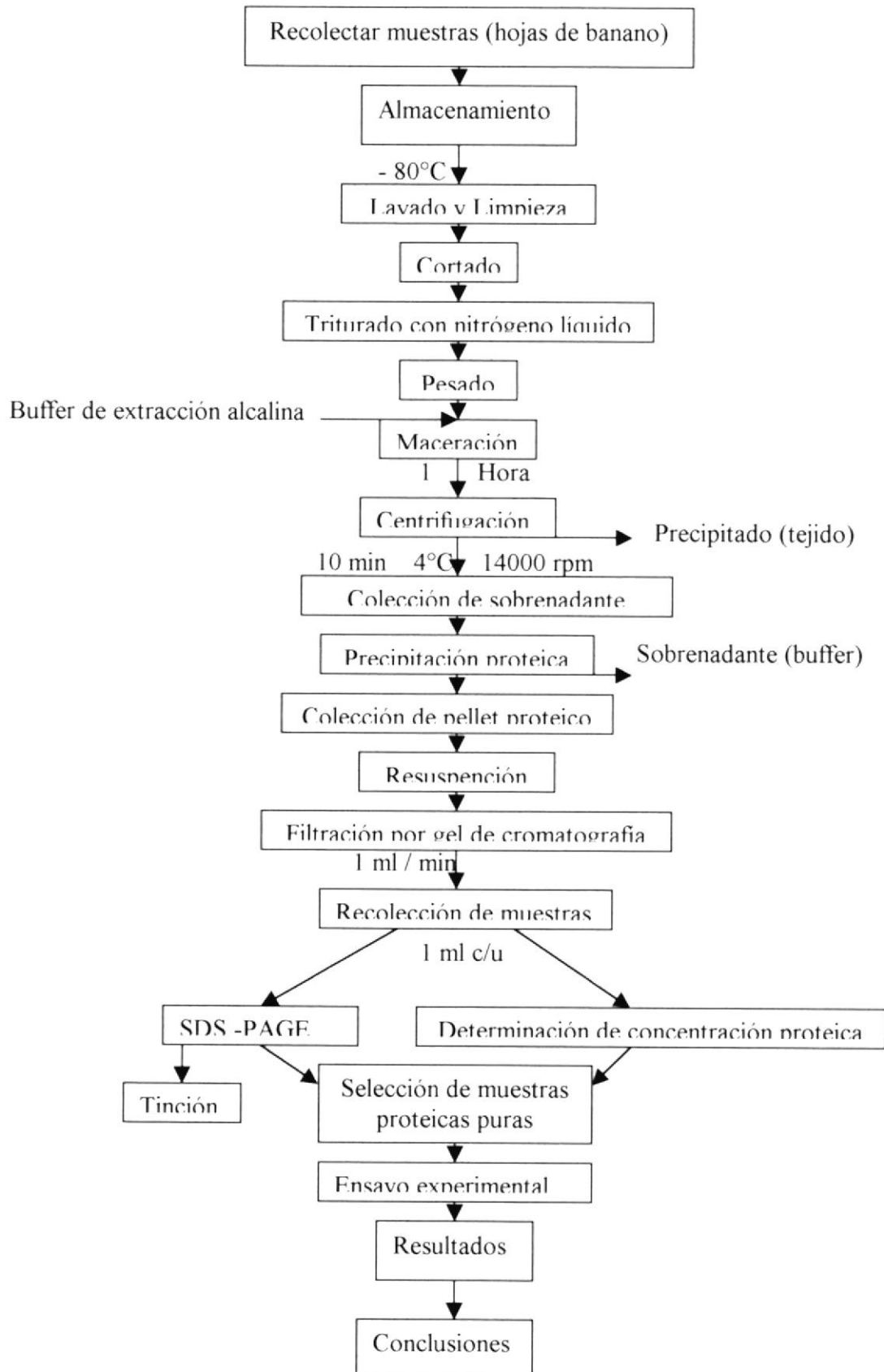
Formar líderes capaces de convertir la biotecnología en una herramienta indispensable para el desarrollo social y económico del país en un ambiente sustentable.



3.6 VISIÓN

El futuro del Ecuador es avance del conocimiento tecnológico, conservación y uso de sus grandes recursos genéticos para el bienestar de la especie humana.

4.1 DIAGAMA DE FLUJO





BIBLIOTECA
DE CIENCIAS TECNOLÓGICAS

4.2 BREVE DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Se toman hojas de la variedad de banano deseada en la Cañada de las *Musas*, se las transporta en una hielera hacia el laboratorio (4°C) y luego se las almacena en un congelador a -80°C. Para su uso estas son sacadas del congelador, lavadas con agua y jabón, y secadas, pero siempre procurando que estén en frío (hielito). Las hojas son cortadas en cuadritos y trituradas con nitrógeno líquido para luego extraer las proteínas sometiéndolas a buffer de extracción por una hora, esto en tubos que luego son centrifugados para separar las proteínas solubles (S1) de las asociadas a membrana (S2) de las cuales la fase superior (S1) será separada por decantación hacia nuevos tubos, aunque cuando el sobrenadante no está lo suficientemente limpio se procede a filtrarlo. Este extracto "crudo" pasa a ser tratado con sulfato de amonio para obtener una precipitación de las proteínas, por medio de la obtención de un pellet después de centrifugación, el cual luego es resuspendido en buffer de extracción para su empleo en los ensayos. Así las muestras proteicas son purificadas mediante cromatografía empleando columnas con matrices de separación y se procede a coleccionar varias muestras de 1 ml c/u, las cuales luego se someten a procesos electroforéticos para obtener patrones de bandas proteicas fácilmente visibles en geles de poliacrilamida; además se cuantifican sus concentraciones mediante espectrofotometría en cajitas ELISA aplicando Bradford. Luego mediante criterio obtenidos por las curvas de separación, cuantificación proteica y los geles, se seleccionan los tubos que contengan las muestras con mayor concentración proteica y de manera pura, para ser empleados en los ensayos experimentales en los cuales se utilizan siembras de *E. coli* en cajitas ELISA para de esta manera observar si existe alguna inhibición.

5. TÉCNICAS REALIZADAS EN EL LABORATORIO

5.1 EXTRACCION PROTEICA

FUNDAMENTO:

El proceso de aislamiento de proteínas consiste en un lavado de tejidos y aplicación de lisis celular a partir de un pulverizado de hojas empleando un buffer de extracción que posee un pH alcalino el cual permite extraer las proteínas de naturaleza soluble, y luego por medio de centrifugación se obtiene un sobrenadante llamado extracto crudo el cual luego es tratado con sulfato de amonio para realizar una precipitación que al centrifugar da un pellet que es proteína pura y que se resuspende en buffer de extracción para tener una dilución total y facilitar su empleo en procesos subsecuentes.

PROCEDIMIENTO:

- Recolectar muestras de hojas de banano en la Cañada de las Musas (Ver ANEXO C), tomando muy en cuenta el número de la hoja y que inmediatamente se guarden en una hielera para evitar fenolización y autólisis.
- Almacenarlas a -80°C para uso posterior.
- Lavarlas con agua potable y jabón líquido, enjuagarlas con agua destilada y almacenarlas en una hielera (4°C).
- Secarlas con un papel toalla, y cortarlas en cuadrillos muy pequeños con una tijera limpia y seca.
- Colocar los cuadrillos en un mortero preenfriado y adicionarles nitrógeno líquido hasta cubrir la muestra y con la ayuda de un pilón macerar las hojitas hasta que se pulvericen.
- Pesar la cantidad de muestra en un tubo.

- Adicionar buffer de extracción alcalino en la relación de por cada 5 g de muestra se adicionan 1.5 ml de buffer.
- Homogenizar la mezcla aplicando vortex (vibración).
- Dejar macerar por una hora a baja temperatura (con los tubos sumergidos en hielo).
- Centrifugar los tubos a 4°C, 14000 rpm por 10 minutos.
- Colectar el sobrenadante (extracto crudo) en nuevos tubos, determinar el volumen.
- Filtrar el sobrenadante (si es necesario), con papel filtro y posteriormente con filtros whatman (0.2 µm) con ayuda de una jeringa.
- Recolectar el filtrado y realizar la precipitación con sulfato de amonio al 80% para la cual se emplea la relación de 525.5 g por l.
- Dejar en reposo en hielo por una hora.
- Centrifugar los tubos a 4°C, 14000 rpm por 10 minutos.
- Decantar el sobrenadante y conservar el pellet proteico.
- Resuspender el pellet en buffer de extracción alcalina (por cada 0.5 g de muestra 1.5 ml de buffer).

EQUIPOS Y MATERIALES:

Congelador de -80°C

Mortero

Pilón

Tijeras

Tubos falcon

Tubos eppendorf

Vortex

Micro pipetas

Centrífuga refrigeradas (Ver ANEXO F)

Papel filtro

Filtros whatman

Jeringa

Cronómetro

PREPARACION DE REACTIVOS:

Buffer de extracción pH 7.5

El buffer esta constituido por TRISMA-base 50mM, EDTA 10 mM, ácido ascórbico 0.2%, NaCl 150 mM el cual se completa (al momento de uso) con 140 μ l de mercapto por 100 ml de buffer y 1 μ l de PMSF por ml de Buffer.

Para lo cual se pesan 6.005 g de TRISMA, 3.72 g EDTA, 2 g de ac. ascórbico y 8.766 g de NaCl y se disuelven en un matraz aforado de 1000 ml con agua deionizada.

CALCULOS Y EJEMPLOS:

Preparación de buffer de extracción alcalino:

PM de Tris BASE tris (hidroximethyl aminomethane) $C_4H_{11}NO_3 = 121.11$

PM de EDTA (ácido dietilaminotetracético) $C_{10}H_{16}N_2O_8 = 292.2$

PM de NaCl = 40 g

PM β -mercaptoetanol (C_2H_6OS) = 78.3

PM de PMFS (Phenyl sulfonylfluoride) $C_7H_7FO_2S = 174.2$

5.2 CROMATOGRAFIA DE FILTRACION POR GEL

FUNDAMENTO:

La cromatografía de filtración por gel en columna separa proteínas de acuerdo a su tamaño, pasando las muestras proteicas por la matriz, la cual contiene poros que permiten que el buffer, sulfato de amonio (empleado para la precipitación), y las más pequeñas proteínas ingresen, pero excluye el paso a proteínas grandes y complejas, las proteínas grandes migran sobre las partículas de la matriz y salen de la columna primero que las proteínas pequeñas y el sulfato de amonio.

Las proteínas emergen de la columna dependiendo de sus pesos moleculares. El sistema pasa la muestra por un lector óptico UV en donde determinando la absorbancia de la muestra (ABS), el siguiente elemento del sistema es un conductímetro que determina la conductibilidad de la muestra dependiendo del gradiente salino el cual es medido en mili-siemens (ms).

PROCEDIMIENTO:

- Encender el sistema con 15 minutos de anticipación
- Preparar la columna cromatográfica conectándola a la tubería de ingreso, se la ajusta al soporte con los brazos flexibles.
- Se destapa la columna y se abre la llave del flujo de esta.
- En el panel de control se presiona START para iniciar el flujo, verificando que se eliminen todas las burbujas atrapadas en el sistema.
- En el panel se presiona VALVES seleccionado DIVERT, y eligiendo la opción "(divert)" para realizar la limpieza de la columna *

- Se procede a vaciar la columna logrando que el menisco del buffer quede justo en el tope de la matriz, parando el flujo presionando STOP.
- Se dosifica la muestra de proteína (no mayor a 3 ml) con una pipeta.
- Se controla el flujo (FLOW) a 1 ml por minuto.
- Se inicia el flujo presionando START, por 3 minutos (volumen muerto) y luego se para (STOP).
- Se pone el sistema en coleccionar presionando VALVES y seleccionando COLLECT.
- Se empieza a coleccionar las muestras presionando START en el cromatógrafo y además el colector con el botón RUN, o presionando RECORD cuando esta conectado a la computadora para que los resultados se muestren en pantalla empleando el software.
- Parar la colección de muestras cuando la curva se muestre estado inicial.
- Limpiar la columna.
- Desconectar la columna y almacenarla en refrigeración con un poco de agua o buffer.

*LAVADO DE LA COLUMNA: Se llena la columna con agua deionizada y se deja pasar hasta que bajan los valores de ABS y de ms , luego pasar 1 ml de una solución concentrada de úrea (9.5 M), y finalmente se pasa buffer fosfato (10 mM y 150 mM NaCl) hasta que se den valores constantes.

EQUIPOS Y MATERIALES:

Bio Rad LP High Pressure Chromatography system (Ver ANEXO G).

Columna de cromatografía P-6DG (6000 daltons) (Ver ANEXO G)

Bio Rad Model 2110 Fraction Collector : Software LP Data View

PREPARACION DE REACTIVOS:

Buffer fosfato 10 mM + 150 mM NaCl ; pH 6.8

Pesar 1.2 g de fosfato mono básico, y adicionarlos junto 8.776 g de NaCl en una matraz aforado y enrasar a 1000 ml con agua deionizada.

Pesar 1.4196 g de fosfato di básico y adicionarlo junto con 8.776 g NaCl en un matraz aforado y enrasar a 1000 ml con agua deionizada.

Colocar un beaker con un agitador magnético y verter ambas soluciones mezclándolas intermitentemente (mono, di, mono, di) volúmenes similares aproximados, medir el pH y seguir adicionando con el electrodo introducido hasta llegar a un pH de 6.8.

Urea 9.5 M

Pesar 285.3 g de Urea y enrasar a 500 ml con agua deionizada, almacenar en refrigeración y esperar a disolución total para su uso.

CALCULOS Y EJEMPLOS:

Preparar 2 litros de buffer fosfato 10 mM con 150 mM de cloruro de sodio.

Peso molecular de fosfato de sodio mono básico (NaH_2PO_4) = 120

Peso molecular de fosfato de sodio di básico (Na_2HPO_4) = 141.96

10 mM = 0.01M \rightarrow (0.01M) (141.96 g) = 1.4196 g

10 mM = 0.01 M \rightarrow (0.01M) (120 g) = 1.2 g

Preparar 500 ml de solución de urea 9.5 M.

Peso molecular de la urea = 60.06

9.5 M = (9.5M) (60.06) = 570.57 g en un litro : 285.3 g en 500 ml

Curva obtenida al pasar muestra de calcutta 4 , hoja N° 4 (Ver ANEXO G)

5.3 DETERMINACION DE CONCENTRACION PROTEICA

FUNDAMENTO:

Para determinar proteínas por espectrofotometría se emplea el método de Bradford el cual se basa en el acoplamiento del colorante azul de Comassie con la proteína la cual tiene una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteínas la cual se determina colorimétricamente a 595 nm (luz visible) en un espectrofotómetro de placa (lector ELISA). La absorbancia se interpola a la curva patrón y se extrapola de esta al eje de las X para conocer la cantidad de proteína contenida en la muestra.

PROCEDIMIENTO:

- Diluir el reactivo Bradford 5X (Bio rad) 1:4 con agua deionizada en un beaker.
- Colocar en una placa de 96 posos (fondo plano) 6 diferentes concentraciones de BSA (Albúmina Serica Bovina) por triplicado para realizar la curva patrón. Colocando 10 μ l de muestra y 200 μ l del reactivo Bradford diluido. En la primera fila se coloca el blanco y a continuación las 6 diluciones en orden descendente.
- Colocar por cada posillo 10 μ l de cada una de las muestras problema y 200 μ l del reactivo Bradford. Por triplicado.
- Incubar por 20 minutos en la oscuridad.
- Realizar la determinación en el lector ELISA, seleccionando la longitud de onda a 595 nm.

- Reemplazar en la ecuación de la curva patrón. Recordando corregir la absorbancia restando a los valores el dato del blanco.
- Obtener la concentración. Los resultados se expresan el mg / ml.

EQUIPOS Y MATERIALES :

Espectrofotómetro de placas (Lector de ELISA).

Cámara plástica ELISA de 96 pozos fondo plano (Ver ANEXO H)

Pipetas automáticas de 10-100 μ l, 1 – 10 μ l y 500-1000 μ l

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Preparación de Bradford diluido

Tomar 1 ml del reactivo Bradford Bio Rad y diluirlo con 4 ml de agua.
Prepararlo al momento del uso.

Preparación de diluciones para curva patrón.

Tomar 50 μ l de BSA Stock (1.41 mg/ml) y colocarlos en un tubo, de estos tomar 30 μ l y mezclarlos con 30 μ l de agua deionizada (0.705 mg/ml), de aquí tomar 30 μ l y diluirlos en 30 μ l de agua deionizada y así sucesivamente hasta obtener 6 diluciones con:
1.41 mg/ml, 0.705 mg/ml, 0.3525 mg/ml, 0.17625 mg/ml, 0.088125 mg/ml, 0.044 mg/ml.

CALCULOS Y EJEMPLOS:

Medidas de absorbancia de muestras de Calcutta 4 :

0.777 A	0.805 A	0.701 A
Promedio : 0.761		
Lectura del Blanco : 0.2855		
Ecuación de Curva patrón = $-0.0554 + 2.14599 \text{ ABS corregida}$		
Resultado : $-0.0554 + 2.14599 (0.761 - 0.2855)$		
: 0.965 mg/ ml		

5.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS PAGE)

FUNDAMENTO:

Es la separación de proteínas en base a sus pesos moleculares, empleando Sodium docedylsulfate, así el complejo SDS-proteína es proporcional a su peso molecular; adicionalmente se emplea un agente reductor como el mercaptoetanol que rompe los puentes disulfuro permitiendo analizar moléculas separadamente, esto en geles de poliacrilamida y bajo la aplicación de voltaje permite la migración del complejo SDS-proteína hacia el electrodo positivo, así partículas grandes con mayor carga serán mayormente arrastradas, y viceversa.

PROCEDIMIENTO:

- Armar el equipo colocando las placas de vidrio, previo lavado con agua jabonosa y limpieza con alcohol, en los soportes.
- Preparar el running gel y colocar 4.5 ml en cada uno.
- Adicionar 3 ml de agua para alinear y esperar polimerización (40 min).
- Preparar stacking gel y colocar 2 ml en cada gel.
- Colocar inmediatamente las peinetas y esperar polimerización (15 min).
- Tomar las placas con los geles, sacarle las peinetas y colocarlas en el cubo de electroforesis.
- Adicionar el running buffer 1X.

- Preparar la muestras, tomando para los geles de 15 posillos 12 μ l de muestra y 3 μ l de Loading buffer, y para los de 5 posillos el doble.
- Calentar las muestras por 1 minuto a baño de maría.
- Colocar la muestras en cada posillo del gel con una micropipeta, procurando que no se rebose.
- Tapar el cubo y encender el equipo de voltaje.
- Programarlo para 200 voltios, y correr hasta que caigan las muestras al running buffer.
- Parar la corriente y desarmar la caja de electroforesis.
- Despegar los geles de las placas de vidrio, cuidadosamente evitando que se rompan.
- Y se precede a teñirlos según el método deseado.

TINCION :

COMASSIE BLUE:

- Sumergir el gel en solución de Comassie blue por una hora, empleando una bandejita con tapa y colocar en shaker para agitación.
- Quitar la solución de Comassie Blue y recolectarla para uso posterior.
- Sumergir el gel en solución de Distain I por 10 minutos continuando en agitación.
- Evacuar la solución de Distain I y eliminarla.
- Colocar el gel en un baño de Distain II y esperara a que el gel se torne transparente y que las bandas azules se visualicen bien. La solución de Distain I puede ser aplicada un par de veces, con el objetivo de mejorar la visión de las bandas en el gel.



BIBLIOTECA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

NITRATO DE PLATA :

- Sumergir el gel en solución de 50% metanol, 10% ácido acético, y 40% agua deionizada, por una hora en shaker.
- Transcurrida la hora realiza un lavado con agua deionizada, y dejarlo sumergido en agua deionizada.
- Realizar cambios de el agua cada diez minutos, por media hora.
- Prepara solución A, B y C.
- Sumergir el gel en 50 ml de solución C por 15 minutos.
- Preparar solución D .
- Evacuar la solución C en un frasco de desecho.
- Lavar el gel con agua deionizada un par de veces dejándolo sumergido en agua por un minuto cada vez.
- Pasar el gel a un recipiente limpio, y adicionar 50 ml de la solución D.
- Dejar en la oscuridad y agitación que la tinción se lleve a cabo siendo aproximadamente 10 min hasta que las banditas de visualicen claramente.
- Eliminar la solución D en frasco de desecho, y enjuagar el gel con agua deionizada.

EQUIPOS Y MATERIALES:

Incubator Shaker : New brunswich scientific

BioRad : Equipo de electroforesis, fuente de poder (Ver ANEXO I)

Biorad : Placas de gel

Soporte

Peinetas

Cubo de electroforesis

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Running gel 15%:

Colocar en un beaker 3.6 ml de agua deionizada, 2.5 ml de Trisma 1.5 M, 0.1 ml de SDS 10%, 3,75 ml de acrilamida 40% y finalmente

(al momento del uso*) añadir 50 μ l de amonio persulfato 10% y 5 μ l de TEMED (estos últimos con breve agitación).

Stacking gel:

Colocar en un beacker 3.8 ml de agua deionizada, 1.5 ml de Trisma 0.5 M, 60 μ l de SDS, 0.6 ml de acrilamida 40%, y por último (al momento del uso*) añadir 30 μ l de amonio persulfato y 6 μ l de TEMED.

* Debido a que inician polimerización y se gelatiniza.

Running Buffer: A partir de un stock 5X llevar a 1X con agua deionizada.

Loading Buffer 5X:

Pesar 0.01 g de azul de bromofenol y diluir en 1.9 ml de agua deionizada en un beacker con agitador magnético, luego agregar 600 μ l de Trisma 1 M (pH 6.8), 2 ml de SDS 10%, 5 ml de glicerol 100% (cuidadosamente), y 0.5 ml de β -mercaptoetanol.

Comassie Blue :

1g Comassie Blue
450 ml metanol
450 ml agua deionizada
100 ml ácido acético glacial
Homogeneizar con un agitador magnético

Distain I

40% metanol
10 % ácido acético
50% agua deionizada

Distain II

10% metanol
7% ácido acético
83% agua deionizada

Solución A:

Pesar 0.8 g nitrato de plata y agregar 4 ml de agua.
Disolver con un agitador magnético en un beaker tapado.

Solución B:

Mezclar 21 ml de NaOH al 0.37%, con 1.41 ml de NH_4OH al 29.7%.

Homogeneizar con un agitador magnético.

Solución C: (A+B)

Agregar al beaker de solución B *en agitación* , la solución A usando una pipeta pasteur, gota por gota, evitando tornar gris la solución.

Solución D:

Pipetear 0.5 ml de ácido cítrico 1% y agregar 37.5 ml formaldehído 37%, luego enrasar al 100 ml.

5.5 SIEMBRA E COLI

FUNDAMENTO :

Es el de suministrar nutrientes óptimos para que el mo se desarrolle empleando el Luria Broth el cual contiene triptona, extracto de levadura, cloruro de sodio y optativamente agar, esto para obtener un cultivo que pueda ser cuantificado y empleado para posteriores ensayos.

PROCEDIMIENTO :

- A partir de un cultivo de *E. coli* (después de pruebas bioquímicas).
- Tomar con un asa de platino una pequeña cantidad del cultivo.
- Sembrarlo por estría en cajas de petrix con agar L-Broth.
- Identificar las cajas.
- Incubar a 36°C.
- Tomar con un asa de platino una pequeña colonia y sembrarlo en L-Broth líquido.
- Incubar a 37°C y con agitación, por 2 horas.
- Colocar 2 ml de cultivo líquido con *E coli* en un tubo eppendorff y centrifugarlo por menos de un minuto a velocidad media..
- Eliminar el sobrenadante.
- Los microorganismos (pellet) son resuspendidos en Poor Broth.
- Se determina la concentración de microorganismos en el espectrofotómetro a 600 nm.
- Se procede a llevar el cultivo a una concentración de 0.001 mg/ml empleando Poor Broth.

EQUIPOS Y MATERIALES:

Espectrofotómetro

Shaker Incubator

Cajas de petrix

Asa de platino

Mechero Bunsen

Matraz Erlenmeyer

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Preparación de Luria Broth (pH 7.5) :

1% de triptona

0.5 % Extracto de Levadura

150 mM NaCl

Pesar 1 g de triptona, 0.5 g de extracto de levadura y 0.876 g de NaCl, enrasar a 100, agitar y ajustar el pH a 7.5 empleando NaOH. Colocar en una botella y esterilizar por 15 minutos a 121.1°C.

Preparación del Poor Broth (pH 7.4):

1% de triptona

150 mM de NaCl

Pesar 1 g de triptona y 0.876 g de NaCl, enrasar a 100ml, agitar y ajustar el pH con NaOH. Embotellar y esterilizar a 121.1°C por 15 minutos.

5.6 ENSAYO EXPERIMENTAL



FUNDAMENTO :

El ensayo nos permite observar si las proteínas extraídas tienen características inhibitorias, ésto aplicando distintas concentraciones en cajas ELISA con microorganismo (*E. coli*).

BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TÉCNICAS

PROCEDIMIENTO :

- Seleccionar la muestra a emplear, y realizar diversas diluciones : 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} pasando 5 μ l de cada muestra y diluyéndola en 45 μ l de Buffer fosfato, sucesivamente hasta obtener las 5 concentraciones.
- En una caja ELISA de 96 posos fondo plano colocar según:
 - En la primera columna = Control : 10 μ l Proteína + 100 μ l Poor Broth
 - En la segunda columna = Control 2 : Con 100 μ l de *E. coli* + 10 μ l PBS
 - En la tercera columna = 10^0 : 100 μ l de *E.coli* + 10 μ l de proteína
 - En la cuarta columna = 10^1 : 100 μ l de *E.coli* + 10 μ l de proteína
 - En la quinta columna = 10^2 : 100 μ l de *E.coli* + 10 μ l de proteína
 - En la sexta columna = 10^3 : 100 μ l de *E.coli* + 10 μ l de proteína
 - En la séptima columna = 10^4 : 100 μ l de *E.coli* + 10 μ l de proteína
- Dejar el incubación a 30°C por 5 horas
- Observar el crecimiento.
- Determinar resultados.

EQUIPOS Y MATERIALES:

Shaker Incubator

Cajas ELISA 96 posillos fondo plano

Micropipetas 10 – 100 μ l.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

PBS : Buffer fosfato 10 mM + 150 mM NaCl : pH 6.8

Pesar 1.2 g de fosfato mono básico, y adicionarlos junto 8.776 g de NaCl en una matraz aforado y enrasar a 1000 ml con agua deionizada.

Pesar 1.4196 g de Di básico y adicionarlo junto con 8.776 g NaCl en un matraz aforado y enrasar a 1000 ml con agua deionizada.

Colocar un beaker con un agitador magnético y verter ambas soluciones mezclandolas intermitentemente (mono, di, mono, di) volúmenes similares aproximados, medir el pH y seguir adicionando con el electrodo introducido hasta llegar a un pH de 6.8.

Preparación del Poor Broth (pH 7.4):

1% de triptona

150 mM de NaCl

Pesar 1 g de triptona y 0.876 g de NaCl, enrasar a 100ml, agitar y ajustar el pH con NaOH. Embotellar y esterilizar a 121,1°C por 15 minutos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ⊕ Observando las tendencias de crecimiento del MO en presencia de estas proteínas no se pudo observar ningún tipo de inhibición en los ensayos efectuados.
- ⊕ La NO obtención de resultados inhibitorios en los ensayos experimentales no son considerados como concluyentes, para lo que se recomienda un rediseño del procedimiento (no estandarizado) para futuros ensayos.
- ⊕ La obtención de resultados confiables esta influenciado por la exactitud de las determinaciones. Así el desarrollo de las técnicas permite su plena evolución.
- ⊕ Se recomienda emplear para todas las técnicas agua deionizada, para evitar que existan interferencias por contaminantes.
- ⊕ Es preferible emplear reactivos personales y etiquetarlos para evitar contaminaciones involuntarias que afecten a los resultados.
- ⊕ Es primordial mantener en todo momento las muestras (hojas, proteína) bajo refrigeración durante todos los procesos, haciendo uso de hielo triturado.
- ⊕ Si se desea varia algún procedimiento se recomienda consultar bibliografía y si se presenta alguna mejora, establecer una nueva metodología ya que las técnicas no han sido estandarizadas.

BIBLIOGRAFÍA

BOLLAG, D. (1998) Proteins Methods. Editorial Wiley-Liss. Second Edition. 82 p.

BROEKAERT, W.F., TERRAS, F.R.G., CAMMUE, B.P.A., OSBORN, R.W. (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defence system. *Plant Physiol.* 108: 1353-1358.

CAMMUE, B.P.A., DE BOLLE, M.F.C., TERRAS, F.R.G., PROOST, P. VAN DAMME, J., REES, S.B., VANDERLEYDEN, J., BROEKAERT, W.F. (1992) Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 2228-2233.

CAMMUE, B.P.A., DE BOLLE, M.F.C., TERRAS, F.R.G., BROEKAERT, W.F. (1993) Fungal disease control in *Musa*: application of new antifungal proteins: In: Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests, Montpellier, 7-9 September 1992, ed. Ganry. CIRAD, Montpellier, France. pp 221-225.

CAMMUE, B.P.A., THEVISSSEN, K., HENDRIKS, M., EGGERMONT, K., GODERIS, I.J., PROOST, P., VAN DAMME, J., OSBORN, R.W., GUERBETTE, F., KADER, J.C., BROEKAERT, W.F. (1995) A potent antimicrobial protein from onion (*Allium cepa* L.) seeds showing strong sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* 109: 445-455.



DE BOLLE, M.F.C., DAVID, K.M.M., REES, S.B., VANDERLEYDEN, B.P.A., BROEKAERT, W.F. (1993) Cloning and characterization of a cDNA encoding an antimicrobial chitin-binding protein from amaranth, *Amaranthus caudatus*. *Plant Mol. Biol.* 22: 1187-1190.

EPPLE, P., APEL, K., BOHLMANN, H. (1997) Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 9: 509-520.

GARCÍA-OLMEDO, F., MOLINA, A., ALAMILLO, J.M., RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P. (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* 47: 479-491.

HOLTORF, S., LUDWING-MULLER, J., APEL, K., BOHLMANN, H. (1998) High-level expression of a viscotoxin in *Arabidopsis thaliana* gives enhanced resistance against *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Mol. Biol.* 36: 673-680.

INIBAP (2000) Banano, alimento para los pobres. Montpellier, France. 1 p

JONES, D.R. (1999) Disease of banana, abaca and ensete. UK. 544 p.

KADER, J.-C. (1996) Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 627-654.

KOO, J.C., LEE, S.Y., CHUN, H.J., CHEONG, Y.H., CHOI, J.S., KAWABATA, S., MIYAGI, M., TSUNASAWA, S., HA, K.A., BAE, D.W., HAN, C.D., LEE, B.L. AND CHO, M.J. (1998) Two hevein homologs isolated from the seed of

Pharbitis nil L. exhibit potent antifungal activity. *Biochimica Biophysica Acta* 1382, 80-90.

MOLINA, A., GOY, P.A., FRAILE, A., SÁNCHEZ-MONGE, R., GRACIA-OLMEDO, F. (1993a) Inhibition of bacterial and fungal plant pathogens by thionins of types I and II. *Plant Sci.* 92: 169-177.

MOLINA, A., SEGURA, A., GRACÍA-OLMEDO, F. (1993b) Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.* 316: 119-122.

NAVARRO, W. (1998) Mejoramiento genético de *Musa* spp. ESPOL. SEBIOCA. pp. 3-5

OSBORN, R.W., DE SAMBLANX, G.W., THEVISSSEN, K., GODERIS, I., TORREKENS, S., VAN LEUVEN, F., ATTENBOROUGH, S., REES, S.B., BROEKAERT, W.F. (1995) Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett.* 368: 257-262.

RAIKHEL, N.W., LEE, H.I. AND BROEKAERT, W.F. (1993) Structure and function of chitin-binding proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44, 591-615.

REMY, S. (2000) Genetic transformation of banana (*Musa* spp.) for disease resistance by expression of antimicrobial proteins. Ph.D thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. 341 p.

ROBINSON, J.C., BOWER, J.C. (1998) Transpirations from banana leaves in the subtropics in response to diurnal and seasonal factors and high evaporative demand. *Scientia Horticulture* 37: 129-143

SÁGI, L. (1999) Genetic engineer. In: *Disease of banana, abaca and ensete*, ed: D.R. Jones. UK. 544 p.

SANTOS, E. (2001) Estudio de la densidad y tamaño de estomas en variedades de *Musa* con distintos grados de resistencia a la Sigatoka Negra. Tesis de Ingeniero Agropecuario, ESPOL. pp. 143

SEGURA, A., MORENO, M., MADUENO, F., MOLINA, A., GRACÍA-OLMEDO, F. (1999) Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 16-23.

TECAN. (2001) Operating Manual for sunrise. pp. 52

TECAN. (2001) Protocols. 48 p.

TERRAS, F.R.G., SCHOOF, H., DE BOLLE, M.F.C., VAN LEUVEN, F., REES, S.B., VANDERLEYDEN, J., CAMMUE, B.P.A., BROEKAERT, W.F. (1992b) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Bio. Chem.* 267: 15301-15309.



DEPARTAMENTO DE EDUCACIÓN
DE ESCUELAS NACIONALES

ANEXOS

ANEXO A

BANANO

El banano es el tercer alimento más consumido a nivel mundial y el primer producto agrícola de exportación para el Ecuador. Se cultiva en más de 120 países en casi 10 millones de hectáreas con una producción anual de 88 millones de toneladas métricas (INIBAP, 2000).

Este tiene la ubicación Taxonómica:

ORGEN : *Zingiberales*

FAMILIA : *Musaceae*

GÉNERO *Musa*

FAMILIA de *Musaceae*

SECCIÓN: *Emusa*

ESPECIES: *Acuminata colla, Balbisiana colla.*

SUBESPECIES: *acuminata: burmaniaca, burmanicoides, banksii, siamea, zebrina, microcarpa, errans, malaccensis.*

La primera clasificación científica del banano le dio el nombre de *Musa sapientum* a los bananos maduros que se comen crudos y *Musa paradisiaca* a los plátanos que se consumen verdes.

El banano es una planta herbácea grande con un tallo subterráneo ramificado, raíces y brotes vegetativos, un pseudotallo y hojas que poseen aberturas llamadas estomas las cuales controlan el intercambio de CO₂ cuyo número 3 veces más grande en el envés de la hoja (SANTOS, 2001).

En la sección *Eumusa* del Género *Musa* están divididos por dos principales especies: *M. Acuminta Colla* y *M. Balbisiana Colla*, existiendo distintos niveles de ploidía, así: diploides, triploides, tetraploides. Con grupos genómicos AA, AB, AAA, ABB, BBB, AAAA, AAAB, AABB, ABBB (SANTOS, 2001).

El banano es considerado como un alimento básico por ser una fuente de energía y contener una alta cantidad de vitaminas como C, A y B6 así como también altos niveles de varios minerales como calcio, potasio y fósforo. En uno de los más recomendados para dietas alimenticias especialmente en períodos de lactación de bebés y mujeres embarazadas (INIBAP, 2000) .

ELEMENTO	CANTIDAD
Humedad	72.9
Calorías	96
Proteína	1.2
Grasa	0.3
Carbohidrato	24.9
Fibra	0.3
Ceniza	0.7
Calcio	13
Fósforo	19
Hierro	0.7
Vit B ₁	0.02
Vit B ₂	0.02
Vit B ₃	0.8
Vit C	13
Vit A	16.6

Para un F.C de 0.71

ANEXO B

SIGATOKA NEGRA

Es la enfermedad de banano que golpea económicamente con más fuerza a los cultivos de Latinoamérica y el Caribe.

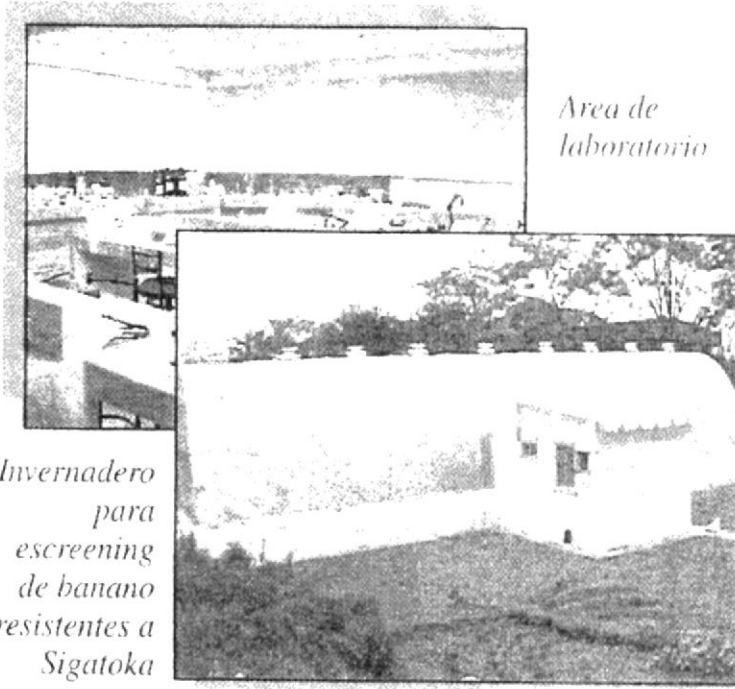
Fue reconocida por primera vez en el Sur del Pacífico, con una primera notificación en el mes de Febrero de 1963 en el distrito de Sigatoka de la isla de Viti Levu en Fiji. Desde ese entonces empezó a esparcirse por la mayoría de las regiones bananeras en el mundo, siendo detectada en el Norte de Ecuador en 1986 y después de cuatro años en las zonas del Sur (JONES, 1999).

Su agente causal es el hongo *Mycosphaerella fijiensis* cuyos tubos germinativos penetran por las estomas de las hojas después que sus esporas se depositan en la superficie húmeda y germinan dentro de 2 a 3 horas (25-28°C) infectando, de manera que se destruyen las hojas del banano, lo que conlleva a una reducción del rendimiento y una prematura maduración del fruto.

Los variedades de banano han sido clasificadas de acuerdo a la resistencia o susceptibilidad a la Sigatoka Negra, siendo susceptibles (S), tolerantes (T), altamente resistentes (HR), y altamente resistente por hipersensibilidad (HR(HS)).

ANEXO C

CIBE



Area de laboratorio

Invernadero para screening de banano resistentes a Sigatoka

Cañada de la Musas - ESPOL





ACCESIONES TRAIIDAS DEL INIBAP ITC

UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE CUSCO

Numeración CIBE	Código ITC	Nombre de accesión	Resistencia a Sigatoka	Ploidía
1	ITC.0249	Calcutta 4	HR (HS)	AA
2	ITC.0269	Niyarma Yik	S	AA
3	ITC.0395	Lidi	T	AA
4	ITC.0504	FHIA-01	T	AAAB
5	ITC.0505	FHIA-02	T	AAAB
6	ITC.0506	FHIA-03	T	AAAB
7	ITC.0610	Tuu Gia	HR	AA
8	ITC.0611	Pisang Berlin	S	AA
9	ITC.1123	Yangambi Km5	HR(HS)	AAA
10	ITC.1247	T6	HR	AAAA
11	ITC.1256	Gran Enano	S	AAA
12	ITC.1264	FHIA-17	T	AAAA
13	ITC.1265	FHIA-23	T	AAAA
14	ITC.1267	IRFA 905	T	AA
15	ITC.1268	IRFA 908	T	AAAB
16	ITC.1271	GCTCV-215	S	AAA
17	ITC.1282	GCTCV-119	S	AAA
18	ITC.1297	TMPx 5295-1	T	AABB?
19	ITC.1307	SH-3640	T	AAAA
20	ITC.1320	B 7925	T	AAA
21	ITC.1344	CRBP 39	T	AAAB
22	ITC.1412	FHIA 18	T	AAAB

ANEXO D

Pathogenesis-Related Proteins of Plants

Huib J. M. Linthorst, Ph.D.

Department of Biochemistry, University of Leiden, Einsteinweg 5, 2333 CC Leiden, The Netherlands

Referee: L. C. Van Loon, Ph.D., Department of Plant Physiology, Biochemical Centre, Agricultural University, 6703 BD Wageningen, The Netherlands

ABSTRACT: Infection of plants with pathogens like viruses or fungi often leads to a response of the host ranging from very mild to very severe. A very mild response usually does not result in considerable changes in the patterns of gene expression of the plant. However, a hypersensitive reaction, e.g., in the case of infection of Samsun NN tobacco with tobacco mosaic virus, is accompanied by a massive increase in the amounts of a large number of different proteins. Among these induced proteins are members of a group of so-called pathogenesis-related (PR) proteins. Frequently, the hypersensitively reacting host becomes resistant to subsequent pathogenic attack. The correlation of this phenomenon of acquired resistance and the induced protein synthesis suggests a direct involvement of these proteins in the observed replication deficiency of the pathogen. This has initiated studies by several research groups toward a better understanding of the role of these PR-proteins in the hypersensitively reacting plant. This review deals with the progress that has been made with the analysis of the host response and the function of the PR proteins in the acquired resistance.

KEY WORDS: acquired resistance, PR-proteins, chitinase, β -1,3-glucanase, thaumatin-like proteins, tobacco, stress-induced proteins, vacuolar proteins, extracellular proteins, plant defense.

1. INTRODUCTION

Plants confronted with phytopathogens like viruses, viroids, fungi, or bacteria may react to the challenge in a number of different ways. Among the interactions produced from such challenges several can be distinguished:

1. Non-host interaction. The pathogen is incapable of replication and the plant is not in any apparent way suffering from the interaction. Most interactions between plants and pathogens will be of this type.
2. Compatible interaction. Upon entry, the pathogen establishes an initial infection where it can multiply and from where it can spread systemically through the plant. This type of infection is frequently accompanied by the accumulation of massive amounts of

the pathogen and the occurrence of symptoms which may vary from very mild to very severe. An example of such an interaction is the infection of tobacco with alfalfa mosaic virus, in which the virus can reach titers of more than 2 g/kg of leaf.

3. Incompatible interaction. The invading pathogen is capable of establishing an initial infection in a region at or near the site of entry, but lacks the capacity to systemically spread through the plant. In many cases, the plant actively resists the threatening pathogen and successfully contains it in the region immediately surrounding the initial infection site. Frequently, these initial infection sites turn into necrotic lesions and it is said that the plant reacts hypersensitively. An example of such an infection is that of Samsun NN tobacco with tobacco mosaic virus (TMV).



ANEXO E

Antimicrobial Peptides from Plants

BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TÉCNICAS

Willem F. Broekaert,¹ Bruno P. A. Cammue,¹ Miguel F. C. De Bolle,¹
Karin Thevissen,¹ Genoveva W. De Samblanx,¹ and Rupert W. Osborn²

¹F. A. Janssens Laboratory of Genetics, Katholieke Universiteit Leuven, Willem de Croylaan 42, B-3001 Heverlee, Belgium; ²ZENECA Agrochemicals, Jealott's Hill Research Station, Bracknell Berkshire RG42 6ET, U.K.

* Address for correspondence: Willem F. Broekaert, F. A. Janssens Laboratory of Genetics, Katholieke Universiteit Leuven, Willem de Croylaan 42, B-3001 Heverlee, Belgium.

Referee: Dr. K. Nielson, Danisco Biotechnology, Copenhagen, Denmark

ABSTRACT: Peptides with antimicrobial properties are present in most if not all plant species. All plant antimicrobial peptides isolated so far contain even numbers of cysteines (4, 6, or 8), which are all pairwise connected by disulfide bridges, thus providing high stability to the peptides. Based on homologies at the primary structure level, plant antimicrobial peptides can be classified into distinct families including thionins, plant defensins, lipid transfer proteins, and hevein- and knottin-type antimicrobial peptides. Detailed three-dimensional structure information has been obtained for one or more members of these peptide families. All antimicrobial peptides studied thus far appear to exert their antimicrobial effect at the level of the plasma membrane of the target microorganism, but the different peptide types are likely to act via different mechanisms. Antimicrobial peptides can occur in all plant organs. In unstressed organs, antimicrobial peptides are usually most abundant in the outer cell layer lining the organ, which is consistent with a role for the antimicrobial peptides in constitutive host defense against microbial invaders attacking from the outside. Thionins are predominantly located intracellularly but are also found in the extracellular space, whereas most plant defensins and lipid transfer proteins are deposited exclusively in the extracellular space. In a number of plant species, a strong induction of genes expressing either thionins, plant defensins, or lipid transfer proteins has been observed on infection of the leaves by microbial pathogens. Hence, antimicrobial peptides can also take part in the inducible defense response of plants. Constitutive expression in transgenic plants of heterologous antimicrobial peptide genes has been achieved, which in some cases has led to enhanced resistance to particular microbial plant pathogens.

KEY WORDS: antifungal, defense, defensin, hevein, knottin, lipid transfer protein, molecular breeding, pathogen, resistance, thionin, transgenic plant.

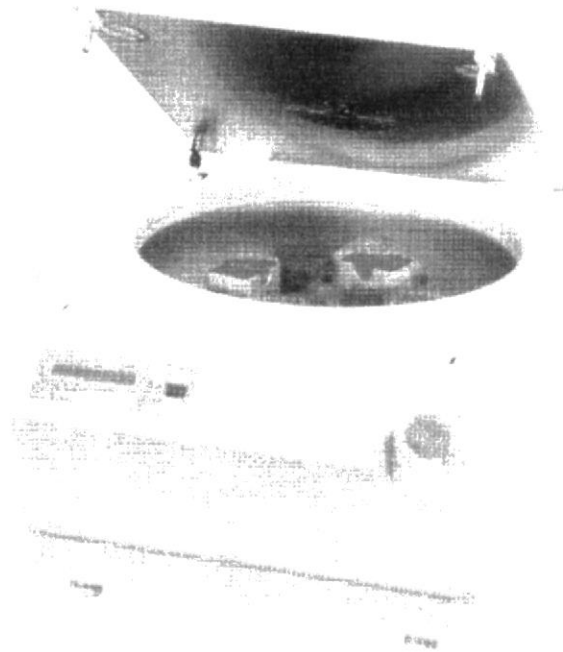
I. INTRODUCTION

Despite the fact that animals and plants are continuously exposed to microbes during their lifespans, microbial infections which threaten their survival as individuals do not occur very frequently. This implies that higher organisms must have evolved highly

effective mechanisms to restrict the growth of microorganisms inside their tissues. The complexity of these defense mechanisms generally correlates with that of the organism, with higher vertebrates possessing the most multifarious system. An important component of the higher vertebrate defense system is the adaptive immune response, which

ANEXO F

Centrífuga refrigerada



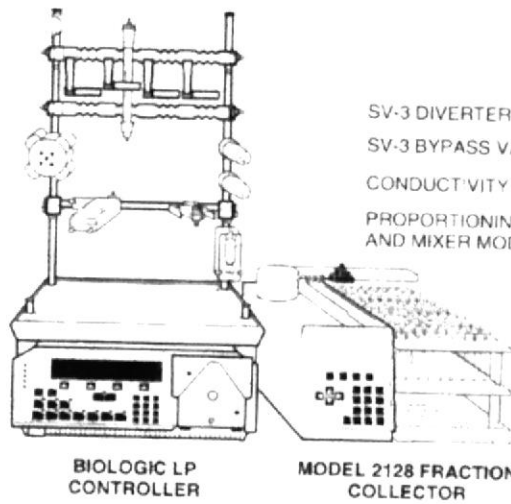
BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

ANEXO G

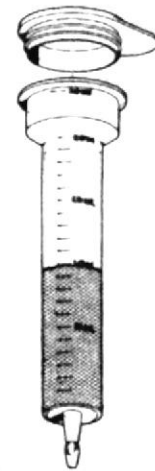
Columna cromatográfica

Cromatógrafo

SV-5 BUFFER SELECT
UV OPTICS MODULE
SYSTEM RACK



BioLogic LP System



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

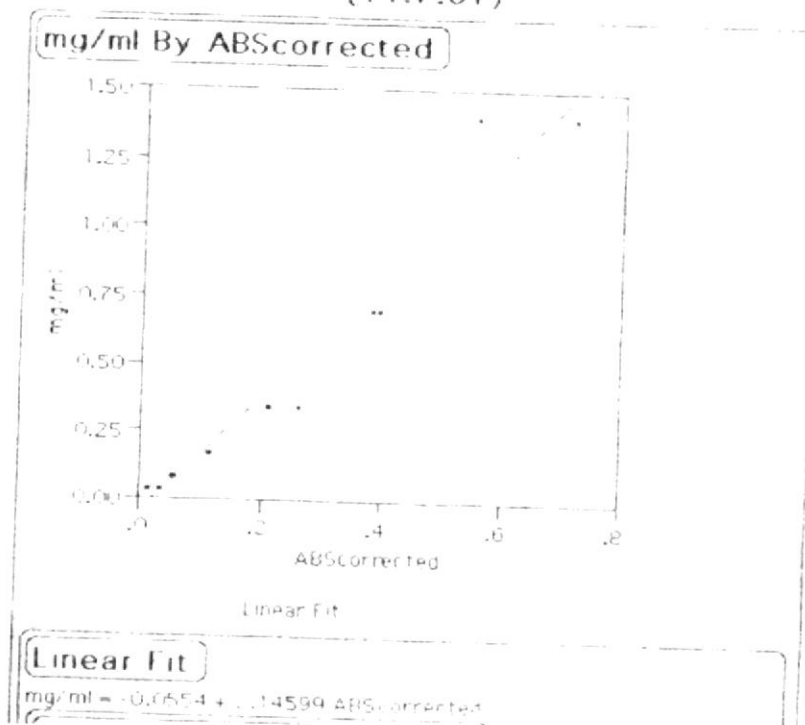
Curva de cromatografía de filtración por gel

ANEXO H

BioRad Bradford



PROTEIN STD CURVE
(11.7.01)

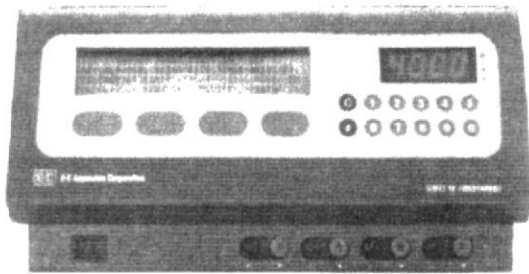


BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

ANEXO I



Equipo de electroforesis (Fuente de poder) ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE TECNOLOGÍA



Extracción de gel de poliacrilamida





ANEXO J

BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

CLASES DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) poseen una amplia actividad antimicrobiana contra hongos y bacterias y la mayoría no son tóxicos para las plantas. A continuación se describen AMPs que poseen un tamaño de hasta 10 kDa (SÁGI, 1999).

Tioninas.- Además de su actividad antibacteriana inhiben el crecimiento *in vitro* de cerca de 20 distintos patógenos fúngicos incluyendo *Fusarium spp.*, *B. cinerea*, *P. infestans* y *Rhizoctonia solani* (CAMMUE *et al.*, 1992; MOLINA *et al.*, 1993a). Las tioninas poseen una masa de 5 kDa y poseen de seis a ocho cisteínas. Estos péptidos se dividen en cinco clases. Las tioninas tipo III son viscotoxinas del semiparasito *Viscum album*. HOLTORF *et al.* (1998) ha expresado la viscotoxina A3 en *Arabidopsis thaliana* en donde dichas plantas transgénicas aumentaron su nivel de resistencia hacia el patógeno *Plasmodiophora brassicae*. Asimismo EPPLE *et al.* (1997) observó resistencia hacia el patógeno *F. oxysporum* f. sp. *Matthiolarae* en *Arabidopsis*. Todo esto indica que las tioninas son proteínas de defensas (SÁGI, 1999).

Defensinas de plantas.- Estos péptidos antimicrobianos se encuentran muy relacionados con defensinas de insectos (BROEKAERT *et al.*, 1995) y contienen ocho cisteínas unidas por disulfuros (SÁGI, 1999). Al menos en 20 plantas se conoce que poseen defensinas. Muchas defensinas son tóxicas a

Mycosphaerella fijiensis y *F. oxysporum* f. sp. *cubense* en ensayos de laboratorio (CAMMUE *et al.*, 1993). Se han introducido cDNAs en plantas de banano (REMY, 2000) que codifican la defensina morfogénica *Rs*-AFP2 de *Raphanus sativus* (TERRAS *et al.*, 1992b) y las defensinas no morfogénicas *Dm*-AMP1 de *Dahlia merckii* y *Ah*-AMP1 de *Aesculus hippocastaneum* (OSBORN *et al.*, 1995). Las defensinas morfogénicas causan una reducción en la elongación de la hifa y ramificación de la misma, mientras que las defensinas no morfogénicas disminuyen la elongación de la hifa sin un visible efecto morfológico (REMY, 2000).

Proteínas de transferencia de lípidos no específicas (nsLTPs).- Estos péptidos poseen de 9 a 10 kDa que contienen 8 cisteínas unidas por disulfuros (KADER, 1996). Pocos nsLTPs poseen moderada o alta actividad antifúngica a un amplio rango de hongos incluyendo *Fusarium spp.*, *B. cinerea* y *P. oryzae* (TERRAS *et al.*, 1992; CAMMUE *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 1993b; Segura *et al.*, 1999; García-Olmedo *et al.*, 1998). Uno de estos nsLTPs ha sido expresado en plantas de banano transgénico (REMY, 2000).

Proteínas de enlace de quitinas no enzimáticas.- Un ejemplo de estos péptidos antimicrobianos es la heveína que proviene del árbol de caucho (RAIKHEL *et al.*, 1993); AMPs provenientes de semilla de amaranto (DE BOLLE *et al.*, 1993) y de *Pharbitis nil* (Koo *et al.*, 1998) son inhibidoras *in vitro* en diversos hongos patógenos.