



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL
INSTITUTO DE TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE TECNOLOGIA EN ALIMENTOS
INFORME DE PRACTICAS
PROFESIONALES

PREVIO A LA OBTENCION DEL TITULO DE
TECNOLOGO EN ALIMENTOS

REALIZADO EN:

Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
CIBE - ESPOL

AUTOR :

Luis Daniel Machado Rodríguez

PROFESOR - GUIA

Ing. Angela Naupay

PROFESOR SEGUNDA REVISION :

Ing. Fabiola Cornejo



AÑO LECTIVO
2000 - 2001
GUAYAQUIL - ECUADOR

T
634.772
M.A.C.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS

PROGRAMA DE TECNOLOGÍAS EN ALIMENTOS

INFORME DE PRÁCTICAS PROFESIONALES

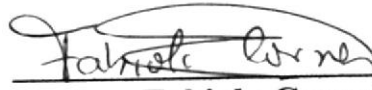
Previo a la obtención del título de Tecnólogo en Alimentos

**Realizado en : Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
CIBE – ESPOL**

Autor : Luis Daniel Machado Rodríguez.



Ing. Angela Naupay
Profesor guía



Ing. Fabiola Cornejo.
Profesor segunda revisión

AÑO LECTIVO

2000- 2001

GUAYAQUIL – ECUADOR.

Guayaquil, 7 de Julio del 2000.

Ing. Angela Naupay.

COORDINADORA DE PROTAL.


En su despacho.-

De mis consideraciones:

Saludándole cordialmente, me dirijo a Usted respetuosamente para poner a su disposición y conocimiento mi informe de **PRÁCTICAS PROFESIONALES**, realizadas en el proyecto “ *Mejoramiento Genético en Musa, sustentable, para la resistencia a Sigatoka Negra*” dirigido por el DR. Rodolfo Maribona, durante el tiempo comprendido entre 1ro de Febrero del 2000 a Junio del presente año.

Esperando que este informe sea de su agrado, me suscribo a Usted.

Atentamente.



Luis Daniel Machado Rodríguez



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

"Ciencia, Tecnología y Educación al servicio del País"

CERTIFICADO.

Por medio de la presente certifico que el Señor **LUIS DANIEL MACHADO RODRÍGUEZ**, ha realizado sus Prácticas Profesionales en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador – **CIBE**, durante el período de Febrero del 2000 a Junio del 2000.

Durante su trabajo en el proyecto se ha destacado por su buen desempeño, cumplimiento y responsabilidad en las labores encomendadas.

El Señor Luis Daniel Machado Rodriguez, puede dar uso al presente documento cuando estime conveniente.

Atentamente,

Dr.
Rodolfo Maribona
Promotor del Componente # 3
Proyecto VLIR-ESPOL (C.I.B.E)

INDICE

Contenido	Págs
Carta de Presentación.	
Certificado	
Resumen	
Introducción	
Objetivos	1
Detalle de las labores realizadas	2
Capítulo 1: Generalidades	
Generalidades	4
Sigatoka	5
1.2 Síntomas	5-6
1.3 Distribución de la enfermedad	6
Métodos de control	7
Proteínas relacionadas a la patogenicidad en musa SPP.	7-8
Capítulo 2: Teoría.	
2.1 Métodos Electroforéticos.	10
2.2 ¿Qué es la electroforesis?	10
2.3 Principios Básicos	11-12
2.4 Electroforesis Frontal	13
2.5 Electroforesis Zonal	14
2.6 Equipamiento	14
2.7 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida	15
2.8 Selección del Sistema Buffer y Gel	15-16
2.9 Diferentes formas de los Geles de Poliacrilamida	16-17
2.10 Sistemas de separación en Geles de Poliacrilamida	17-18
2.11 Método del Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)	18
2.12 Detección de Proteínas	19-20

Capítulo 3: Equipo de Electroforesis BIO – RAD

Pasos a seguir para correr una gel de electroforesis	21
Preparación de los geles	23

Capítulo 4: Materiales y Métodos.

4.1 Materiales	26
4.2 Metodología	27
4.3 Extracción de Proteínas en hoja de banano (Ácida y Alcalina)	27
4.4 Extracción de Proteínas	28
4.5 Plantas	28
4.6 Extracción de Proteínas	28-29

Capítulo 5: Resultados.

Gel de SDS – Page	30
Gel # 1 de Proteínas de hoja de banano	31
Gel # 2 de Proteínas de hoja de banano.	32

Conclusiones	33
--------------	----

Recomendaciones	34
-----------------	----

Bibliografía	35-36
--------------	-------

Anexos	
--------	--

BI
Econ
F. I.
2017

INTRODUCCIÓN.

El banano y el plátano (ambos *Musa spp.*) son los cultivos mayores de la agricultura ecuatoriana: El banano representa el 80% de la exportación agrícola y más del 30% del P.I.B. El plátano es el recurso alimentario de mayor consumo en la población ecuatoriana.

La producción de plátano y banano es fuertemente afectada (30-50% de pérdidas en rendimiento) por la enfermedad fungosa de la Sigatoka Negra (causada por *Mycosphaerella fijiensis*). Esta enfermedad en el banano es controlada por la aplicación masiva de fungicidas (15-20 ciclos/año), creando el impacto ecológico más dramático en la región. Sin embargo, la producción de plátano para consumo nacional ha sido seriamente afectada, debido a que las grandes poblaciones marginales del campo no tienen recursos financieros para el control fungicida de la enfermedad.

El impacto económico, social y ecológico de la Sigatoka Negra en la sociedad ecuatoriana se ha hecho más crítico, debido al efecto de “El Niño”; incrementándose los niveles de ataque fungoso y destruyéndose miles de hectáreas de plantaciones de *Musa*.

Es bien conocido que el control más efectivo y duradero de las enfermedades de las plantas se logra mediante la explotación de variedades genéticamente resistentes. Sin embargo, no obstante que existen clones promisorios resistentes, de diferentes instituciones y países, ninguno de ellos ha tenido éxito en la extensión agrícola. La mayoría de estos clones híbridos, resistentes al ataque de *Mycosphaerella fijiensis*, han introducido, como resultado del cruzamiento, caracteres comerciales indeseables. Otro grupo de clones, “recombinantes - resistentes”(obtenidos por ingeniería genética), ha incorporado genes exógenos de proteínas antifúngicas al genoma de *Musa*.

Estos clones “recombinantes”, no obstante que son los mismos clones comerciales actuales pueden presentar dificultades en su comercialización. Existen antecedentes, en los grandes mercados, de una percepción de rechazo a frutos de consumo humano, portadores de genes extraños a la planta.

BIBLIOTECA
MUSEO LAS TERNERAS

No se descarta la inestabilidad genética de este tipo de resistencia “recombinante”. La expresión de los genes de proteínas antifúngicas está sometida a los mecanismos moleculares usuales, de la planta, de modificación del genoma y regulación genética. Estos mecanismos pueden interferir la expresión, modificar o eliminar los genes de las proteínas antifúngicas introducidos en el genoma de la planta. La mutabilidad del patógeno también, puede contribuir a la inestabilidad genética de la resistencia. El hongo, ante tal tipo de acción fungicida, al igual que sucede con los fungicidas químicos, pueden sufrir mutaciones; de resistencia a la acción fungicida de la proteína incorporada a la planta.

En los últimos años, la comunidad científica internacional, debido a la importancia socioeconómica y ecológica de *Musa spp.* y a la lentitud e ineficacia de los programas convencionales de mejoramiento genético, ha intensificado la aplicación de los enfoques y tecnologías moleculares, al estudio de la estructura y expresión del genoma de esta especie.

Estas tecnologías de avanzada, contribuirán, sin lugar a dudas, a lograr nuevas variedades, capaces de satisfacer, los altos rendimientos y la resistencia a enfermedades y plagas, que necesitan los agricultores y la inaplazable demanda del mercado y de la naturaleza, de producir bananos y plátanos libres de sustancias tóxicas.

Este proyecto desarrollará la capacidad científica para crear y transferir tecnologías de avanzada, para introducir y lograr nuevas variedades en el Ecuador, y no sólo tenderá a resolver un problema nacional muy importante sino que también servirá como modelo de desarrollo de importantes disciplinas, tales como; la Genética y Biología Molecular, Fitopatología y Biología Celular, que constituyen las bases del mejoramiento genético y fitosanitario de la agricultura moderna.

OBJETIVOS:

Del Componente:

- Mejorar la resistencia genética de *Musa* spp. para la Sigatoka Negra.
- Crear las capacidades científica, técnica y de entrenamiento; laboratorios, cursos de postgrado e infraestructura de extensión para el desarrollo de la Biotecnología de las Plantas; Biología y Genética Molecular, Biología Celular y Fitopatología.

Del Área de Inmunoquímica:

- Obtención, purificación y caracterización bioquímica de proteínas relacionadas con la patogenia (PR-P) y con la resistencia genética (RR) de plantas de *Musa* sp. infectadas con el hongo *Micosphaerella fijiensis*, causante de la enfermedad de la Sigatoka Negra.
- Obtención, purificación y caracterización inmunoquímica e inmunológica de proteínas PR y RR de *Musa* sp. Infectadas con el hongo *Micosphaerella fijiensis*.

Mis objetivos:

- Establecer la metodología de extracción de PR-P a pH ácido y pH alcalino.
- Establecer la técnica de Electroforesis SDS-PAGE para observar los patrones proteínicos y de PR-P de hojas de banano.

BIBLIOTECA
DE ESCUELA DE INGENIERIA

DETALLE DE LAS LABORES REALIZADAS.

Durante el período de Prácticas Profesionales, me desempeñé como Asistente de Investigación del Proyecto “ *Biotecnología para el desarrollo sustentable de Musa spp.*” auspiciado por el Consejo de Universidades Flamencas de Bélgica y la Escuela Superior Politécnica del Litoral, con una duración de cuatro años, y en el cual tuve bajo mi responsabilidad las siguientes funciones en el Área de Proteómica, Laboratorio de Inmunoquímica:

- Investigación bibliográfica sobre los diferentes temas que abarca el proyecto.
- Presentación de informes quincenales a los jefes de áreas.
- Aprender las Técnicas de Inmunoquímica.
- Establecer una metodología de extracción de proteínas de hoja de banano de campo.
- Establecer una metodología de extracción de proteínas de hoja de banano in vitro.
- Realizar ensayos experimentales aplicando las técnicas de electroforesis.
- Identificación de Proteínas relacionadas a la patogenicidad.

RECIBIDO
FEBRERO 2014



BANANAS



PIBLOTTO
DE ESTADOS UNIDOS

I. GENERALIDADES.

El banano es uno de los cultivos tropicales más extendidos, cubriendo áreas de África, Asia y América. Las importaciones totales mundiales alcanzan once millones de toneladas (FAO, 1993). En Ecuador está involucrados más de 400.000 trabajadores y beneficiados alrededor de millón y medio de personas (CONABAN, 1999).

Ningún aspecto ha contribuido tanto al desarrollo y mantenimiento de la industria bananera a través de los trópicos, como los adelantos en el manejo de plagas. La tecnología en el control de enfermedades tendrá que avanzar a través de la investigación científica para proveer soluciones a las presentes y a las posibles nuevas y destructivas enfermedades (LARA 1970).

La Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* es una de las enfermedades de mayor diseminación afectando a los cultivares de banano. El costo de control químico, para esta enfermedad, en los cultivares comerciales para exportación, está valorado aproximadamente en 100 millones de dólares anuales (localmente puede alcanzar alrededor del cincuenta por ciento de los costos totales de producción).

En Centroamérica la producción para consumo local y exportación ha sufrido una caída severa debido a ésta enfermedad. Por esto, la obtención de cultivares de banano y plátanos resistentes es de vital importancia económica para la industria bananera.

Igualmente para los agricultores con una pequeña extensión de cultivo, el uso de fungicidas implica un gasto oneroso además de un riesgo a su salud. (ROBINSON, 1999; SWENNEN, 2000).

Los bananos y plátanos son productos sumamente importantes como alimentos básicos.

Además de su importancia como productos de exportación de los países de Centro y Sudamérica.

La epidemia de la Sigatoka en Centroamérica desde su principio, causó el aumento de los costos de la producción de banano. En costos los rubros destinados al control de la Sigatoka se ubican en un 27%. Mientras que los costos de otras enfermedades en banano solo significan el 2-3%. Colectivamente los costos del control de la Sigatoka negra se encuentran alrededor de los 10 millones de dólares americanos.

En América latina, la Sigatoka negra se descubrió por primera vez en Honduras en 1972. Se propagó hacia el norte (Guatemala, Belice, sur de México) y hacia el sur (El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia). Se ha registrado recientemente en Venezuela, Cuba, Jamaica y en la República Dominicana y Florida desde donde amenaza con propagarse al resto del caribe. Los fungicidas sistemáticos son los que permiten mejor la lucha contra esta enfermedad pero sus efectos sobre el medio ambiente pueden ser devastadores.

I.1 SIGATOKA.

Las enfermedades de Sigatoka del banano están causadas por dos hongos ascomicetos emparentados: *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, que causa la Sigatoka negra (SN) o raya negra de la hoja y *M. musicola* Leach ex Mulder, que causa la Sigatoka amarilla (SA) o Sigatoka común. Los dos patógenos pueden ser distinguidos morfológicamente esencialmente por las características morfológicas de las conidias y los conidióforos. El engrosamiento de las paredes celulares que se observa en la base de las conidias de *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton (anamorfo de *M. fijiensis*) está ausente de las conidias de *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton (anamorfo de *M. musicola*). Además, las conidias de *P. fijiensis* son en promedio más largas y más flexuosas que las de *P. musae*. Los conidióforos de *P. musae* son en general botelliformes y cortos mientras que los de *P. fijiensis* son alargados, a menudos curvos, y tienen cicatrices conidianas conspicuas. Estas diferencias entre los anamorfos se pueden observar directamente sobre las muestras de hojas y en cultivos esporulantes tras aislar al patógeno. También se han desarrollado métodos moleculares para la determinación de las dos especies.

I.2 SÍNTOMAS

Resulta a veces difícil establecer la diferencia entre los síntomas de la Sigatoka negra y los de la Sigatoka amarilla. De forma general, el primer síntoma aparece en el haz del limbo en forma de manchas longitudinales de un color amarillo pálido (Sigatoka amarilla) o marrón oscuro en el envés del limbo (Sigatoka negra) de 1 a 2 mm de largo, que aumentan de tamaño formando lesiones necróticas con halos amarillos y centro gris claro. Las lesiones pueden coalescer y destruir grandes áreas de tejido

foliar, acarreado una reducción del rendimiento y una maduración prematura de los frutos. La Sigatoka negra reviste más gravedad que la Sigatoka amarilla, puesto que sus síntomas se manifiestan en hojas más jóvenes (lo cual se debe generalmente a un mayor abundancia del inóculo) y por lo tanto ocasiona daños más importantes en los tejidos fotosintetizadores. Además, ésta afecta a muchos de los cultivares que resisten a la Sigatoka amarilla, como los del subgrupo de plátano (AAB). Las pérdidas de producción pueden alcanzar, en ciertos casos, más del 50 %.

Distribución de M. fijiensis y M. musicola en el mundo. La distribución de la SN en estas zonas requiere información adicional SA. Vista panorámica de una parcela de plátano muy infectada.

I.3 DISTRIBUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

La Sigatoka amarilla se identificó por primera vez en Java en 1902. Desde 1962 se ha documentado en la mayor parte de las zonas productoras de bananos del mundo, lo que la sitúa entre las principales enfermedades epidémicas. La Sigatoka negra, se identificó por vez primera en 1963 en la costa sudeste de Viti Levu (Islas Fiji). Seguidamente se ha registrado su presencia en el conjunto del Pacífico (estrecho de Torres y península del Cabo York en Australia, Papua Nueva Guinea, Islas Salomón, Vanuatu, Nueva Caledonia, Isla Norfolk, Estados Federados de Micronesia, Tonga, Samoa Occidental, Isla Niue, Islas Cook, Tahití y Hawai). También se ha observado en Asia (Bután, Taiwan, sur de China incluida la isla de Hainan, Vietnam, Filipinas, Malasia occidental y Sumatra en Indonesia). Sin embargo, la distribución de esta enfermedad en el sudeste asiático necesita clarificarse, particularmente en el archipiélago indonesio. En América latina, la Sigatoka negra se descubrió por primera vez en Honduras en 1972. Se propagó hacia el norte (Guatemala, Belice, sur de México) y hacia el sur (El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia). Se ha registrado recientemente en Venezuela, Cuba, Jamaica y en la República Dominicana, desde donde amenaza con propagarse al resto del Caribe. En Africa, esta afección se documentó por vez primera en Zambia en 1973 y en Gabón en 1978. Luego se extendió a lo largo de la costa occidental hacia Camerún, Nigeria, Benin, Togo, Ghana y Côte d'Ivoire. Presente igualmente en la República Democrática del Congo (ex Zaire), alcanzando Burundi, Ruanda, el oeste de Tanzania, Uganda, Kenia y la República Centroafricana. Hacia 1987, se introdujo en la Isla de

Pemba, y desde allí se propagó a Zanzíbar y a las zonas costeras de Kenia y de Tanzania. Actualmente, se encuentra también en Malawi y en las Comoras. La distribución actual es sin duda subestimada. Conidias y ascosporas son los medios de propagación local de la enfermedad de la Sigatoka negra y amarilla. Su difusión en grandes distancias parece ser que está ligada a los movimientos de germoplasma (retoños infectados, hojas enfermas) y las ascosporas transportadas por el viento. Actualmente, en el Pacífico y en las tierras bajas de América latina y de Africa, apenas se encuentra la Sigatoka amarilla, que ha sido sustituida completamente por la Sigatoka negra. En las plantaciones de Honduras se ha reportado que la Sigatoka negra ha remplazado a la amarilla en menos de tres años. No obstante, la Sigatoka amarilla se encuentra aún en las tierras bajas de Filipinas al cabo de 26 años de la introducción de la Sigatoka negra. La Sigatoka amarilla, mejor adaptada a los climas templados, predomina a menudo en alturas superiores a 1200-1400 m, en las que apenas se encuentra la Sigatoka negra.

I.4 MÉTODOS DE CONTROL

Los fungicidas sistémicos permiten luchar de forma eficaz contra la Sigatoka negra en las plantaciones comerciales, pero sus efectos sobre el medio ambiente son preocupantes. Aunque es posible reducir notablemente la frecuencia de los tratamientos si éstos se realizan en el marco de un sistema de predicción de la enfermedad, las poblaciones de *M.fijiensis* y de *M.musicola* han desarrollado una resistencia a ciertos de estos productos en el Caribe y América Central. La solución más apropiada a largo plazo es sin duda la resistencia genética a SN y SA, sobre todo para los pequeños productores que, por razones económicas, no pueden adquirir los productos químicos.

I.5 PROTEÍNAS RELACIONADAS A LA PATOGENESIDAD EN *MUSA* SPP.

Las proteínas relacionadas a la patogenia (PR) son un grupo heterogéneo de moléculas que son inducidas en plantas sometidas a un amplio rango de condiciones de estrés. Estas proteínas se pueden acumular intracelularmente o pueden ser secretadas a los fluidos intercelulares de las hojas. Aunque en algunas de estas proteínas se han identificado actividades enzimáticas de gluconasas y quitinasas, que podrían tener

propiedades antifungales y antibacteriales, *in vivo*, las funciones de muchas otras PRs en la defensa de la planta huésped son aún desconocidas.

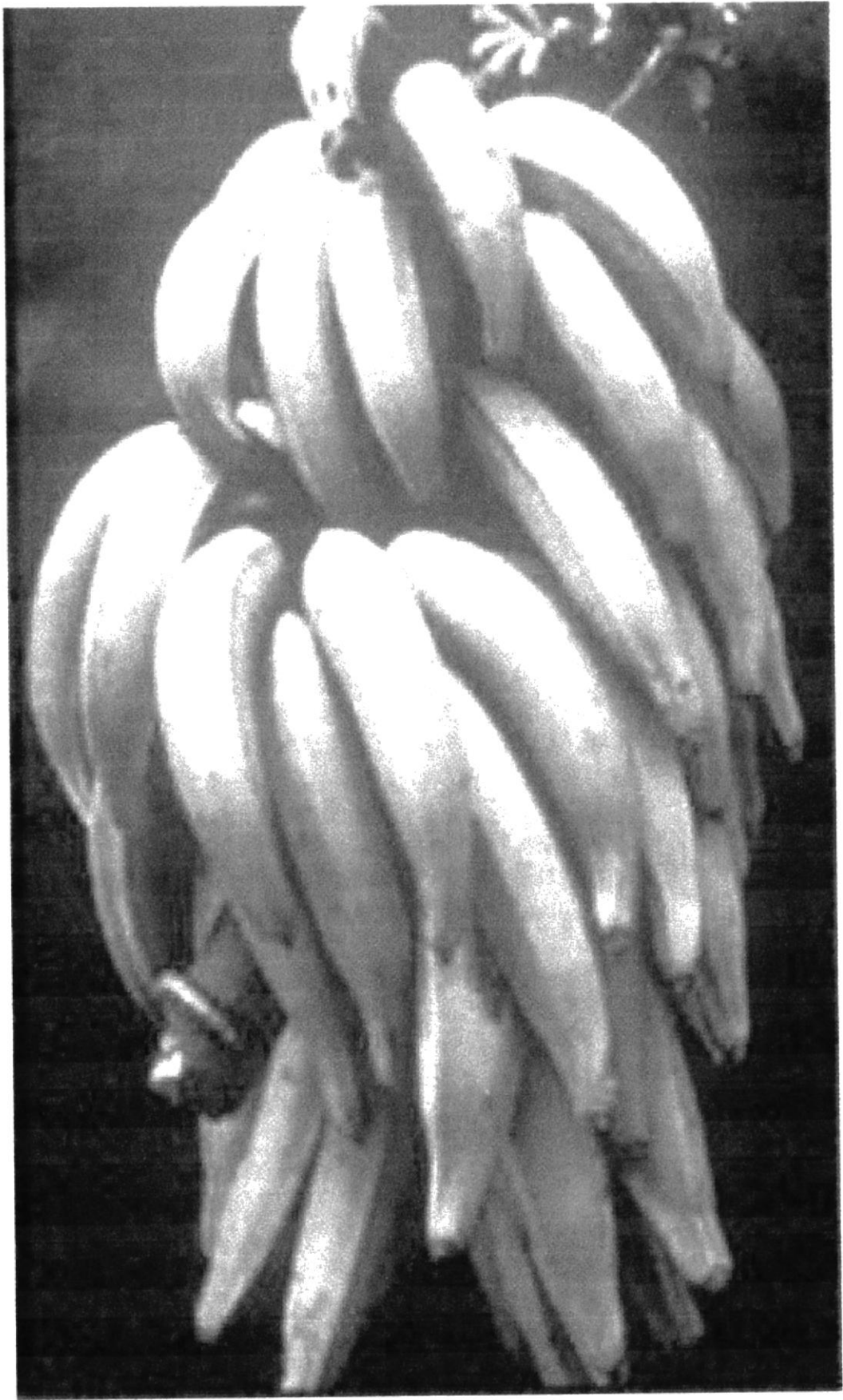
El uso potencial terapéutico de PRs contra patógenos comunes de cultivos comerciales importantes requieren del estudio de los mecanismos moleculares de inducción y protección que estas proteínas puedan tener. El uso de las propias moléculas de las plantas es preferible al uso costoso y nocivo de pesticidas.

Las plantas, así como cualquier otro organismo, debe contar con mecanismos de defensa contra potenciales patógenos. Uno de estos mecanismos es la producción de proteínas relacionadas a la defensa como respuesta a la interacción con el patógeno (Broekaert, 1997).

Las proteínas relacionadas con la defensa pueden tener actividad enzimática (glucanasas y quitinasas) o antimicrobianas (tioninas y defensinas) (Linthorst, 1991).

La investigación propuesta nos permitirá obtener información básica sobre los patrones proteínicos de plantas de banano susceptibles (Gran Nain) y resistentes (Yangambi Km5) a la Sigatoka Negra. Dichos patrones nos permitirán hacer una relación con las características de resistencia de la planta a Sigatoka Negra. Además, los patrones proteínicos de las hojas pueden servir como un método de clasificación taxonómica al identificar proteínas específicas asociadas a cada variedad.

Una caracterización inicial de PRs se hará en el cultivo comercialmente importante de *Musa* sp. Proteínas extraídas de la hoja de la planta serán extraídas y separadas por medio de Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Los patrones de proteínas de plantas normales serán comparados a aquellos de plantas sometidas a algún tipo de estrés (Infecciones de Hongos) para poder identificar posibles PRs involucradas en la protección de las plantas. Debido a que se ha observado un incremento en la actividad de proteasas en las respuestas hipersensitivas de plantas a infecciones, la actividad proteolítica de los extractos de la hoja de *Musa* también serán caracterizadas.



II. CAPITULO TEORICO.

II.1 MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS.

La caracterización molecular y estructural de una biomolécula tiene como requisito fundamental su obtención con un alto grado de pureza. La etapa clave en la mayoría de los estudios de biomoléculas es precisamente el proceso de separación.

Los métodos fundamentales de separación están comprendidos en tres grandes categorías:

1. Aquellos cuyo principio de separación es el Tamaño Molecular.
2. Los que se fundamentan en las diferencias de carga eléctrica.
3. Los basados en la especificidad biológica o química de la molécula.

II.2 ¿QUE ES LA ELECTROFORESIS?

La electroforesis es la migración de moléculas cargadas en la solución en respuesta a un campo eléctrico. Su índice de la migración depende de la fuerza del campo; en la carga, la talla y la dimensión de una variable del nett de las moléculas y también en la fuerza iónica, la viscosidad y la temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo. Como herramienta analítica, la electroforesis es simple, rápida y altamente sensible. Se utiliza analíticamente para estudiar las características de una sola especie cargada, y como técnica de la separación.

Electroforesis, movimiento de partículas eléctricamente cargadas a través de un gas o líquido como resultado de un campo eléctrico formado entre unos electrodos sumergidos en el medio. Si las partículas en suspensión se desplazan hacia el cátodo, el electrodo negativo, el proceso se denomina cataforesis; si lo hacen hacia el ánodo, el electrodo positivo, se habla de anaforesis. La electroósmosis es un fenómeno relacionado en el que se mantiene inmóvil la fase sólida y el líquido se desplaza debido al campo eléctrico aplicado.

Los métodos electroforéticos se pueden realizar en soluciones o en soportes sólidos. Los primeros son denominados frontales y los segundos zonales. Estos métodos electroforéticos hasta el momento sólo se utilizan en el rango analítico o a escala semi-preparativa.

No sólo sirven como métodos de separación de mezclas complejas, sino que se utilizan también como potentes criterios de pureza. Son además muy útiles para conocer las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un preparado crudo, lo que ayuda a seleccionar las mejores condiciones y tipo de intercambiador.

II.3 PRINCIPIOS BÁSICOS.

El término electroforesis se utilizó inicialmente para describir el comportamiento de partículas coloidales cargadas en un campo eléctrico.

Para referirse a la migración de solutos verdaderos se utilizó el término ionoforesis. En la actualidad se utiliza la electroforesis para designar la migración de cualquier clase de partículas bajo la acción de un campo eléctrico.

Como se va analiza la utilización de la electroforesis en la separación de las proteínas. Estas moléculas son partículas eléctricamente cargadas, debido a los grupos ionizables de las cadenas laterales de los aminoácidos y, también, a la asociación de componentes de naturaleza no proteica, como carbohidratos y lípidos entre otros. La mayoría de los grupos ionizables son relativamente débiles, por lo que la carga de la partícula depende del valor de pH del medio en que se encuentren.

La aplicación de un campo eléctrico (E), genera una fuerza (F) que actúa sobre las moléculas proteicas. Esta fuerza depende de la fortaleza del campo eléctrico y de la carga neta (z) de la molécula y está dada por la siguiente expresión.

$$F = E_z$$

La partícula comienza a moverse por acción de esta fuerza eléctrica y como resultado se manifiesta una fuerza de resistencia (F') debido a la fracción del medio.

LIBRERIA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

$$F' = 6 \pi r v \eta$$

Donde r = radio de la partícula, que se mueve con velocidad v , a través de un medio de viscosidad η . Cuando el medio es un gel, la ley de Stokes no se cumple estrictamente, ya que F' depende de una serie de factores, como las propiedades del gel y las dimensiones de la molécula.

La velocidad de migración se puede deducir si se tiene en cuenta que la partícula se acelera hasta que las dos fuerzas se igualan, o sea:

$$F = F'$$

por lo que

$$E_z = 6 \pi r v \eta$$

de donde

$$v = \frac{E_z}{6 \pi r \eta}$$

La velocidad de migración de una partícula en un campo eléctrico unitario ($E = 1$ V/cm) y bajo condiciones definidas, tales como tipo de buffer, pH, temperatura y características del medio, se denomina movilidad (u) y viene dada por:

$$u = \frac{Z}{6 \pi r \eta}$$

Por lo tanto se puede concluir que la relación entre la velocidad de migración, movilidad y fortaleza del campo eléctrico se expresa mediante:

$$v = Eu$$

La velocidad de migración es en función del voltaje aplicado. A mayor voltaje, mayor es la velocidad de migración lo que genera un excesivo calor que puede traer como consecuencia la evaporación del buffer. Además si se trata de una electroforesis zonal, puede ocurrir destrucción parcial del soporte así como la desnaturalización de la proteína. En contraste cuando se aplica muy bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, como resultado del aumento en la difusión, debido a un tiempo muy prolongado de la corrida electroforética.

Con vistas a minimizar las fluctuaciones en el voltaje y la corriente por el calentamiento, es común realizar la electroforesis con fuentes de poder regulables que brindan voltaje y corrientes constantes, y en cámaras electroforéticas con sistemas de enfriamiento acoplados.

En general los métodos electroforéticos son valiosos para la separación de macromoléculas lábiles como son las proteínas, ya que se llevan a cabo en medios acuosos, bajo condiciones suaves de pH, fuerza iónica y generalmente a bajas temperaturas.

II.4 ELECTROFORESIS FRONTAL.

Los métodos electroforéticos frontales también se conocen como electroforesis de frente móvil. Históricamente, fue la primera modalidad de electroforesis utilizada para separar proteínas (Tiselius 1937).

Se realiza en soluciones libres y se efectúa en celdas en forma de U, en donde la muestra está disuelta en buffer apropiado.

Este sistema frontal sólo se pueden separar con un buen grado de pureza, el componente más móvil, en una de las cámaras verticales; y el más lento en la otra. Esta es la desventaja fundamental de la separación frontal como método preparativo.

Este método ha sido uno de los más utilizados para la determinación de puntos isoeléctricos e isoiónicos de las proteínas, pero ha estado muy limitado para separar los componentes de mezclas complejas. Hoy en día ha sido sustituido por métodos que emplean materiales sólidos como soportes, es decir la electroforesis zonal.

II.5 ELECTROFORESIS ZONAL.

Se caracterizan por incluir un medio sólido, como soporte, en la separación, cuando se aplica un campo eléctrico al sistema.

Si el propósito de la electroforesis es lograr la separación de los componentes de mezclas complejas, los mejores resultados se obtienen por ésta.

En esta modificación de la electroforesis clásica, se aplican cantidades de disolución de proteína a un soporte sólido, previamente impregnado con una solución buffer. Como soporte se pueden utilizar papel filtro, acetato de celulosa, almidón, agar y acrilamida, entre los fundamentales.

El gran poder resolutivo de la electroforesis zonal se debe a que se aplica una cantidad muy pequeña de proteína a una zona muy estrecha, mientras que la longitud del trayecto de migración es de unas cien veces mayor que la zona de aplicación.

II.6 EQUIPAMIENTO:

El equipamiento que se requiere para este tipo de electroforesis es simple:

Consta básicamente de una fuente de poder y una cubeta o cámara donde se coloca el soporte.

Las cámaras pueden ser verticales u horizontales, con dos electrodos que se conectan a la fuente.

II.7 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

En la actualidad, la mayor parte de estas separaciones se realizan en geles de poliacrilamida.

Una mezcla de proteínas que se desea analizar por electroforesis en geles de poliacrilamida, casi siempre consiste en moléculas que difieren en tamaño y en carga neta, por lo que pueden ser separadas en un número de bandas o zonas mediante ésta técnica.

II.8 SELECCIÓN DEL SISTEMA BUFFER Y DEL GEL.

La selección de las condiciones para una separación óptima es muy difícil, y casi siempre se requiere analizar la influencia de los diferentes factores (pH, concentraciones de monómeros y comonómeros, fuerza iónica, etc.) en la separación.

La electroforesis en gel de poliacrilamida se puede realizar a cualquier pH en el rango de 2 a 11; pero la desaminación de las proteínas o las reacciones hidrolíticas pueden ser severas, por debajo de pH 3 o por encima de pH 10. Se puede generalizar, que las proteínas básicas se separan mejor a valores de pH ácido, donde sus movilidades son mayores, mientras que la generalidad de las proteínas con puntos isoeléctricos comprendidos en un rango de pH entre 4 y 7.5(débilmente ácidas), tienden a ser mejor separadas en geles con valores de pH entre 8 y 9.

La fuerza iónica se debe mantener en un nivel que garantice la solubilidad de la muestra y a la vez, provea suficiente capacidad amortiguadora.

Mientras más concentrado es el buffer, menor es la resistencia eléctrica, y a mayor corriente transportada, a un valor dado de voltaje aplicado, mayor será el calor generado. Una alta fuerza iónica requiere del uso de un gradiente de voltaje bajo, para evitar el excesivo calentamiento. Esto lleva a un tiempo prolongado de electroforesis con riesgo de incrementar la desnaturalización y ensanchamiento de la banda debido a la difusión.

En la mayoría de los sistemas se emplea concentración de buffer en un rango entre 0.025 mol L^{-1} y 0.1 mol L^{-1} . No obstante, se pueden utilizar concentraciones sobre 0.5 mol L^{-1} con sistemas buffer fuertemente acídicos, ya que a bajos valores de pH, muchos de los ácidos débiles, que son los más usados, están pobremente ionizados y se necesitan buffers de alta concentración para dar la adecuada capacidad amortiguadora. Debido a la pobre ionización de estos buffers, no se eleva la corriente, ni se incrementan los efectos de calentamiento. Esto demuestra que, aunque es casi práctica universal referirse a los buffers en términos de molaridad, el parámetro más significativo es la fuerza iónica y no la molaridad.

II.9 DIFERENTES FORMAS DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA.

Existen tres formas diferentes de realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida: lámina horizontal, lámina vertical y varilla cilíndrica vertical.

El gel en forma de lámina horizontal se usa para muestras que se aplican en una pequeña ranura en gel, en la que se introduce un pedacito de papel de filtro impregnado en un volumen conocido de la solución. Esto tiene como ventaja que la muestra se puede colocar en cualquier parte del gel.

Si se aplica en el medio del gel una muestra de diferentes componentes con características ácido-básicas desconocidas, su migración hacia uno o ambos electrodos se puede detectar fácilmente, lo que permite conocer los componentes ácidos y básicos que contiene la mezcla. Otra ventaja adicional, es que se puede realizar la electroforesis en cámaras simples y económicas que sirven también para otros sistemas electroforéticos, como focalización isoelectrica, geles de agar y almidón, papel de acetato de celulosa, entre otros.

Los geles verticales, tanto en forma de láminas como en varilla cilíndrica, son técnicamente fáciles de realizar para sistemas que usen soluciones amortiguadoras multifásicas. En estos tipos de geles sólo se pueden detectar componentes que migren hacia un electrodo.

Se deben seleccionar condiciones de pH donde todos los componentes migren en una misma dirección o de lo contrario, realizar dos corridas separadas; una de dirección catódica y la segunda, anódica. La resolución de ambos tipos de geles verticales es similar, pero en la lámina se puede aplicar mayor cantidad de muestra, lo que es más útil con fines preparativos.

La mayor ventaja de los geles laminares (tanto verticales como horizontales), es que se pueden aplicar en un mismo gel, un mayor número de muestras bajo las mismas condiciones. Esto es muy útil en procedimientos de pesquizado, donde es necesario comparar varias muestras, o cuando una misma muestra se quiere analizar por diversos métodos.

II.10 SISTEMAS DE SEPARACIÓN EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

De la misma manera que hay diferentes formas de geles de acrilamida, hay diferentes sistemas de preparación. Los sistemas más utilizados son: gel uniforme y buffer homogéneo, o gel y buffer heterogéneos.

La principal desventaja del primer tipo es que la resolución no es tan buena como con los sistemas heterogéneos.

La baja resolución se debe a que en los sistemas que utilizan un mismo tipo de gel y de buffer, no hay un efecto concentrador de la muestra en los primeros estadios de la corrida, por lo que muestras diluidas, cuando se aplican en gran volumen, dan como resultado bandas muy anchas.

Si no se requiere alta resolución, los sistemas homogéneos tienen la ventaja de ser rápidos, sencillos de preparar y se puede conocer la composición del buffer. Como el valor de pH es constante y uniforme durante la separación, resulta muy útil cuando se están separando sustancias de limitada estabilidad con el pH.

La electroforesis con geles y buffers heterogéneos fue introducida inicialmente por Ornstein (1964) y Davis (1964), quienes la denominaron “electroforesis discontinua”, al no ser homogénea ni en el voltaje aplicado, ni el sistema buffer. En la actualidad esta técnica se realiza con dos tipos de geles: un gel concentrador o de poros grandes y

el gel separador o de poros pequeños. La separación se realiza en este último, donde la migración está determinada tanto por la carga, como por el tamaño molecular de las partículas.

En la parte superior se sitúa el gel concentrador, de una altura menor que la del gel del separador, donde la muestra proteica se concentra en forma de banda estrecha.

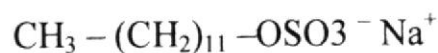
Esto es lo que determina la separación en bandas muy finas en el gel separador y por tanto el gran poder de resolución de este método.

El proceso de separación en buffer heterogéneo o multifásicos consiste en que al inicio del experimento, los constituyentes iónicos de las soluciones buffers son los mismos en ambos geles, el separador y el concentrador, aunque el pH es diferente. El buffer utilizado en los compartimentos de los electrodos es de composición diferente.

Es importante destacar, que en el gel concentrador no hay efecto de tamizaje molecular de los componentes de la muestra; éstos se concentran selectivamente de acuerdo con sus propiedades eléctricas. En el gel separador, los componentes de la muestra se separan tanto en función del peso molecular y la forma, como de la carga eléctrica.

II.11 MÉTODO DEL DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS).

El SDS es un detergente aniónico que tiene una larga cadena hidrófoba y una cabeza polar.



El SDS es un agente desnaturizante fuerte de las proteínas, por lo que producen un cambio de conformación nativa de estas a una conformación completamente desplegada.

Si se utilizan altas concentraciones de SDS, del orden de 1.4 g de SDS por gramo de proteína, se puede esperar que el número de moléculas de SDS enlazadas a la proteína

se corresponda con la mitad del número total de residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica. Esta cantidad de moléculas de detergente con carga negativa, es suficiente para eliminar las cargas intrínsecas de la cadena polipeptídica, de forma que la carga neta negativa, por unidad de masa, resulta constante. Por tanto, la migración electroforética es proporcional al radio molecular efectivo o, aproximadamente al peso molecular de la cadena polipeptídica. Este método se ha convertido en uno de los más utilizados para determinar el peso molecular de las proteínas.

Las razones son: el método es exacto y reproducible, el equipo necesario es simple, y los resultados se pueden obtener en pocas horas, con solo algunos microorganismos de la muestra.

Por otra parte, cuando se utiliza un agente reductor de puentes disulfuro como el 2-mercaptoetanol, y se conoce el peso molecular de la proteína nativa (por ejemplo: filtración en gel), se puede determinar el número de cadenas polipeptídicas.

II.12 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.

La visualización de la mayoría de las proteínas se logra mediante la utilización de agentes reveladores. Las bandas de proteínas separadas por electroforesis en geles son detectadas mediante diversas técnicas. Estas se seleccionan según el propósito de la separación y se agrupan en dos clases fundamentales, las técnicas de tinción positivas y de tinción negativa.

Al primer grupo pertenecen las técnicas que emplean colorantes orgánicos, modificadores químicos y precipitaciones selectivas de las proteínas.

Las técnicas del segundo grupo se fundamentan en la precipitación selectiva de sales de metales pesados en la matriz del gel, de forma que las bandas de proteínas contrastan por ser transparentes, libres de precipitado.

Varios tipos de colorantes orgánicos se han utilizado para detección de proteínas separadas electroforéticamente, tales como bromofenol azul, negro de amido y azul de Coomassie. Este último es uno de los más utilizados por su gran sensibilidad (100 a 500 ng de proteína por banda). Las tinciones con azul de Coomassie requieren un medio ácido que garantiza una atracción electrostática entre las moléculas del

colorante y los grupos aminos protonados de las proteínas. La atracción iónica entre las formas aniónicas del colorante y los grupos básicos de la proteína, conjuntamente con fuerzas de van der Waals estabilizan el complejo colorante – proteína. La intensidad de tinción de este colorante es seis veces superior a la del negro de amido lo que se debe a las diferencias en el número de moléculas que se enlazan a la proteína.

El incremento en la intensidad se debe, también a que el azul de Coomassie tiene una eficacia mayor en la formación de interacciones entre moléculas del colorante y por lo tanto se incrementa el número de moléculas de pigmento enlazados a la proteína. La técnica de tinción es muy sencilla y consiste sólo en dos etapas. La primera es la tinción en la cual el gel es sumergido en una solución de ácido acético, metanol y azul de Coomassie.

La siguiente etapa es la eliminación del exceso del colorante del gel. Para ello se utiliza una solución de ácido acético y metanol que extrae sólo el pigmento libre mientras que las bandas de proteína quedan teñidas de azul. El complejo proteína – azul de Coomassie es relativamente estable a valores de pH ácido.

III. EQUIPO DE ELECTROFORESIS BIO – RAD.

La corrida de una gel de electroforesis, lleva consigo la preparación de los geles y del equipo el cual a continuación va a ser detallado a continuación.

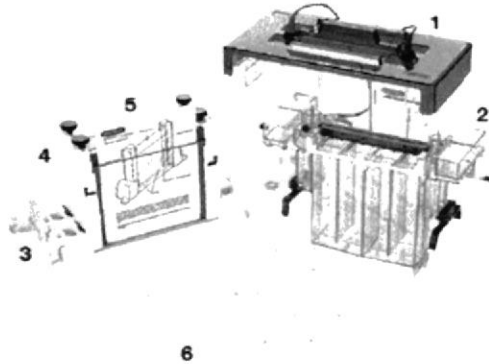


Fig 1. Equipo de Electroforesis BIO-RAD

PASO 1.

Lo primero es la limpieza del equipo con agua y detergente, esta limpieza deberá realizarse con guantes para evitar el contacto de nuestra piel con el equipo.

Se usa detergente, debido a que al ser una corrida de proteínas, con el detergente se espera eliminar cualquier residuo de proteínas extrañas al medio que puedan interferir con la determinación de proteínas.

PASO 2.

Colocar los vidrios de la gel (2) uno encima de otro, los cuales tienen una separación dada por unas bandas de plástico, como ilustra la figura 1.1.

Los vidrios fueron anteriormente desinfectados con alcohol y secados con gasa.

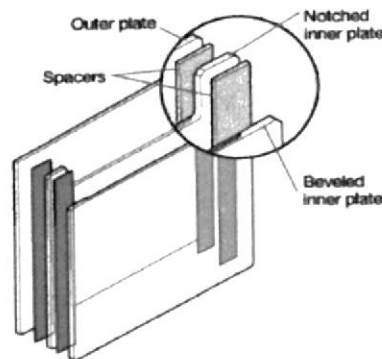


Fig 1.1.

PASO 3.

El siguiente paso es colocar los sujetadores de vidrios los cuales se colocan a cada extremo para lograr que queden bien sujetos, como ilustra la figura 1.2.

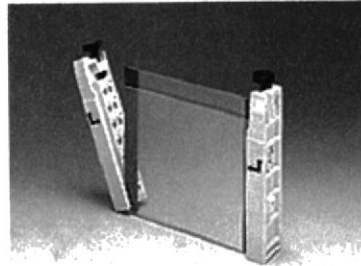


Fig 1.2.

PASO 4.

El siguiente paso es colocar los vidrios sobre un soporte especial el cual los va a inmovilizar, para luego proceder a ser llenados de los reactivos para lograr la running gel y la stacking gel, como muestra la figura 1.3.

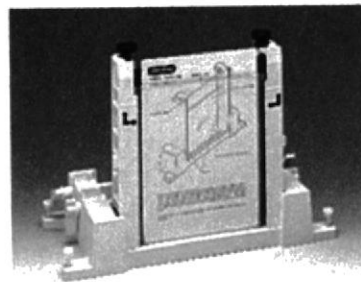


Fig 1.4.

PASO 5.

Se procederá a llenar primero con la running gel, y luego de que polimerice proceder a colocar la stacking gel, en los vidrios del aparato de electroforesis.

PREPARACIÓN DE LOS GELES.

Los geles se prepararán siguiendo los datos de las cantidades establecidos en el cuadro de abajo.

La colocación de la running gel se hace con pipeta, y se llena con 27ml.

	4%	6%	7%	8%
TRIZMA 1.5 M	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml
10% SDS	0.6 ml	0.6 ml	0.6 ml	0.6 ml
40% Acrylamide	6 ml	9 ml	10.5 ml	12 ml
DI	38.07 ml	35.07 ml	33.57 ml	32.07 ml
10% Amonium Persulfate	0.30 ml	0.30 ml	0.30 ml	0.30 ml
TEMED	0.030 ml	0.030 ml	0.030 ml	0.030 ml
VOLUMEN FINAL	60 ml	60 ml	60 ml	60 ml

10%	12%	15%	20%
15 ml	15 ml	15 ml	15 ml
0.6 ml	0.6 ml	0.6 ml	0.6 ml
15 ml	18 ml	22.5 ml	30 ml
29.07 ml	26.07 ml	21.57 ml	14.07 ml
0.30 ml	0.30 ml	0.30 ml	0.30 ml
0.030 ml	0.030 ml	0.030 ml	0.030 ml
60 ml	60 ml	60 ml	60 ml

Antes de colocar la stacking gel, deberá de haber pasado 1 hora, que es el tiempo que tarda en polimerizar la running gel.

Se coloca 250 uL de Butanol el cual crea una desfase en el gel, y este a la vez hace que el gel quede perfectamente definido tomando en su parte superior una forma horizontal perfecta.

STACKING GEL	
	4%
TRIZMA 0.5 M	5 ml
10% SDS	200 ul
40% Acrylamide	2 ml
DI	12.68 ml
10% Amonium Persulfate	100 ul
TEMED	20 ul
VOLUMEN FINAL	20 ml

PASO 6.

Colocar los vidrios con la gel polimerizada en el soporte que va en el interior del armazón del aparato de electroforesis BIO-RAD, como ilustra la figura 1.5.

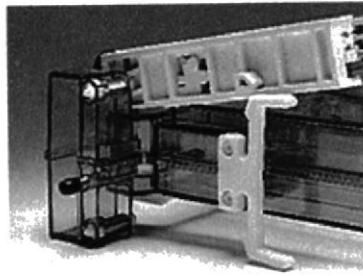


Fig 1.5.

PASO 7.

Antes de colocar la muestra en la gel se procede a llenar el armazón del aparato de electroforesis con buffer 5x.

PREPARACION DEL BUFFER 5X.

1. Tris base 15 g/L
2. Glycine 72 g/L
3. SDS 5 g/L

PASO 8.

Es la colocación de la muestra, como muestra la figura 1.6, colocando antes la peineta de electroforesis para crear los pozillos donde se va a alojar la muestra como muestra la figura 1.5.

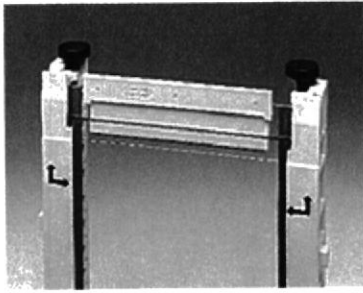


Fig 1.5.

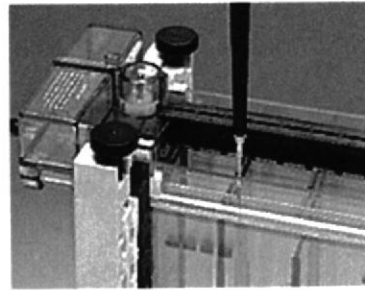


Fig 1.6.

PASO 9.

Es la conexión del equipo de electroforesis a la fuente de poder (figura 1.7), para proceder a aplicarle un voltaje de 100 voltios y comenzar a correr la gel.



Fig 1.7

RECTORIA
DE ESCUELAS TÉCNICAS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

IV.1 MATERIALES:

Plantas de banano.

Nitrógeno líquido.

Triz-Base

TEMED

Sodium Dodecyl Sulfate

Amonium Persulfate

Acrylamide/Bis Acrylamide

Glycerol

2-Mercaptoethanol

Bromophenol Blue

Glycine

Sodium Acetate

Ascorbic acid

EDTA

Triton X-100

Coomassie Blue R-250

Methanol

Acetic Acid

Benchmark protein ladder

Protean II XI Cell

Power Supplies EC600P

IV.2 METODOLOGÍA:

IV.2.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.

Se tomarán muestras de la hoja número 5 de plantas de banano sanas y enfermas estadio 2, susceptibles (Gran Nain) y resistentes (Yangambi Km5) a Sigatoka Negra, las hojas se congelarán en nitrógeno líquido y se ensayarán diferentes buffer de extracción.

IV.2.2 ELECTROFORESIS.

Las proteínas obtenidas en la extracción se separaran por medio de una electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reducidas.

IV.2.3 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR.

Para identificar los pesos moleculares de las proteínas separadas de banano se compara con un marcador estándar.

IV.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS EN HOJA DE BANANO:

La extracción de proteínas de la hoja de Musa se harán con los siguientes buffers:

A) Extracción ácida

- 0.5 M acetato de sodio
- 20 mM Beta – Mercaptoethanol
- 0.2% ácido ascórbico
- pH 5.2.

B) Extracción alcalina

- 30 mM Tris-HCl
- 20mM Beta – Mercaptoethanol
- 0.2% ácido ascórbico
- pH 7.5.

IV.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.

Se utilizó muestras de plantas de laboratorio a nivel de fundas y dos hojas de plantas aparentemente sanas de plantaciones bananeras.

Se hicieron dos tipos de extracciones una ácida y una alcalina, y las proteínas fueron sometidas a una electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reducidas.

IV.5 PLANTAS:

Laboratorio: Cavendish-Williams in vitro (CWv). Plantas de funda.

Plantaciones: Gran Enano (GE) y Cavendish-Williams (CWc).

IV.6 EXTRACCION DE PROTEINAS:

Proteínas fueron extraídas de sub-muestras (1 g) de la hoja No. 3 de cada planta.

La homogenización de las hojas se realizó en un mortero con 5 ml del buffer de extracción respectivo.

Las sub-muestras fueron envueltas en papel aluminio y puestas en un congelador a -80°C antes de la extracción.

Después de la homogenización 1 ml de cada sub-muestra fue transferido a tubos eppendorf y centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C .

El sobrenadante se utilizó para realizar la electroforesis.

El sobrenadante (100 ul) de la centrifugación descrita se mezcló con un volumen igual de "SDS-loading buffer" con mercaptoethanol.

De esta mezcla, 50 ul fueron inyectados en una SDS-PAGE discontinua con un stacking gel de 4% y una running gel de 12%.

La electroforesis se corrió hasta que el frente del dye estaba ubicado a $\frac{1}{4}$ del final de la running gel.

Al final de la electroforesis se revelaron las bandas de proteínas mediante el uso de una solución de Coomassie Blue R-250 (0.1 g Coomassie, 45 ml methanol, 10 ml ácido acético y 45 ml agua deionizada) por 1 hr, a temperatura ambiente y con constante agitación.

El gel fue desteñado con la solución Destain I (40% methanol, 10% ácido acético y 50% agua deionizada) por 10 min a temperatura ambiente y constante agitación.

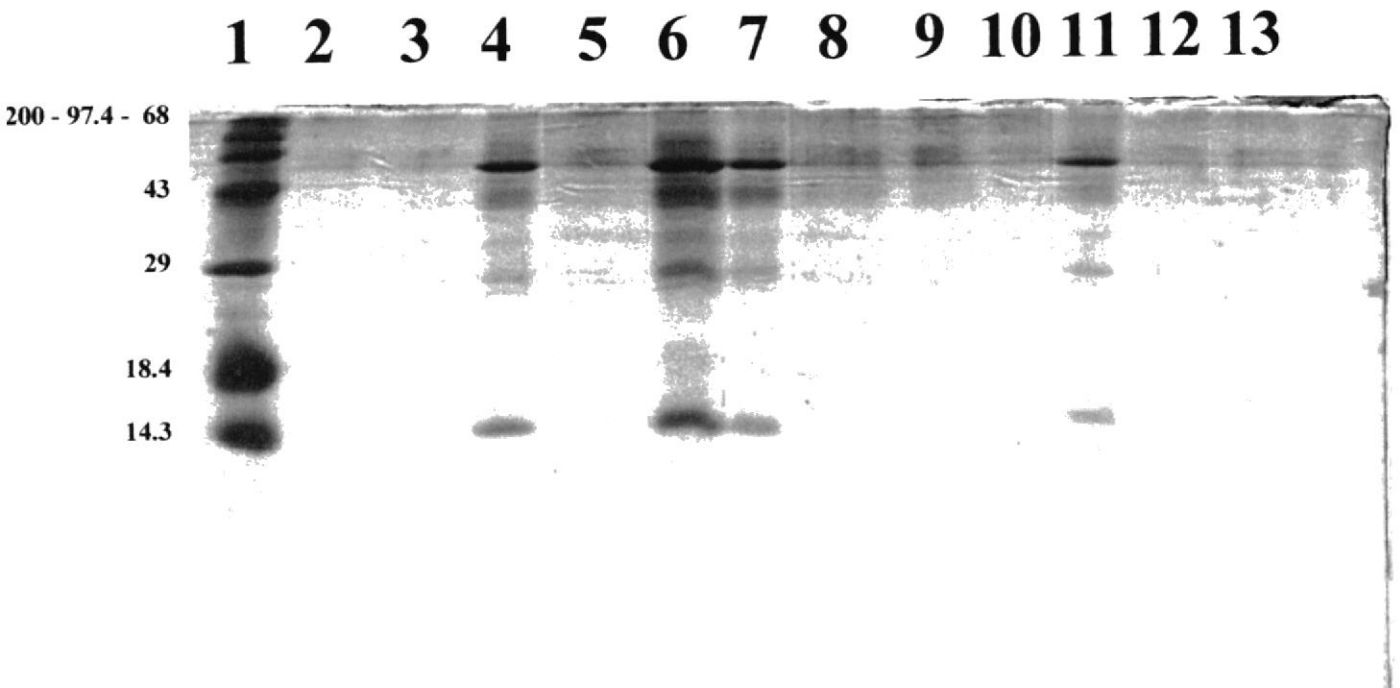
El gel se continuó destiñendo y se preservó en la solución Destain II (10% methanol, 7% ácido acético y 83% agua deionizada)

PROTEINAS	PESO (D)
Myosin (H-chain)	200000
Phosphorylase B	97400
BSA	68000
Ovalbumin	43000
Carbonic anhydrase	29000
beta-lactoglobulin	18400
Lysozyme	14300

WELL	SAMPLE	EXTRACTION
1	Marcador	
2	GE	Alcalina
3	GE	Acida
4	CWc	Alcalina
5	CWc	Acida
6	Cwv planta 1	Alcalina
7	Cwv planta 1	Alcalina
8	Cwv planta 1	Acida
9	Cwv planta 1	Acida
10	Cwv planta 2	Alcalina
11	Cwv planta 2	Alcalina
12	Cwv planta 2	Acida
13	Cwv planta 2	Acida

V. RESULTADOS.

SDS - PAGE



- | | | | |
|------------|------------|------------|------------|
| 1) M | 2) GE-Al | 3) GE-Ac | 4) CWc-Al |
| 5) CWc-Ac | 6) CWv-Al | 7) CWv-Al | 8) CWv-Ac |
| 9) CWv-Ac | 10) CWv-Al | 11) CWv-Al | 12) CWv-Ac |
| 13) CWv-Ac | | | |

M = marker **G = Gran Enano** **CW = Cavendish Williams** **c = cepa**
v = in vitro **Al = Alcaline extraction** **Ac = Acidic extraction**

**GEL DE PROTEÍNAS DE HOJA DE BANANO.
FASE II
COMPARACIÓN DE BUFFERS DE EXTRACCIÓN.**

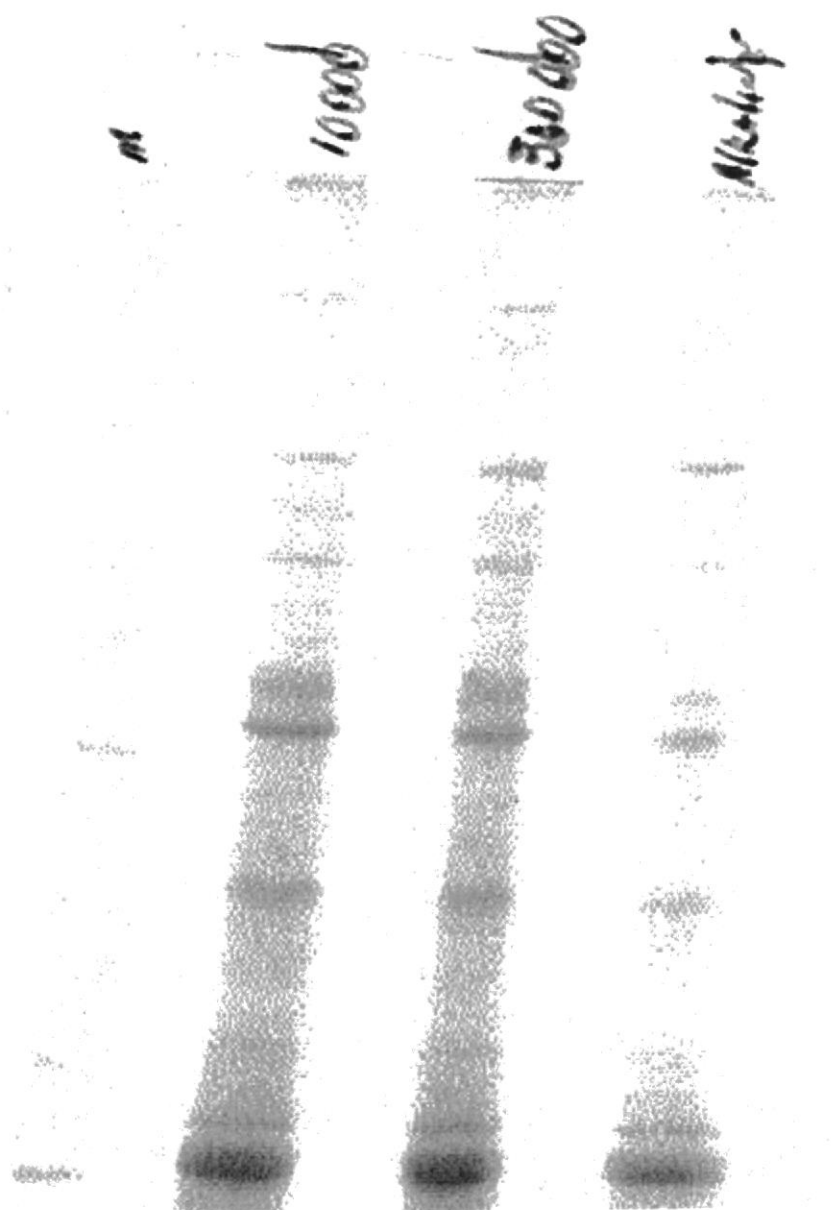


Fig 2.1

En ésta gel se podrá notar la diferencia de bandas de proteínas que existe entre una planta de fase II sana, con las bandas de proteínas de la gel de la figura 2.2

**GEL DE PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DE HOJA DE BANANO.
LOCALIZACIÓN: EL TRIUNFO
CAVENDISH – VARIEDAD WILLIAMS**

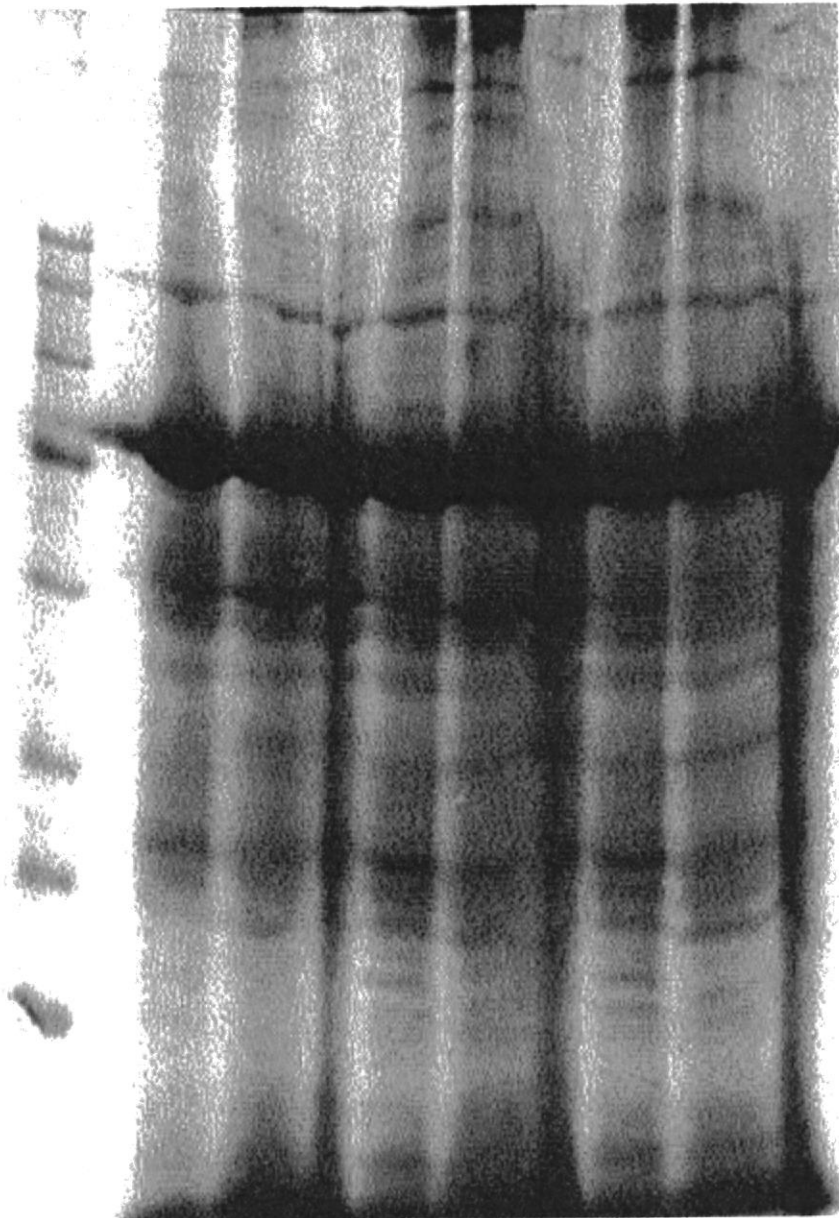


Fig 2.2

VI. CONCLUSIONES

- Lo fundamental de éste proyecto es la investigación científica, la cual se ve sustentada debido a la escasa información de artículos científicos publicados acerca de los genes de resistencia, asociados con las proteínas patógenas PR.
- Se ha establecido que la extracción alcalina produjo generalmente más bandas de proteínas que la extracción ácida
- Las bandas de proteínas de plantas de campo se deben analizar con reserva ya que parámetros externos a la extracción como temperaturas pueden influenciar en los resultados obtenidos.
- El método de gel discontinua dio en general buenos resultados, con bandas claras y rectas.
- De éste estudio queda como más importante las técnicas de extracción de proteínas de hoja de banano, las técnicas de electroforesis, técnicas de análisis, y metodología desarrollada.

VII. RECOMENDACIONES.

- Es necesario que se incentive la investigación en los estudiantes de ésta carrera desde los primeros años de estudio para ampliar sus conocimientos y obtener una reafirmación de sus creencias.
- Otro posible tema de investigación es el estudio del patógeno en sí, *Mycosphaerella fijiensis*, tratando de establecer técnicas de extracción de la fracción proteica de la toxina.
- Las condiciones aquí definidas son a nivel de los tres meses de pruebas, realizadas en los Laboratorios de Biotecnología del CIBE, lo cual debe ser considerado como sólo el inicio de nuestra búsqueda ya que cada día van apareciendo nuevas técnicas gracias al rápido avance de la Biología Molecular.

BIBLIOGRAFÍA.

- Sarah, J. Pinochet y J. Stanton. Plagas de Musa - Hoja Divulgativa N° 1: El nemátodo Barrenador del banano *Radophulus similis* Cobb. Fuente INIBAP. Diciembre, 1996.
- Bridge Jhon, Roger Fogain, Paul Speijer. Hoja Divulgativa N° 2: Nemátodos lesionadores de los bananos. Fuente INIBAP. Noviembre 1997.
- Eden, J.S., Green. Enfermedades de Musa – Hoja Divulgativa N° 3: Mancha Rojiza del Pseudotallo del banano o “ Blood Disease”.Fuente INIBAP. Septiembre, 1994.
- Thomas, J.E., M-L.Iskra-Caruana y D.R. Jones. Enfermedades de Musa – Hoja Divulgativa N° 4: Enfermedad del Cogollo racemoso del banano. Fuente INIBAP. Diciembre, 1994.
- Moore. N.Y., S. Bentley, y K. G. Pegg, and D.R. Jones. *Musa* Disease Fact Sheet N° 5 : Fusarium Wilt of Banana. Fuente INIBAP. Junio, 1995.
- Soguilon. C.E., L.V. Magnaye y M.P. Natural. Hoja Divulgativa N° 6: Enfermedad “ Bugtok” en banano. Fuente INIBAP. Octubre, 1995.
- Velastegui, Ramiro. Jorge Chang. Grace de Cabanilla. Memoria del Seminario Internacional. Preparándonos para una lucha eficaz contra la Sigatoka negra en el Ecuador. Quito, Enero de 1992.
- Chang, Raymond. Química. Cuarta Edición. 1998.

- Babor, Joseph A. Química General y Moderna. Segunda Edición. 1994. Pág. 383-384.
- Gastón, Pons, Muzzo. FÍSQUIMICA. Tercera edición. 1975.
- G. H. Duffey. Química Física. Editorial Mc Graw Hill. 1965.
- Linthorst, Huubb J. M. (1991) *Pathogenesis-related proteins of plants*. Crit. Rev. Plant Sci. 10: 123-150
- Broekaert, Willem F, Cammue, Bruno P. Aa., De Bolle, Miguel F.C., Thevissen, Karin, De Samblanx, Genoveva W., Osborn, Rupert W. *Antimicrobial peptides from plants*. Crit. Rev. Plant Sci. 10: 123-150 págs. 1997.
- Robinson, J.C. *Bananas and Plantains*. Cabi Publishing, 5, 40. 1996.
- Schoofs, H. *Bottlenecks in the generation and maintenance of morphogenic banana cell suspensions and plant regeneration via somatic embryogenesis therefrom*. INFOMUSA, Vol. 8, No 2. 1999.
- FAO/IAEA, *Cellular Biology and Biotechnology including mutation techniques for creation of new useful banana genotypes* . IAEA 312.D2.RC.579. 1995.
- Bollag, Daniel., Rozycki, Michael., Edelstein, Stuart., *Protein Methods*, Second Edition. Wiley-liss. 112, 166-170 págs. 1996.
- Jones, D. *Disease of banana, abaca and Ensete*. 1999.

ANEXOS

Pathogenesis-Related Proteins of Plants

Huub J. M. Linthorst, Ph.D.

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

Referree: 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 pattern 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).

It has been known for a long time that the hypersensitive response of the plant to an initial virus infection is accompanied by the phenomenon of acquired resistance in the infected leaf as well as in the noninfected parts of the plant (systemic acquired resistance) to the same or different viruses.^{1,2} Moreover, it was found that the hypersensitive response to one pathogen induces resistance to all sorts of different pathogens.^{3,4} One may speculate that this type of induced resistance to a broad spectrum of pathogens is caused by a *de novo* synthesis in the plant of components interfering with the pathogens' replication. Alternatively, activation of already existing mechanisms may lead to induced resistance. This overview deals not only with the well known "pathogenesis-related" (PR) proteins, but also the enzymes and other proteins, clearly induced upon infection or related forms of stress, that have been shown to have or may have a function in resistance to pathogen attack.

It is to be expected that an important part of the future work on pathogen-induced proteins will concern the elucidation of their role in resistance to pathogens, the signal transduction pathways via which the specific induction of their expression is regulated, and the use of (genetically modified) proteins to improve the resistance of crops to pathogens and other stress conditions. Therefore, where possible, emphasis has been given to a description of the molecular structure and the organization of the genes encoding these pathogen-induced proteins.

II. PR-PROTEINS OF TOBACCO AND OTHER PLANTS

A. Common Characteristics

Although PR-proteins have now been detected in many plants and are generally assumed to be present in most plant species, the PR-proteins from tobacco have been the most intensively studied. Therefore, this part of the review deals primarily with the PR-proteins of tobacco. PR-proteins were first described by Van Loon and Van Kammen and independently by Gianinazzi and co-workers in leaves of Samsun NN and Xanthi-nc tobacco plants, respectively, which hy-

persensitively reacted to TMV infection.^{5,6} Such an infection is characterized by the formation of local necrotic lesions on the inoculated leaves. These lesions are formed 1 to 2 days after inoculation by a collapse of the cells surrounding the entry sites of the virus particles from the inoculum. They contain the virus and usually prevent the spread of the infection to noninoculated parts of the plants. In tobacco this hypersensitive response to TMV depends on the presence of the N-gene of *Nicotiana glutinosa*. However, PR-protein induction is not dependent on the presence of the N-gene since Samsun nn tobacco, which lacks the N-gene, induces the same PR-proteins when infected with tobacco necrosis virus (TNV).⁷ Moreover, bacterial and fungal infections which cause the plant to react with the formation of necrotic regions also induce the expression of the proteins.^{3,8-11}

Extracts from the leaves of these hypersensitively reacting plants contain a number of proteins which are not present in similar extracts from noninfected tobacco. Initially, only four PR-proteins were observed (PR-1a, -1b, -1c, and -2). These proteins appeared to be relatively stable at low pH and remained soluble at pH 3.^{12,13} This property later enabled the detection and isolation of many other acidic PR-proteins by using extraction buffers of pH 3, with the great advantage that most other plant proteins were denatured under these acidic conditions.¹⁴⁻¹⁷ Other common characteristics of acidic tobacco PR-proteins are their high resistance against degradation by proteolytic enzymes and their predominant presence in the intercellular fluid of the leaves.¹⁸⁻²³ Since the intercellular fluid of tissues surrounding necrotic regions may have a relatively low pH as a result of tissue collapse and release of vacuolar acids, and also contains acidic protease activity, the acidic PR-proteins appear to be well adapted to function in this environment. The fact that most extracellular PR-proteins from tobacco are acidic does not mean that the same is true for corresponding proteins in other plants. Several extracellular PR-proteins, e.g., of tomato and potato, are basic (and at the same time resistant to protease), indicating that a low pH is not the sole determinant for stability under apoplastic conditions. The extracellular tomato PR-protein P14 was specifically degraded by a 37-kDa extracel-

- ★ **6.2.3 Color del pseudotallo** (6.1.1)
Observar el color general del pseudotallo, sin quitar la vaina externa pero sin considerar las viejas vainas desgarradas. (Tabla A)

- 1 Verde amarillo
- 2 Verde medio
- 3 Verde
- 4 Verde oscuro
- 5 Verde rojizo
- 6 Rojo
- 7 Rojo violáceo
- 8 Azul
- 9 Químérico
- 10 Otro (especificar en el descriptor Notas 6.8)

- 6.2.4 Apariencia del pseudotallo**
Mismas condiciones que para el descriptor 6.2.3

- 1 Opaco (ceroso)
- 2 Brillante (no ceroso)

- 6.2.5 Color subyacente del pseudotallo**
Quitar la vaina externa y observar la superficie del pseudotallo. Los valores 5 (rosado-malva), 6 (rojo-violáceo) y 7 (morado) se deben elegir sólo si se trata de una pigmentación uniforme que no permite ver un color verde o crema. (Tabla A)

- 1 Verde agua
- 2 Verde claro
- 3 Verde
- 4 Crema
- 5 Rosado malva
- 6 Rojo violáceo
- 7 Morado
- 8 Otro (especificar en el descriptor Notas, 6.8)

- ★ **6.2.6 Pigmentación de las vainas internas** (4.1.3)
Indicar la pigmentación aunque se observe solamente en ciertos lugares. (Tabla A)

- 1 Rosado malva
- 2 Rojo
- 3 Morado
- 4 Otro (especificar en el descriptor Notas, 6.8)

6.2 Pseudotallo/hijos

(Véase Fig. 4)

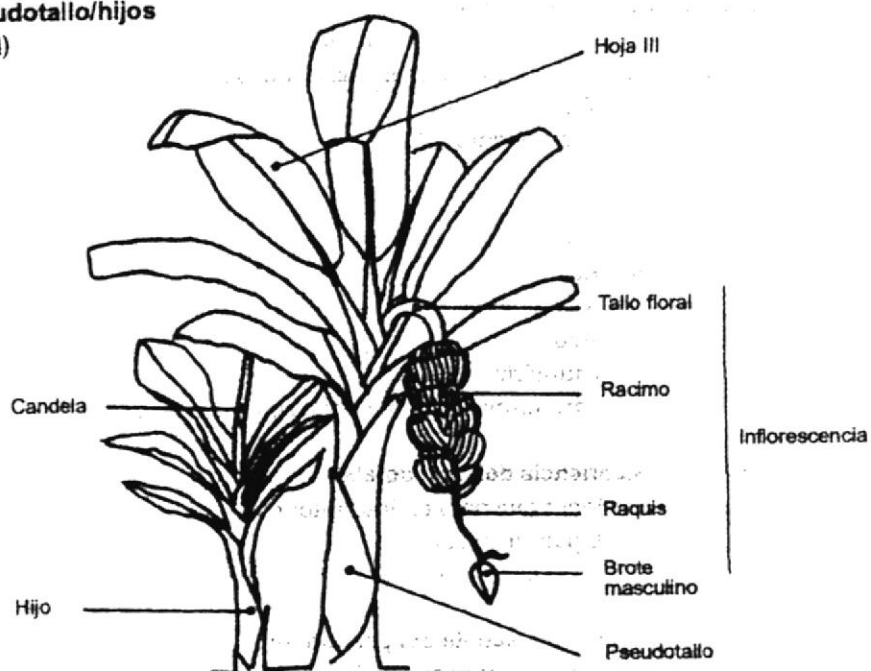


Fig. 4 Pseudotallo/hijos (adaptado de Champion 1963)

- ★ **6.2.1 Altura del pseudotallo [m]** (4.1.1)
 Medida desde la base del pseudotallo hasta el punto de emergencia del pedúnculo
 - 1 ≤ 2
 - 2 2.1 a 2.9
 - 3 ≥ 3

- ★ **6.2.2 Aspecto del pseudotallo**
 Determinada por la circunferencia a 1 m
 - 1 Débil
 - 2 Normal
 - 3 Robusto

PLANT-PATHOGEN INTERACTIONS:

MOLECULAR MECHANISMS OF INDUCED DISEASE

RESISTANCE IN PLANTS

Summary of research areas, experimental systems, overall progress, and projects

Our team is focusing on the dissection of the molecular mechanisms governing active (induced) defense of plants against pathogens. In naturally resistant host plants, efficient defense against pathogen attack is frequently based on a hypersensitive response (HR) comprising a complex cascade of events (some of which are indicated in Fig. 1).

In the 1991-95 period, our main experimental model system has still been the HR resulting in tobacco from the interaction between the N resistance gene and tobacco mosaic virus. We have extended and completed by molecular biology approaches a number of our previous biochemical studies on induced metabolic changes situated on the downstream part of the HR cascade. These are believed to cause, or at least to contribute to the confinement of the pathogen in and around the necrotic lesions. Major emphasis has been put on the study of (i) a group of strongly induced defense proteins with typical properties, the PR ("pathogenesis-related") proteins, and (ii) the highly stimulated phenylpropanoid pathway providing antimicrobial phenolic metabolites (phytoalexins) and components to form mechanical barriers (lignin, lignin-like phenolics, phenolics involved in cross linking of cell wall polysaccharides). During the past 4 years, we have also initiated new projects that concern more upstream parts of the HR cascade. One of the metabolites issuing from the phenylpropanoid pathway, salicylic acid (SA), has recently attracted much attention because of its possible implication as an important signal in induced disease resistance. We are investigating the metabolism of SA, particularly its biosynthetic pathway, with the long-term aim to manipulate its production and level, and, consequently, control disease resistance. Another new project aims to control durable and broad pathogen resistance by generation of an "artificial" HR or at least parts of it in otherwise compatible host/pathogen interactions.

Metabolic changes and regulation of defense gene expression in induced resistance

- **PR-proteins** Considerable progress has been made and our team is now in an internationally recognized leading position on their biochemical characterization and on demonstration of their biological function or activities. Among the 33 proteins that we have isolated from TMV-infected tobacco (Table 1) 29 fall into 8 families of ubiquitous proteins. After the discovery (previous report) that the PR-2 and PR-3 family consisted of 1,3- β -glucanases and chitinases, respectively, we could identify other PR-proteins as novel hydrolases, [[alpha]]-amylases and members of distinct chitinase-lysozyme families (PR-4, PR-8, PR-11) with differential affinity and cleavage specificity toward chitin, the bacterial peptidoglycan and various Nod factors used as substrates. We have also participated in the discovery of the differential antifungal activity of members of the PR-5 and PR-4 families, the latter including the PR-1 initially detected in 1970. We have also characterized and cloned two inhibitors of microbial proteases. Thus, 27 among the tobacco PRs have been demonstrated to be defense proteins with direct antimicrobial activity.

- **Phenylpropanoid pathway** Very significant progress has also been made in our studies on the phenylpropanoid pathway and its activation in tobacco leaves undergoing an HR, due to our participation in an EC ECLAIR project (1990-95 period) aiming to modulate lignin production and composition by the antisense strategy. The target enzymes within our tasks in the project were

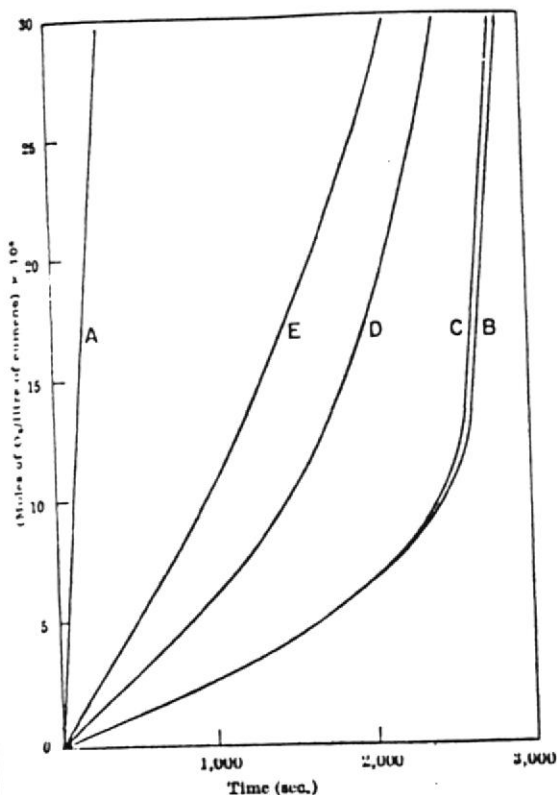


Fig. 1. Oxidation of cumene at 65°C. Initiated by 0.327 mole/l. of AIBN and inhibited by 10⁻³ moles/l. of BMP. A, Uninhibited oxidation; B, BMP inhibited; C, BMP inhibited + water; D, deuterated BMP inhibited; E, deuterated BMP + deuterium oxide

respectively. Theoretically, the true isotope effect in the absence of exchange could be obtained by extrapolating to infinite inhibitor concentration. A simpler and, probably, much more accurate procedure is to add an excess of deuterium oxide to the reaction system (~ 1.0 c.c. D₂O to 5 c.c. cumene), thereby maintaining the BMP in its fully deuterated state throughout the early part of the reaction in which the rates are measured. Fig. 1 shows some results obtained in this way at 65°C. with an AIBN concentration of 0.327 mole/l. and a BMP concentration of 10⁻³ moles/l. In the presence of deuterium oxide the initial rate is ≥ 4.2 times that obtained with the undeuterated inhibitor, whereas, in the absence of deuterium oxide, this factor was only 2.3. That is, from the average of three determinations, the true deuterium isotope effect for reaction 1 between cumyl peroxy radicals and BMP at 65°C. is ≥ 4.2 ± 0.5. Our assumption that the major, and possibly only, part played by the deuterium oxide is to maintain the BMP in its fully deuterated state is confirmed by the fact that water has no appreciable effect on the undeuterated inhibitor (see Fig. 1) and that the effects of water and deuterium oxide on the uninhibited oxidation are very small. Experiments of a similar nature using styrene as the substrate gave an isotope effect of about 10.6 at 65°C.

In conclusion, the reaction between phenols and peroxy radicals does not show the unusual features previously reported. That is, the reaction of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol with both tertiary and secondary peroxy radicals is a normal hydrogen abstraction process exhibiting an isotope effect of about the expected magnitude for a transition state involving appreciable stretching of the phenolic O-H bond.

K. U. INGOLD
J. A. HOWARD

Division of Applied Chemistry,
National Research Council,
Ottawa, Canada.

- ¹ Ingold, K. U., *Chem. Rev.*, **61**, 563 (1961).
- ² Hammond, G. S., Boozer, C. E., Hamilton, C. E., and Sen, J. N., *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 3234 (1955).
- ³ Boozer, C. E., and Sneed, C. C. (private communication).

BIOCHEMISTRY

Disk Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrylamide Gels

DISK electrophoresis on small columns of polyacrylamide gels, a new method for the separation of serum proteins, has been developed by Ornstein and Davis^{1,2}.

We have modified their procedure to make possible the separation of basic proteins and peptides³. This technique permits excellent resolution of mixtures of proteins or peptides with samples as small as 50 μgm. and within as little as 20 min. The method achieves this by concentrating the components of dilute samples into very thin starting zones and by utilizing the frictional properties of the gel to aid separation by molecular sieving.

Disk electrophoresis is carried out in columns of polyacrylamide gel consisting of three sections: (1) a large-pore anticonvection gel containing the protein sample; (2) a large-pore spacer gel in which electrophoretic concentration takes place; and (3) a small-pore gel in which electrophoretic separation is accomplished. Buffer trays, graphite electrodes and

either no effect, or else only a comparatively small effect (~ 0-60 per cent) on the rate of this reaction¹⁻³. It has therefore been suggested that the rate-determining step involves the prior formation of a complex between the peroxy radical and the phenol followed by a rapid, non-rate determining, hydrogen abstraction^{1,2}. Alternatively, small isotope effects could be secondary effects or could arise in abstraction from the activated complex³. We have now found that the apparent smallness or complete absence of the expected isotope effect is most probably due to the very rapid exchange that occurs between a deuterated phenol dissolved in an organic substrate and traces of moisture or the hydroperoxide products of oxidation. The oxidation of cumene under 760 mm. of oxygen initiated by α,α'-azo-bis-isobutyronitrile (AIBN) was studied in a conventional constant pressure apparatus. The oxidation was partially inhibited by 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BMP). In the presence of this inhibitor the initial rate is quite low, but it rises to the rate of the uninhibited reaction as soon as the inhibitor is consumed. This initial rate is proportional to the AIBN concentration and inversely proportional to the BMP concentration, and its reciprocal is proportional to the rate of reaction 1. We have found that exchange can be partially suppressed by using rather high concentration of deuterated BMP and that under these conditions a fairly large isotope effect is observed which increases as the inhibitor concentration is increased. For example, some preliminary experiments at 70°C. with an AIBN concentration of 0.34 mole/l. gave measured isotope effects of 1.6, 1.8 and 2.2 at BMP concentrations of 10⁻³, 2 × 10⁻³ and 4 × 10⁻³ moles/l.

n. We
nts by
ally the
atoms.
ade by
iphenyl
romine
l phos-
reaction
uation:
.BBr,
y com-
phine-
ing the
The (wo
nfr-red
b) agree-
2°-214°
; (c) the
an hour

a of invol-
product
BBr,
2-57
2-64
disulphide
ture.
and acid-
oxide, which
arise from
formed; it
phine or its
conditions.

stoichio-

lack of
is in this
voll imply
s, leading
l process.
lternative
bond by
1, can be

HEAL
LADDEN

1, 3872 (1953).
1, 3198 (1956).
Pub. No. 15.

Radicals

time that
ny organic
ion process
perimental
involves a
e hydrogen
e a hydro-
re phenoxy

(1)

at replace-
terium has

- van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Ecology* **69**, 693-702 (1988).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Plant Physiol* **88**, 1327-1333 (1981).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Plant Physiol* **76**, 865-870 (1984).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Oikos* **27**, 111-121 (1976).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Mol. Ecol.* **5**, 164-171 (1992).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Mol. Ecol.* **13**, 50-55 (1990).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Oecologia* **86**, 570-573 (1991).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *New Phytol.* **72**, 539-544 (1973).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Ecology* **72**, 242-253 (1991).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Biol. Rev.* **53**, 465-510 (1978).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *BioScience* **37**, 49-57 (1987).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Oecologia* **85**, 424-428 (1991).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Funct. Ecol.* **3**, 73-80 (1989).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Chromatogr.* **4**, 565-586 (1981).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Plant Cell Physiol* **4**, 79-84 (1963).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Biochemistry* 2nd edn (Benjamin/Cummings, San Francisco, 1981).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Plant Nutr.* **6**, 989-1011 (1983).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Microbiological Methods* 5th edn (Butterworths, London, 1984).
 van F. S. Fischer, N. Kjelland, K. Everett, K. R. & Linkins, A. E. *Plant Physiol* **68**, 1064-1067 (1981).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank M. Chapin, K. Durkin, M. Freestone, J. Harte, S. Hobbie and H. H. for critical review of the manuscript. This research was supported by the NSF.

Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant

Ulf G. Pfender*, Hans-Jörg Reif*, Elvira Krause*,
 Hans Langebartels*, Helmut Kindl†,
 Barbara Vornam††, Wilfried Wieset,
 Hans-Joachim Schmelzer§, Peter H. Schreier*,
 and H. Stöcker* & Klaus Stenzel*

*er AG, PF-E/Fu, Institut für Biotechnologie, D-5090 Leverkusen 1,
 Germany
 †chemie, Fachbereich Chemie, Hans-Meerwein-Strasse,
 Philipps-Universität, D-3500 Marburg, Germany
 ††x-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Carl-von-Linné Weg,
 D-500 Köln 30, Germany

ALTHOUGH phytoalexins^{1,2} have long been inferred to be important in the defence of plants against fungal infection^{1,2}, there are reports showing that they provide resistance to infection. Several plants, including grapevine, synthesize the stilbene-type phytoalexin resveratrol³⁻⁷ when attacked by pathogens. Stilbenes have a fungicidal potential as are formed in several unrelated plant species, such as peanut (*Arachis hypogaea*), grapevine (*Vitis vinifera*) and pine (*Pinus sylvestris*)^{3,5,11-15}. Stilbene biosynthesis specifically requires the presence of stilbene synthase^{6,9}. Furthermore, the precursor molecules for the formation of hydroxystilbenes are malonyl-CoA and *p*-coumaroyl-CoA, both present in plants⁹. To investigate the potential of stilbene biosynthesis in a strategy of engineering pathogen resistance, we isolated stilbene synthase genes from grapevine, where they are expressed at a high level, and transferred them into tobacco¹⁰. We report here that regenerated tobacco plants containing these genes are resistant to infection by *Sclerotinia cinerea*. This is, to our knowledge, the first report of increased disease resistance in transgenic plants based on an additional foreign phytoalexin.

Complementary DNA⁸ was used as a probe to isolate a clone from a λEMBL4 genomic library of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Optima) containing two linked, full-length stilbene synthase genes (*Vst1* and *Vst2*, Fig. 1a). Direct gene transfer experiments into tobacco were done to prove the two genes isolated were stilbene synthase genes. The phage clone DNA was cotransferred with a plant selectable marker gene to protoplasts of tobacco (*Nicotiana glauca* cv. Petit Havana SR1)¹⁰. Transgenic tobacco calluses and plants were regenerated^{9,10}. Southern blot analysis

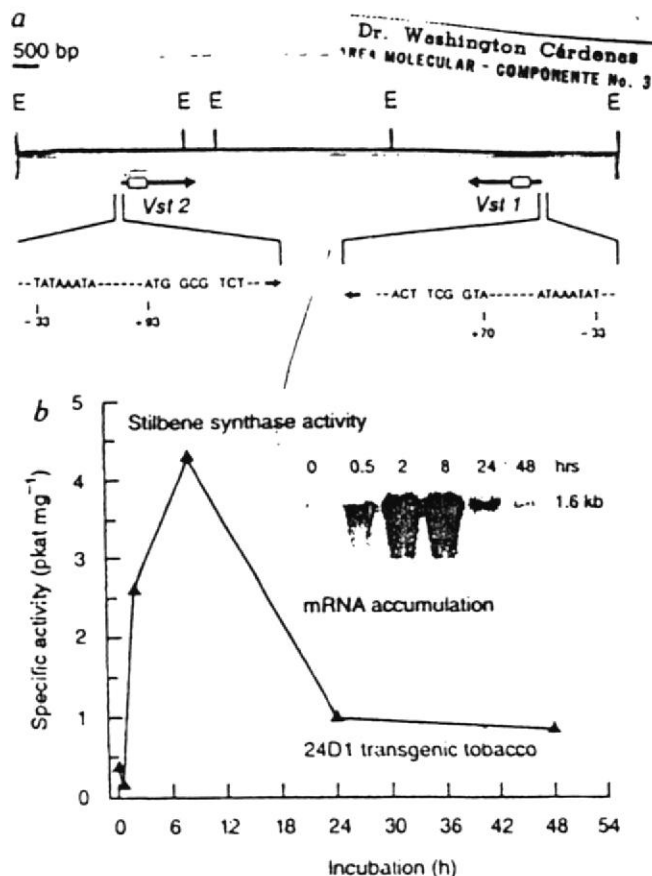


FIG. 1 a Map of genomic DNA containing two stilbene synthase genes. Genomic DNA was isolated from partially purified nuclei¹⁶ of *Vitis vinifera* var. Optima. A library was constructed by size fractionation of *Nde*I cut genomic DNA and fragments of about 13 kilobases (kb) were cloned into the *Bam*HI site of λEMBL4 (ref. 17). Clones carrying stilbene synthase genomic sequences were identified by hybridization to a grapevine stilbene synthase cDNA⁸ and then restriction mapped. For each gene the TATA box at -33 and the length of the 5'-noncoding region on the mRNA is indicated. The box in the gene denotes the position of the intron. E = *Eco*RI. b Profiles of stilbene synthase mRNA accumulation and enzymatic activities in transgenic tobacco suspension cultures following addition of elicitor. METHODS. Suspension cultures were established by incubating transgenic tobacco callus material reduced to small pieces in liquid Linsmaier and Skoog medium²² (LS) containing 1 mg l⁻¹ NAA and 0.2 mg l⁻¹ kinetin on a rotary shaker at 100 r.p.m. over a period of three months. The medium was exchanged each week. For induction experiments, six flasks containing 50 ml LS medium each were inoculated with 5 ml of a 1-week-old suspension culture and after 3 days the cells were induced with 25 µg ml⁻¹ of a fungal elicitor preparation containing 11.25 µg glucose equivalents per ml from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* (Pmg elicitor) known to induce a chimaeric peanut stilbene synthase gene^{7,8} in transgenic tobacco⁹. At each time point (0, 0.5, 2, 8, 24, 48 h) suspension cells were collected and crude protein extracts as well as RNA were prepared. Total RNA (20 µg) was analysed by Northern blot analysis. As a probe, a stilbene synthase cDNA⁸ was used. Enzymatic activity was determined⁶ and the activity of 1 pkat was defined as incorporation of 1 pmol of *p*-coumaroyl-CoA into resveratrol at 30 °C.

revealed one to two copies of the phage clone DNA to be integrated in the genome of tobacco (data not shown). Furthermore, *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 and *N. tabacum* var. Samsun were transformed with the stilbene synthase genes by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer¹⁰.

Transgenic tobacco calluses and plants were then analysed for regulated stilbene synthase gene expression. In grapevine, stilbene synthesis is inducible after fungal infection^{11,12}, elicitor treatment⁴, wounding or ultraviolet light irradiation^{12,14}. Assuming that similar regulation of grapevine stilbene synthase gene

Present address: Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung Busgenweg 2, D-3400 Ikingen, Germany.

Otros dos clones, el 'Pisang Jambe' y el 'Kluai' Ngeon', que llegaron a CIRAD en 1986 desde Indonesia y Tailandia, respectivamente, luego fueron transferidos a la colección de INIBAP en 1989.

Se descubrió que el 'Pisang Jambe' (TC0693), clasificado como tetraploide AAA por su comportamiento morfológico, es triploide ($2n = 3x = 33$, Figura 2B). Por su parte el 'Kluai' Ngeon' (TC0200) fue descrito en Malasia como un banano de cocción triploide AAB (Chomchalow y Silayoi 1984). Sin embargo, las observaciones en el campo, realizadas por los científicos del CIRAD, los llevaron a reconsiderar su posición y clasificarlo como un clon tetraploide AABB. Los resultados de la citometría de flujo y del conteo de cromosomas en las puntas de las raíces confirmaron su estado tetraploide ($2n = 4x = 44$, Figura 2D).

Desde que Simmonds y Shepherd escribieron que el único banano tetraploide conocido que ocurría naturalmente era el 'Kluai Teparod' (Simmonds y Shepherd 1955), varios otros clones han sido considerados como tetraploides naturales (Stover y Simmonds 1987). Además del 'Kluai Teparod', grupo "ABBB", los autores se refieren a otros tetraploides asignados a los grupos AAAA, AAAB, AABB o ABBB. La característica común de todas estas accesiones es su origen: Papua Nueva Guinea y las islas Leleñas. Carreel (1994) examinó mediante el RFLP algunas variedades tetraploides introducidas de la misma región, y encontró que estos tetraploides no son derivados puros de *Eumusa*, sino que se mezclaron con el genoma de *Austra-*

limusa. ¿Podría ser que todos los tetraploides arriba mencionados también fueron el resultado de la misma clase de introgresión? Y si la respuesta es sí, ¿son los cultivares tetraploides naturales *acuminata* x *balbisaniana* aún más raros? Esta pregunta permanecerá abierta hasta que el análisis genómico de los clones tetraploides no se evalúe correctamente a nivel molecular. No todos los supuestos clones

tetraploides han sido analizados apropiadamente y posiblemente podrían persistir algunos errores. A la luz de estos ejemplos, está claro que no se puede confiar sólo en la morfología de la planta para determinar su clasificación. Afortunadamente, se dispone de nuevos o mejorados métodos como el conteo de cromosomas y la citometría de flujo, y así la ploidía de todas las accesiones sospechosas puede ser verificada con rapidez y suficiente confiabilidad. ■

Bibliografía

- Carreel F. 1994. Etude de la diversité génétique des bananiers (genre *Musa*) à l'aide des marqueurs RFLP. Thesis, INA-Paris Grignon, Paris, France.
- Chomchalow N. & Silayoi. 1984. Banana germplasm in Thailand. IBPGR Regional Committee for Southeast Asia Newsletter 8 (4): 23-28.
- Doležel J., M. Doleželová & J. Novák. 1994. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisaniana*). Biol. Plant. 36: 351-357.
- Doležel J., M. Doleželová, I. Van den Houwe & N. Roux. 1998. A novel method to prepare slides for high resolution chromosome analysis in *Musa*. INFOUSA. This issue.

- Doležel J., M.A. Lysák, I. Van den Houwe, M. Doleželová & N. Roux. 1997. Use of flow cytometry for rapid ploidy determination in *Musa* species. INFOUSA 6 (1): 1-4.
- Jenay C., F. Carreel & F. Bakry. 1997. Revision of banana taxonomy: 'Kluai Teparod' (*Musa*) reclassified as a triploid. Fruits 52(2): 83-91.
- Richardson D.L., K.S. Hamilton & D.J. Hutchinson. 1965. Notes on bananas. I. Natural edible tetraploids. Trop. Agric. (Trinidad) 42(2): 125-137.
- Simmonds N.W. & K. Shepherd. 1955. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. J. Linn. Soc. (Bot.) 55: 302-312.
- Stover R.L. & N.W. Simmonds. 1987. Bananas - 3rd ed. Longman, London, UK.
- White P.R. 1928. Studies on the banana. An investigation of the floral morphology and cytology of certain types of the genus *Musa* L. Zeits. Für Zellforschung und mikroskopische Anatomie 7:673-733.

Agradecimiento

Este estudio fue realizado como parte del Programa Global para el Mejoramiento de *Musa* (PROMUSA) y financiado en parte por el Contrato de Investigación No. 8145/RB de la Agencia Internacional para la Energía Atómica, Viena, Austria.

J.P. Horry trabaja en INIBAP, Parc Scientifique Agropolis II, 34397 Montpellier Cedex 5, Francia.

J. Doležel, M. Doleželová y M.A. Lysák trabajan en el Institute of Experimental Botany Sokolovska 6, CZ-77200 Olomouc, República Checa.

Recursos genéticos

Artículo de Promusa

Quimiovariabilidad en el género *Musa*: Caracterización genética mediante nueve sistemas enzimáticos

Luz Marina Reyes C., Orlando Martínez W. y Margarita Beltrán

La identificación de especies de *Musa* y sus cultivares, se basa tradicionalmente en caracteres morfológicos. Sin embargo, las relaciones genéticas entre cultivares, así como sus mutaciones somáticas y cambios morfológicos debido al ambiente, son los mayores obstáculos para la correcta identificación de un clon (Kaemmer *et al.* 1992).

Los marcadores isoenzimáticos han sido ampliamente utilizados en *Musa* con diferentes propósitos y por diversos grupos de investigadores (Horry 1989, Espino y Pimentel 1990, De Langhe 1990, Jarret y Litz, 1986a, Bhat *et al.* 1992a, 1992b, Lebot *et al.* 1993).

El principal objetivo de este trabajo fue caracterizar genéticamente 15 clones de la Colección Colombiana de Musáceas (CCM), mediante la utilización de marcadores isoenzimáticos, con el propósito de facilitar, en una fase posterior, el análisis de la variabilidad genética presente en la CCM.

Materiales y métodos

Quince accesiones de diferentes grupos genómicos fueron seleccionadas y se establecieron, bajo condiciones de cultivo *in vitro*, en el Centro de investigación Tibaitatá de CORPOICA (Tabla 1).

Se tomaron 0.5 g de tejido central de las hojas de las plántulas mantenidas *in vitro*, y se colocaron sobre papel filtro húmedo y frío. La muestra se maceró con nitrógeno líquido y se adicionaron 1.5 ml de buffer de extracción

Tabla 1. Genotipos utilizados para la caracterización bioquímica por análisis isoenzimático.

Nombre Común	Ploidía
Siam	<i>M. acuminata</i> ssp. <i>siamoa</i>
Bocadillo chileno	AA-Sucrier
Banano 2	AAA-Gros Michel
Soredow	AAA-Cavendish
Gran Enano	AAA-Cavendish
Pigmeo	AAA-Cavendish
Poyo	AAA-Cavendish
Guayabo A	AAA-Red
Taletán Rojo	AAA-Red
Taletán Verde	AAA-Red
Truncho	AAB-Plantain
Cachaco Común	ABB-Bluggoe
Cachaco Espino	ABB-Bluggoe
Mutant Palmira	ABB-Bondetta
Saba	ABB-Saba

metabolic pathway enzyme phospholipase A₂ (bee venom PLA₂) each showing 96% inactivation at 1.6 µg/ml². Hence, vidalols A and B could provide interesting lead molecules for the design of inhibitors of this important enzyme.

Like many ortho-catechols, vidalols A and B slowly oxidize, in air, to yield red solutions and amorphous powders consisting of their corresponding ortho-quinones 4 and 5. Because of the difficulty in maintaining vidalols A and B pure during bioassays, we are not sure if the catechols or the more reactive ortho-quinones exhibit the antibiotic and enzyme-inhibitory properties reported here. Indeed, in a similar case with the metabolites from the brown alga *Styopodium zonale*¹², it was observed that air oxidation yielded an ortho-quinone which reacted as an electrophile binding sulfhydryl groups to selectively inhibit the enzyme tubulin¹³.

Acknowledgments. This research is a result of generous financial support from the California Sea Grant Program under grant R/MP-48. The alga was collected in Martinique as part of an NSF-sponsored expedition onboard the research vessel Columbus Iselin (funded under grant CHE86-20217 to WF). We thank the government of Martinique for permission to perform research in their territorial waters. DFW thanks the University of Iowa Faculty Scholar Program for a research leave to enable participation in this research program. We thank Prof. Robert S. Jacobs and his students for performing the anti-inflammatory and phospholipase A₂ enzyme assays and for providing a summary of their results prior to publication.

* Permanent address: Department of Chemistry, University of Iowa, Iowa City, Iowa, IA 52242.

- 1 Fenical, W., *J. nat. Prod.* 50 (1987) 1001.
- 2 Mayer, A. M. S., deCarvalho, M. S., Jacobs, R. S., Paul, V. J., and Fenical, W., *Planta Medica*, submitted, 1991.
- 3 NMR data for vidalol A (1): ¹³C NMR (CDCl₃) δ 134.2 (C, C-1), 115.1 (C, C-2), 113.8 (C, C-3), 143.8 (C, C-4), 145.7 (C, C-5), 116.4 (C, C-6), 31.9 (CH₂, C-7), 107.2 (C, C-1'), 154.4 (C, C-2'), 90.8 (C, C-3'), 157.1 (C, C-4'), 96.4 (CH, C-5'), 154.3 (C, C-6'); proton NMR data are in the body.
- 4 Kurata, K., and Amiya, T., *Chem. Lett.* (1977) 1435.
- 5 Wehrh, F. W., and Wirthlin, T., *Interpretation of Carbon-13 NMR Spectra*. Heyden and Sons Ltd., London 1978.
- 6 Chevotot-Magueur, A.-M., Cave, A., Potier, P., Teste, J., Chiaroni, A., and Roche, C., *Phytochemistry* 15 (1976) 767.
- 7 NMR data for vidalol B (2): ¹³C NMR (CDCl₃) δ 155.5 (1C), 152.8 (2C), 146.0 (2C), 143.4 (2C), 134.0 (2C), 116.7 (2C), 115.3 (2C), 114.2 (2C), 109.1 (2C), 93.7 (1C), 32.6 (2C); proton NMR data are in the body.
- 8 Faulkner, D. J., *Nat. Prod. Rep.* 1 (1984) 251.
- 9 Sun, H. H., Paul, V. J., and Fenical, W., *Phytochemistry* 11 (1983) 743; Colon, M., Guevara, P., Gerwick, W. H., and Ballantine, D., *J. Nat. Prod.* 50 (1987) 368; Carte, B. K., Troupe, N., Chan, J. A., Westley, J. W., and Faulkner, D. J., *Phytochemistry* 28 (1989) 2917.
- 10 Hodgkin, J. H., Craigie, J. S., and McInnes, A. G., *Can. J. Chem.* 44 (1966) 74.
- 11 Hay, M. E., Duffy, J. E., and Fenical, W., *Proc. 6th. Int. Coral Reef Symp.* 3 (1988) 43.
- 12 Gerwick, W. H., Fenical, W., Fritsch, N., and Clardy, J., *Tetrahedron Lett.* (1979) 145.
- 13 O'Brien, E. T., Asai, D. J., Groweiss, A., Lipshutz, B. H., Fenical, W., Jacobs, R. S., and Wilson, L., *J. med. Chem.* 29 (1986) 1951.

0014-4754/91/080851-03\$1.50 + 0.20/0

© Birkhäuser Verlag Basel, 1991

The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of Black Sigatoka disease of bananas and plantains

A. A. Stierle, R. Upadhyay, J. Hershenhorn, G. A. Strobel* and G. Molina[†]

Department of Plant Pathology, Montana State University, Bozeman (Montana 59717, USA), and [†]Fundacion Hondurena de Investigacion Agricola APDO, Postal 2067, San Pedro Sula (Honduras)

Received 24 October 1990; accepted 16 January 1991

Abstract. Black Sigatoka is the most costly to control disease of bananas and plantains in the world. Currently, a worldwide search is underway either to find or to produce cultivars that are disease-resistant or -tolerant. Phytotoxins isolated from the pathogen might facilitate the discovery of such cultivars. Several aromatic compounds from liquid cultures of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of Black Sigatoka disease of bananas and plantains, have been isolated. The most abundant and phytotoxic of these compounds is 2,4,8-trihydroxytetralone, which induces necrotic lesions at 5 µg/5 µl in less than 12 h on sensitive cultivars of bananas. This compound exhibits host-selectivity that mimics that of the pathogen. Other phytotoxins isolated from this fungus, in lesser amounts, were juglone, the novel compound 2-carboxy-3-hydroxycinnamic acid, isochracinic acid and 4-hydroxyscytalone. Some of the phytotoxins isolated are melanin shunt pathway metabolites, which makes this fungus unique among plant pathogens.

Key words. Epidemic; juglone; 2,4,8-trihydroxytetralone; melanin shunt pathway; plant pathogen; Sigatoka.

Bananas and plantains are the primary food source for millions of people in many areas of the world, including Central Africa, Southeast Asia, Central and South America, and the Caribbean. People in these regions are generally faced with high population growth and recurring food shortages, conditions that augment the importance of high yield, low cost crops like bananas and

plantains¹. They yield a sweet, nutritious fruit and produce a starch that can be used to prepare a variety of staple foods. Bananas and plantains also provide more than just complex carbohydrates. They also yield a diverse array of useful secondary products such as fibers, wrappers, confectioneries, vegetables, catsup, beer, wine and vinegar^{1,2}.