



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistentes (*Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme*) después de infección con *Phytophthora infestans***

**Rosa Erlide Prieto Correa**

Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Bogotá D.C  
2011



**Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistentes (*Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme*) después de infección con *Phytophthora infestans***

**Rosa Erlide Prieto Correa**

**Como requisito parcial para optar por al título de  
Maestría en Ciencias – Bioquímica**

**Director: PhD. Humberto Miguel Zamora Espitia  
Director del grupo de investigación en Bioquímica Fitopatología y Evolución  
Molecular  
Departamento de Química**

**Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Bogotá D.C  
2011**

**Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans***

---

**PhD. Humberto Miguel Zamora Espitia**

**Director**

---

**JURADO**

---

**JURADO**

---

**Postgrado**

**Facultad de Ciencias**

---

**Decano Académica**

**Facultad de Ciencias**

## Resumen

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son componentes importantes en todas las especies, estos se encuentran en grandes cantidades en plantas cuando se producen infecciones y en animales cuando presentan inflamaciones donde pueden presentar un amplio espectro de actividad. Las defensinas de plantas (DP) o  $\gamma$ -tioninas son un grupo de PAM con mecanismos de acción que favorecen su actividad contra hongos fitopatógenos, algunas presentan actividad antibacteriana contra Gram negativas, Gram positivas, además actividad citotóxica contra células tumorales. En este trabajo se aisló y purificó una  $\gamma$ -tionina o defensina presente en los espacios intercelulares de plantas de tomate obtenida mediante la extracción del líquido de lavado intercelular de hojas de tomate *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme* después de ser infectadas con *Phytophthora infestans*. Esta  $\gamma$ -tionina es un péptido básico de punto isoeléctrico de 10,5, con una masa molecular de 5,27 kDa. A este péptido se le determinó la composición de aminoácidos mediante cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) presentando un alto porcentaje en aminoácidos tales como: cisteína, arginina, lisina y glicina. Posteriormente se evaluó la capacidad anti fúngica contra la cepa de *P. infestans* utilizada para la infección de las plantas de tomate en este trabajo. La actividad antibacteriana se evaluó sobre bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus*, y bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* y *E. coli* y se evaluó la actividad citotóxica en líneas celulares tumorales MCF-7, mostrando actividad contra el hongo y las bacterias Gram(+) y Gram(-) pero no así contra las líneas tumorales. La concentración de péptido requerida para la inhibición del 50% de crecimiento de *P. infestans* y las bacterias estuvo entre 3 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente.

## Abstract

Antimicrobial peptides (MAP) are important components in all species, these are found in large amounts in plants when there are infections and inflammations in animals when they have where they can present a wide spectrum of activity. The plant defensins (DP) or  $\gamma$ -thionins are a group of PAM mechanisms of action that favor its activity against fungal pathogens, some have antibacterial activity against Gram-negative, Gram positive, further cytotoxic activity against tumor cells. In this work we isolated and purified a  $\gamma$ -thionin or defensin present in the intercellular spaces of tomato plants obtained by extraction of the intercellular washing fluid of leaves of tomato *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme* after being infected with *Phytophthora infestans*. This  $\gamma$ -thionin is a basic peptide isoelectric point of 10.5, with a molecular mass of 5.27 kDa. In this peptide the amino acid composition was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) showing a high percentage of amino acids such as cysteine, arginine, lysine and glycine. Then the antifungal ability against *P. infestans* strain used for infection of tomato plants in this work was evaluated. The antibacterial activity was evaluated on Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*, and gram-negative bacteria such as *Pseudomonas* and *E. coli* and evaluated the cytotoxic activity in tumor cell lines MCF-7, showing activity against fungi and Gram (+) and Gram (-) but not against tumor lines. The peptide concentration required for 50% inhibition of growth of *P. infestans* and bacteria was between 3 and 20 mg /mL, respectively.

# Contenido

Pág.

	Resumen	
	Introducción	1
1.	Planteamiento del problema y justificación	4
1.1	Planteamiento del problema	4
1.2	Justificación	4
2.	Objetivos	6
2.1	Objetivo General	6
2.2	Objetivos Específicos	6
3.	Marco teórico y estado del arte	7
3.1	Interacción entre las plantas y sus patógenos	7
3.2	Defensas preformadas en las plantas	8
3.3	Defensas inducidas por la presencia de patógenos	8
3.4	Resistencia Sistémica Adquirida (RSA)	10
3.4.1	Señalizadores en RSA	12
3.5	Péptidos Antimicrobianos (PAM)	14
3.6	Patógeno <i>Phytophthora infestans</i>	26
3.6.1	Clasificación Taxonómica	26
3.6.2	Descripción	27
3.6.3	Ciclo Biológico	27
3.6.4	Enfermedad: Tizón Tardío	30
4.	Materiales y métodos	32
4.1	Materiales	32
4.1.1	Propagación en invernadero del material vegetal	32
4.1.2	Material biológico fitopatógeno	32
4.1.3	Inducción de resistencia sistémica en plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>Cerasiforme</i> con <i>P. infestans</i> )	33
4.1.4	Extracción de la proteína	34
4.2	Métodos	35
4.2.1	Cuantificación de proteína	35
4.3	Obtención del Péptido	35
4.3.1	Microprecipitación con Sulfato de Amonio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	36
4.3.2	Separación con Membrana Amicon Ultra-4-10KDa	36
4.3.3	Liofilización	36

VIII **Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans***

---

4.3.4	Diálisis	37
4.4	Purificación del Péptido	37
4.4.1	Cromatografía de Intercambio Aniónico (CIA)	37
4.4.2	Cromatografía de Intercambio Catiónico (CIC)	38
4.5	Caracterización Parcial del Péptido	39
4.5.1	Electroforesis SDS-TRICINA-PAGE	39
4.5.2	Determinación del Peso Molecular (PM)	40
4.5.3	Determinación del punto isoeléctrico (pI)	40
4.5.4	Determinación de la composición de Aminoácidos del Péptido por HPLC	41
4.6	Determinación de actividad antimicrobiana	43
4.6.1	Actividad Antimicrobiana sobre bacterias Gram +/-	43
4.6.3	Efecto sobre el crecimiento de <i>P. infestans</i>	43
4.6.4	Ensayo de Citotoxicidad en células MFC-7	44
5.	Resultados y análisis	45
5.1	Material vegetal	45
5.1.1	Cultivo de plantas de Tomate	45
5.2	Material biológico del fitopatógeno	46
5.2.1	Propagación de <i>P. infestans</i> in vitro	46
5.3	Inducción de resistencia sistémica en plantas de tomate con <i>P. infestans</i>	47
5.4	Extracción de proteína	47
5.4.1	Obtención del líquido de lavado intercelular (LLI)	47
5.5	Cuantificación de proteína	48
5.6	Obtención y Purificación de la proteína	48
5.6.1	Filtración por Membrana Amicon Ultra-4-KDa	48
5.6.2	Microprecipitación con Sulfato de Amonio	49
5.6.3	Cromatografía de Intercambio Aniónico (CIA)	51
5.6.4	Cromatografía de Intercambio Catiónico (CIC)	52
5.6.5	Electroforesis con SDS-TRICINA-PAGE	53
5.7	Caracterización del péptido	54
5.7.1	Determinación del peso molecular del péptido	54
5.7.2	Determinación del punto isoeléctrico del péptido	56
5.7.3	Determinación de la composición de aminoácidos presentes en el péptido	58
5.7.4	Determinación de la actividad antimicrobiana del péptido contra bacterias Gram +/- y <i>P. infestans</i>	61
5.7.5	Determinación de la Actividad Citotóxica	64
6.	Conclusiones y recomendaciones	67
6.1	Conclusiones	68
6.2	Recomendaciones	69
	Anexos	
	Bibliografía	82



## Indice de tablas

<b>Tabla 1</b>	Resumen resultados de la propagación del material vegetal	45
<b>Tabla 2</b>	Resultados de extracción de LLI para plantas sanas e inoculadas	47
<b>Tabla 3</b>	Cuantificación de proteína y Actividad antimicrobiana de la fracción CIA	52
<b>Tabla 4</b>	Cuantificación de proteína y Actividad antimicrobiana de la fracción CIC	53
<b>Tabla 5</b>	Estudio estadístico de los patrones de aminoácidos obtenido de la derivatización con PTC y sus curvas de calibración.	<b>59</b>
<b>Tabla 6</b>	Composición de Aminoácidos de la Defensina o $\gamma$ -Tionina purificada.	61
<b>Tabla 7</b>	Determinación de Actividad citotóxica	65

X	<b>Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente <i>Lycopersicum esculentum</i> var. <i>Cerasiforme</i> después de infección con <i>Phytophthora infestans</i></b>	
---	--	--

---

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b>	Alineación de la secuencia de aminoácidos de tioninas	16
<b>Figura 2</b>	Comparación de estructuras 3D de tioninas de plantas	20
<b>Figura 3</b>	Probable mecanismo de acción de las tioninas con actividad Antifúngica	25
<b>Figura 4</b>	Ciclo de vida de <i>P. infestans</i>	28
<b>Figura 5</b>	Síntomas del tizón tardío ocasionadas por <i>P. infestans</i>	30
<b>Figura 6</b>	Obtención del material vegetal	46
<b>Figura 7</b>	Obtención del material biológico	46
<b>Figura 8</b>	Perfil electroforético SDS-TRICINA-PAGE después de placas Amicom	49
<b>Figura 9</b>	Perfil electroforético SDS-TRICINA-PAGE después de Sulfato de Amonio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	50
<b>Figura 10</b>	Perfil electroforético SDS-TRICINA-PAGE péptido puro	54
<b>Figura 11</b>	Perfil electroforético SDS-TRICINA-PAGE péptido puro (Peso Molecular)	55
<b>Figura 12</b>	Primera dimensión IEF ZOOM pH 3-10	57
<b>Figura 13</b>	Primera dimensión IEF ZOOM pH 9-12	58
<b>Figura 14</b>	Evaluación de la actividad antifúngica e inhibición del crecimiento de <i>P. infestans</i> con el péptido puro	63

## Indice de gráficas

<b>Gráfica 1</b>	Curva de Calibración cuantificación de proteína según Bradford	48
<b>Gráfica 2</b>	Cromatografía de Intercambio Iónico, separación de proteínas fracción filtrado después de separación con membranas Amicon-ultra-4-10KDa	51
<b>Gráfica 3</b>	Cromatografía de intercambio catiónico de la fracción no retenida (FNR) por CIA	52
<b>Gráfica 4</b>	Cromatografía de CIC de la Fracción 1(F1) de la FNR después de CIC	54
<b>Gráfica 5</b>	Curva de calibración determinación del PM	55
<b>Gráfica 6</b>	Inhibición de crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas	62
<b>Gráfica 7</b>	Inhibición de crecimiento de <i>P. infestans</i>	63
<b>Gráfica 8</b>	Actividad citotóxica	65



## Introducción

El tomate o jitomate (*Lycopersicon esculentum*) es un cultivo ampliamente extendido por todo el mundo, con importantes áreas productoras en todos los continentes (Europa, Asia y América sobre todo) y también con unos niveles altos de consumo. 130 millones de toneladas fueron producidas en el mundo en 2008. De acuerdo a la FAOSTAT los principales productores para este año fueron: China (33,8 millones de toneladas), representando cerca de un cuarto de la producción mundial seguido por Estados Unidos (12,6 millones de toneladas) y Turquía (10,9 millones de toneladas).

La superficie dedicada a este cultivo en Europa se ha incrementado ligeramente con respecto al año anterior. Esto se ha traducido en un aumento de producción que en la zona del mediterráneo es superior a un 9%, situándose en 14.567 miles de toneladas (Tomate News). En Estados Unidos específicamente el estado de California, principal productor de tomate la producción (10.720 miles de toneladas) fue algo inferior a la del año anterior (un 2,1% menos), al igual en los países productores del Hemisferio Sur (Brasil, Argentina, Chile, Australia, etc), en los que también ha disminuido. Con todo ello, la producción mundial de tomate se ha incrementado para este año en un 7% (Tomate News).

La producción de tomate en Colombia se ha caracterizado en los últimos años por un buen ritmo de crecimiento como resultado del mejoramiento de los circuitos comerciales y la tecnificación de los cultivos. La tecnificación se ve representada en la producción bajo invernadero, mecanismos de manejo integrado de plagas, implementación de buenas prácticas agrícolas, manejo de los estándares fitosanitarios para exportación, entre otros.

Según la Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA), para el 2007 la producción de tomate en el país representó el 23% de la producción de hortalizas para ese mismo año frente a una participación del 9% en lo que respecta al área sembrada.

Estos porcentajes dan prueba del alto rendimiento de este producto que para el 2007 tuvo una relación de 33 toneladas de producción por cada hectárea sembrada, siendo la hortaliza (de cultivo transitorio) de mayor rendimiento superando ampliamente el promedio del grupo que fue de 13 t/ha.

La importancia económica de este cultivo, hace vital la búsqueda de estrategias de mayor efectividad, mediante métodos biotecnológico en cuanto a identificación y tratamiento de plagas y enfermedades, así como la obtención de sistemas de producción de semillas resistentes, nutrición y técnicas de cultivo adecuadas a la zona productora. El manejo integrado de plagas (MIP) permite al productor el acceso a mercados de exportación que exigen alta calidad fitosanitaria. Dicho manejo incluye distintas metodologías de control biológico, químico, cultural y mecánico.

El tomate es una planta de la familia solanácea que hace parte de la alimentación básica de muchos pueblos del mundo, es susceptible a infecciones con *Phytophthora infestans*, un oomycete necrófilo que desde hace más de siglo y medio viene causando a esta familia de plantas la enfermedad tizón tardío, penetrando por sus estomas o directamente por la epidermis. Los daños causados por este patógeno en el campo durante y después del almacenamiento pueden representar pérdidas hasta del 100%. Datos históricos acerca de la enfermedad muestran que entre 1845 y 1848 se produjo una hambruna en Irlanda y sus habitantes tuvieron que migrar a Europa y Estados Unidos debido a la invasión de *Phytophthora infestans* sobre las plantaciones de papa (Jaramilo, S., 2003)

Bajo condiciones hostiles las plantas producen compuestos antimicrobianos tales como: fitoalexinas, péptidos antimicrobianos y proteínas de bajo peso molecular tales como tioninas, defensinas, inhibidores de proteasas y proteínas transportadoras de lípidos entre otras.

Hasta el momento se han realizado diversos estudios sobre péptidos antifúngicos (Woloshuk y colaboradores (1991); Kristensen y colaboradores (1991)) los cuales han

dado a conocer proteínas con pesos moleculares de 5KDa en adelante y con 50 aminoácidos de longitud involucrados en el mecanismo de defensa de las plantas. Un grupo de estas proteínas se les denominó Proteínas-PR. Otro grupo de proteínas antifúngicas, de pesos moleculares más bajos que las PR son las conocidas como  $\gamma$ -tioninas o defensinas, las cuales son pequeñas proteínas clasificadas en cuatro grupos principales, de acuerdo a sus funciones específicas.

Las proteínas PR se han aislado de plantas de tomate, tabaco y papa encontrando en algunas actividad antifúngica contra microorganismos como *Phytophthora infestans*, *Clavibactermichiganensi*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium Oxysporum*, los cuales atacan entre otros éstos cultivos.

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación se habían aislado proteínas de muy bajo peso molecular con actividad antimicrobiana (Riaño 2004 ) Sin embargo, no se conocía el tipo de tionina y/o defensina inducida en las plantas de tomate, cultivo de gran importancia en la agricultura colombiana, en presencia de agentes fúngicos patógenos como *Phytophthora infestans* hasta que en este trabajo se evaluó y determinó que se trataba de este tipo de péptido antimicrobiano.

En el presente trabajo se aisló, purificó, caracterizó e identificó parcialmente la defensina  $\gamma$ -tionina presente en los espacios intercelulares de las plantas de tomate resistente *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme* después de ser infectadas con *Phytophthora infestans*, con el fin de utilizarla como una herramienta más que ayude al diseño de estrategias de control biológico contra este patógeno.





# 1. Planteamiento del problema y justificación

## 1.1. Planteamiento del problema

*Phytophthora infestans* es un patógeno que ataca a las plantas de la familia solanácea produciendo pérdidas significativas a los productores durante la cosecha, la post cosecha y durante el almacenamiento

Las defensinas y/o  $\gamma$ -tioninas son herramientas importantes para el fito-mejoramiento y desarrollo de plantas transgénicas resistentes a ciertos patógenos. Las plantas transgénicas que expresan los más altos niveles de  $\gamma$ -tioninas de otras plantas pueden incrementar la resistencia patogénica, reduciendo las pérdidas de los cultivos. Con este conocimiento previo, en este trabajo pretendemos elucidar la función que desempeñan las  $\gamma$ -tioninas del tomate *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme* frente al ataque de *Phytophthora infestans* y frente a otros hongos y eventualmente en cultivo de células.

## 1.2. Justificación

La utilización de mecanismos de defensa en plantas, particularmente la expresión y regulación de la resistencia de amplio espectro asociada al fenómeno SAR, surge como una alternativa viable para diseñar estrategias para el control de patógenos. La comprensión de los mecanismos naturales mediante los cuales las plantas son capaces de defenderse, permiten producir plantas con mayores niveles de resistencia, sin que sea necesario hacer uso de genes foráneos o extraños a la especie.

A pesar de que aún queda mucho por investigar, los esquemas basados en la regulación de los mecanismos naturales de respuesta al ataque de patógenos, representa una forma más viable y duradera de producir plantas genéticamente modificadas. En

contraste con las estrategias que tienden a introducir genes foráneos y únicos de resistencia a patógenos cuya capacidad de conferir resistencia es superada rápidamente por las poblaciones de patógenos o insectos.

De este hecho surge la necesidad de purificar y caracterizar las tioninas o defensinas presentes en los espacios intercelulares que se ha encontrado juegan un papel importante en el mecanismo que se está elucidando para el desarrollo de un sistema de control contra el patógeno en estudio.

## 2. objetivos

### 2.1 Objetivo General

Aislar, purificar y caracterizar parcialmente las tioninas presentes en los espacios intercelulares de las hojas de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme*) resistente después de infección con *Phytophthora infestans* para evaluar su efecto antimicrobiano contra organismos y su citotoxicidad.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de inducción producido sobre la expresión de tioninas presentes en los espacios intercelulares de hojas de tomate variedad resistente antes y después de infección con *P. Infestans*
- Aislar, purificar y caracterizar la  $\gamma$ -tionina o defensina presente en los espacios intercelulares de las hojas de tomate resistente *Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme* después de haber sido infectadas con *Phytophthora infestans*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del péptido encontrado contra el hongo *P. infestans* y bacterias *Gram positivas y negativas*
- Evaluar la actividad inhibitoria del péptido obtenido sobre cultivos en crecimiento de tejidos animales.



## Marco teórico y estado del arte

### 3.1 Interacción entre las plantas y sus patógenos

Las plantas están expuestas continuamente al ataque de patógenos, incluso de otras plantas. Las plantas son organismos sésiles (inmóviles) y no pueden escapar, pero cada célula vegetal posee mecanismos de defensa activos (un “sistema de alerta”) y también inducibles (se activan cuando la planta entra en contacto con el patógeno). Esta es una diferencia importante con respecto al sistema inmunológico de los vertebrados, ya que en ellos existen células especializadas que viajan rápidamente al sitio de la infección, donde eliminan al organismo invasor, o limitan su distribución. En las plantas, el mecanismo de defensa está localizado en cada célula para minimizar las infecciones. Por lo anterior, la *enfermedad* podría definirse como el resultado de una infección exitosa. Sin embargo, una enfermedad de este tipo raramente mata a la planta. Podría interpretarse que, por selección natural, han sobrevivido los patógenos de menor toxicidad (que no matan a su huésped al que necesitan para reproducirse) y/o las plantas más resistentes a estos patógenos.

Se pueden reconocer dos tipos de interacciones entre las plantas y los patógenos, en función de las respuestas de la planta al ataque del agente extraño:

- Interacciones compatibles: aquellas en las cuáles un patógeno logra infectar y enfermar a una planta. Pueden ocurrir si las condiciones ambientales son favorables, si las defensas preformadas de la planta son inadecuadas, si la planta falla en detectar al patógeno, e incluso si las respuestas de defensa activadas son inefectivas.
- Interacciones incompatibles: aquellas en las cuáles no hay enfermedad porque se da un fenómeno de resistencia de la planta. Estos mecanismos de resistencia pueden ocurrir por:

- 10 Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*
- 

1. Resistencia de tipo “no hospedante”: la especie vegetal atacada no le brinda al patógeno las condiciones necesarias para completar su ciclo de vida, o posee barreras estructurales preformadas, o sintetiza compuestos tóxicos.
2. Mantener la infección confinada tras el reconocimiento del patógeno que está atacando.
3. Condiciones medioambientales inestables que provocan la muerte del patógeno antes de poder “acomodarse” al nuevo medio.

### 3.2 Defensas preformadas de las plantas

Muchas plantas poseen defensas preexistentes al ataque del patógeno las cuáles pueden clasificarse en:

- **Bioquímicas.** Involucran tres grandes grupos de compuestos: péptidos y proteínas; metabolitos secundarios, e inhibidores de proteasas. La mayoría de las plantas sanas poseen muchos metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas. Tales compuestos pueden estar presentes en su forma activa, o estar almacenados como precursores inactivos que son convertidos en las formas biológicamente activas por enzimas de la planta, en respuesta al ataque de patógenos o al daño de los tejidos. En general, estos compuestos inhibidores preformados se encuentran almacenados en vacuolas u otros organelos de las capas celulares externas de la planta. Dos ejemplos de inhibidores preformados muy bien estudiados son las saponinas y los glucosinolatos.
- **Mecánicas.** Incluyen grosor de la epidermis, calidad de la cutícula, forma, tamaño y localización de los estomas.

### 3.3 Defensas inducidas por la presencia del patógeno

Para activar rápidamente sus respuestas de defensa, la planta emplea un sistema de vigilancia sofisticado capaz de distinguir entre las señales propias y las generadas por un patógeno. Más aún, la planta es capaz de discriminar las señales emitidas por agentes

patógenos de las generadas por organismos benéficos, tales como la bacteria *Rhizobium* (involucrada en la fijación de nitrógeno en relación simbiótica con plantas leguminosas) y como las especies fúngicas que forman micorrizas. La respuesta de la planta implica modificar el metabolismo de las células vegetales involucradas en la reacción de defensa. Esto incluye la activación de genes involucrados en funciones de defensa, la apertura de canales para el intercambio de iones, la modificación de proteínas y la activación de enzimas preexistentes (Buchanan et al., 2000)).

Esta inducción de las respuestas defensivas de la planta en forma rápida y altamente localizada resulta en la generación de un ambiente de condiciones desfavorables para el crecimiento y reproducción del patógeno. Al mismo tiempo, las células vegetales eliminan y dificultan la dispersión de toxinas generadas por el patógeno. Estas respuestas inician una respuesta sistémica de más larga duración denominada *Resistencia Sistémica Adquirida* que previene a la planta y a otras vecinas contra ataques futuros del mismo u otros patógenos. Dado que estas respuestas requieren una gran inversión de componentes celulares, las defensas se mantienen bajo un ajustado control genético y sólo se activan frente a la presencia del patógeno.

La activación completa de una respuesta intensa contra el patógeno ocurre dentro de las primeras 24 horas, conduciendo directa o indirectamente a la muerte celular y tisular localizada. Dentro de las respuestas de defensa inducidas por la presencia del patógeno, se pueden distinguir (entre otras):

- Respuesta hipersensible: rápida activación de las reacciones de defensa asociadas a la muerte celular en la planta huésped. Esta respuesta afecta al patógeno de diferentes maneras: en el caso de los biótros, los priva del acceso a más nutrientes; en el caso de los necrótrofos, la muerte celular resultaría en la liberación de sustancias inhibitorias para el patógeno.
- Activación de proteínas relacionadas a la patogénesis (proteínas PR): son proteínas sintetizadas por la planta en respuesta al ataque del patógeno, que se acumulan rápidamente luego del reconocimiento. Algunas PR son quitinasas o glucanasas, enzimas capaces de degradar a los polisacáridos que constituyen la pared celular de

muchos hongos, reduciendo su crecimiento. Otro ejemplo de proteínas PR son las lipooxigenasas, enzimas que generan moléculas que extienden a toda la planta el estado de “alerta”.

- Síntesis de Fitoalexinas: son moléculas que tienen actividad antimicrobiana. Se acumulan rápidamente en los sitios de interacción con el patógeno, y se biosintetizan utilizando nuevas rutas metabólicas que se activan por la misma presencia del patógeno.
- Silenciamiento génico post-transcripcional: es inducido tras la invasión de la planta por distintos virus. La planta es capaz de reconocer estadios de la replicación viral o una cantidad elevada de ácidos nucleicos consecuencia de la replicación del virus. Como respuesta, se induce el mecanismo que consiste en la degradación del ARN viral.
- Respuestas estructurales: entre ellas, el entrecruzamiento de componentes de la pared celular y la expulsión de papilas formadas en el sitio por el cual el patógeno intenta ingresar.

Muchas de las respuestas mencionadas ocurren en conjunto, garantizando una defensa más eficiente. Durante la evolución conjunta de patógenos y plantas, se han ido seleccionando mecanismos que permiten a ambos miembros de la interacción defenderse del otro, donde cada estrategia de una de las partes de la interacción es contrarrestada por una nueva en su contraparte. Por ejemplo, como consecuencia de la co-evolución entre los organismos y sus patógenos, han surgido mecanismos por los cuáles muchos virus pueden evitar la respuesta de defensa de la planta a través de genes que codifican para la síntesis de proteínas “supresoras del silenciamiento”.

### 3.4 Resistencia sistémica adquirida (RSA)

Como respuesta al ataque de patógenos, se activan numerosos genes cuyos productos degradan la pared celular de bacterias u hongos, destruyen células infectadas, etc. Esta inducción no ocurre sólo en el tejido inicialmente infectado, sino en hojas y otros tejidos expuestos al patógeno gracias a señales que son transportadas a través del floema (Ruiz-Medrano et al., 2001). El ácido salicílico es capaz de inducir genes de defensa en



hojas no infectadas, si bien algunos trabajos sugieren que éste es necesario para establecer la respuesta de defensa en hojas locales y sistémicas, pero no es la señal móvil misma (Ryals et al., 1995).

Experimentos recientes han demostrado en *Arabidopsis thaliana* que una proteína de unión a lípidos es necesaria para el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida, lo que podría sugerir que las señales móviles son de naturaleza lipídica (Maldonado et al., 2003). Por otra parte, daño mecánico por insectos activa genes de inhibidores de proteasas, altamente tóxicos para éstos. Señales transportadas en el floema inducen estos genes también en hojas intactas. En algunas especies, se ha encontrado que un péptido sintetizado en la célula acompañante, la sistemina, es la señal transportada (Ryan y Pearce, 1998).

Dos características de RSA son: (1) es efectiva contra un amplio espectro de diferentes patógenos y (2) es a largo plazo. El espectro de patógenos puede variar dependiendo de la planta tratada. La fuerza y estabilidad de la resistencia inducida durante varias semanas pueden ser influenciadas por factores como las condiciones climáticas y la nutrición. La observación de que RSA se dispersa en la planta principalmente en dirección apical, y se mueve hacia yemas injertadas, sugiere fuertemente que las señales que establece RSA son traslocadas a través de la planta.

En las células más distantes o sea las partes no infectadas de la planta, las primeras reacciones de defensa tipo RSA son la síntesis de proteínas relacionadas a patogénesis, llamadas proteínas PR, las enzimas  $\beta$ -1,3 glucanasas, endohidrolasas, quitinasas, inhibidores de enzimas como la taumatina, inhibidores de amilasa y proteasas. Los genes que son inducidos en las infecciones primarias por el patógeno, se expresan localmente y también sistémicamente en la planta por lo que son llamados genes RSA. Otros genes que también gobiernan las reacciones de defensa no son expresados sistémicamente (Sha y Klessig, 1996).

#### **3.4.1 Señalizadores en RSA: características generales**

Existe un grupo de fitohormonas, incluyendo a las auxinas, las citoquininas, el etileno, el ácido abscísico y el ácido jasmónico que funcionan en las células vegetales como iniciadores de cascadas de señalización, las cuales determinan diferentes patrones de expresión de genes requeridos para mantener y extender espacial y temporalmente tales respuestas. El contacto de las plantas con microorganismos las ha llevado a desarrollar sistemas de defensa inducibles que previenen o limitan posibles efectos patogénicos. Ante la invasión del tejido vegetal por un microorganismo, la respuesta de defensa inducible más temprana, o local, es la muerte celular controlada. Esta “respuesta hipersensible” es un fenómeno cuyo objetivo es restringir la zona de invasión del microorganismo, aislando el área por medio del refuerzo mecánico de las paredes celulares de células circundantes y secretando compuestos que son tóxicos para el patógeno, o bien que funcionan como segundos mensajeros en las células vegetales en la zona aislada (fitoalexinas, péptidos pequeños conocidos como defensinas, glucanasas, quitinasas y especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, y como agentes tóxicos contra los patógenos)(López et al., 2008)

### **3.4.1.1 Ácido Jasmónico (JA)**

El ácido jasmónico (JA) es un derivado ciclopentanona del ácido linolénico que

presenta las características de una hormona de plantas (Sembdner y Parthier 1993).

Cuando se produce un daño mecánico, aumentan los niveles endógenos de JA (Creelman et al., 1992), por una síntesis de *novo*, la cual provoca la activación transcripcional de diversos genes (genes inducibles por herida). El JA aplicado exógenamente es capaz de inducir estos mismos genes en plantas no dañadas (Farmer et al., 1992; Hildmann et al., 1992). Entre estos genes se encuentran inhibidores de proteasas, y genes de la vía de los fenilpropanoides (CHS, PAL, HMGR) (Dittrich et al., 1992; Creelman et al., 1992), que dan lugar a la síntesis de fitoalexinas, compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que se sintetizan y acumulan en las plantas después de la exposición a microorganismos. Este hecho establece una relación entre las respuestas de defensa por

lesión y el ataque por patógenos.

### **3.4.1.2 Ácido Salicílico (AS)**

El ácido salicílico (AS) es una hormona que se encuentra implicada en la activación del RLI y RSA. El aumento en los niveles endógenos del AS y sus derivados en plantas inoculadas con patógenos coincide con la elevada expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con patogenicidad (PR) y la activación de la resistencia a la enfermedad.

Según Dong (2001), la respuesta de una planta a una infección es determinada por caracteres genéticos tanto del hospedero como del patógeno. Los genes de resistencia permiten el reconocimiento de moléculas específicas del patógeno que resultan de la expresión de los llamados genes de avirulencia. La interacción “gen-por-gen” genera una serie de cambios fisiológicos en el sitio de infección, muerte localizada de las células involucradas con el patógeno lo que evita su crecimiento y diseminación (conocido como respuesta hipersensible de las células muertas), producción de especies activas de oxígeno (EAO), síntesis de fitoalexinas antimicrobiales y acumulación de AS. Las EAO son compuestos que utiliza la planta en la disipación energética y sirven como señalizadores desencadenantes de respuestas de adaptación y defensa.

Para Syngenta (2001) el AS juega un rol importante en la SAR, al acumularse en la planta después de pre-infecciones locales. La SAR no puede ser biológicamente inducida en plantas que no son capaces de inducir la acumulación de AS. Esta es una fuerte indicación que el AS es una molécula importante de señalización líder en la SAR.

”El AS es un compuesto encontrado en todos los tejidos de las plantas. Su concentración se eleva cuando las células, órganos o plantas son sometidos a la acción de alguna clase de estrés, sea éste biótico o abiótico. En estas situaciones el AS participa en forma importante en la cascada de señalización que da lugar a las respuestas de adaptación en

ambientes extremos, a la expresión de los sistemas de control del daño oxidativo así como a la inducción de la SAR en el caso de patogénesis” (Benavides, s.f.).

La MAP kinasa MPK4 es necesaria para la inducción de los genes defensina (*PDF1.2*) y tionina (*THI2.1*) por MeJA, y el mutante *mpk4* expresa constitutivamente genes de defensa (*PR*) regulados por ácido salicílico (SA), lo que sugiere que MPK4 regula la interacción entre las rutas de activación de defensas mediadas por SA y JA (Petersen et al., 2000).

Por otro lado, según Kessmann, H.; Staub, T.; Oostendorp, M.; Ryals, J. (1994), citado por Lardizabal, (2000), afirman que la aplicación exógena de AS logra que la planta empiece a subir sus defensas internas contra las enfermedades para defenderse por sí misma.

### **3.5 Péptidos antimicrobianos (PAM)**

Los microorganismos son las formas de vida más abundantes en el planeta, siendo muchos de ellos potencialmente patógenos para otros seres vivos como plantas, animales que han venido evolucionando combatiendo al ataque constante de microorganismos mediante el desarrollo de sistemas de defensa que varían en complejidad de acuerdo al grado evolutivo del organismo.

En todos los seres vivos donde se ha estudiado, se ha descrito un mecanismo de defensa conocido como inmunidad innata, la cual es una respuesta no específica e inmediata que se activa por el contacto con agentes extraños. En los últimos años se han descrito diversas moléculas efectoras de la respuesta innata dentro de las que se encuentran las proteínas de bajo peso molecular, conocidas como péptidos antimicrobianos (PAM). Aunque combaten un amplio espectro de microorganismos, debido a su mecanismo de acción, estos péptidos no afectan a

las células eucarióticas. Por ello, los péptidos antimicrobianos se están estudiando intensamente y se están ensayando como agentes antimicrobianos con aplicación en la producción de alimentos y como agentes terapéuticos.

Las plantas no producen ningún tipo de inmunoglobulinas; sin embargo, al igual que los animales, producen sustancias que controlan el crecimiento e invasión de microorganismos. Además producen una gran variedad de compuestos biológicamente activos, dentro de los cuales se encuentran pequeños péptidos, tales como proteínas de transferencia de lípidos, puroindolinas,  $\alpha/\beta$ -tioninas,  $\gamma$ -tioninas, defensinas de plantas, péptidos ricos en glicina y snakins y desempeñan un papel importante al defenderse de los microorganismos invasores (hongos y bacterias).

Las tioninas son pequeños péptidos ricos en cisteína, usualmente proteínas básicas encontradas en monocotiledóneas (granos) eudicotiledóneas que incluyen plantas dicotiledóneas (diferentes especies de mistletoe y *Pyralariapubera*), y rosids (crambinas). Alrededor de 100 secuencias de tioninas han sido identificadas en más de 15 especies de plantas diferentes. El nombre de tioninas usado para dos diferentes pero bien caracterizados grupos de péptidos de plantas,  $\alpha/\beta$ -tioninas, y  $\gamma$ -tioninas. A pesar del nombre común y probablemente, origen común muy lejano, ellas tienen diferentes estructuras tridimensionales. Por lo tanto se han considerado familias de proteínas separadas por lo que las  $\gamma$ -tioninas se consideran más apropiadamente defensinas de plantas.

Tradicionalmente,  $\alpha/\beta$  tioninas fueron subdivididas en cinco diferentes clases (I, II, III, IV, y V) (Bohlmann, 1991) y algunos investigadores distinguen una clase adicional,  $\gamma$ -tioninas. Las tioninas tipo I están presentes en el endospermo de los granos (familia *Poaceae*) (Ergorov, 2005), son altamente básicas, y consisten de 45 aminoácidos, 8 de los cuales son cisteínas. El tipo II fue aislado de hojas y nueces de la planta parásita *Pyralariapubera* (Vernon 1992), y de las hojas de cebada *Hordeumvulgare* (Bohlmann, 1987; Rodríguez-Palenzuela, 1988). Ellas son ligeramente menos básicas que las de tipo

I (reducen la carga positiva de +10 a +7) y consisten de 46-47 aminoácidos. Ambos tipos I y II tienen cuatro enlaces disulfuro. El tipo III ha sido extraída de hojas y tallo de especies de mistletoe, tales como *Viscum album*, *Phoradendron tomentosum*, *Phoradendron liga*, y *Dendrophthora clavata* (Samuelsson, 1970; Mellstrand, 1973; Thunberg, 1982; Samuelsson, 1977) y consiste de 45-46 aminoácidos. Estas tioninas, que tienen tres puentes disulfuro conservados con respecto a los tipos I y II, son tan básicas como las del tipo II. El tipo IV, que consiste de 46 aminoácidos con tres enlaces disulfuro y carga neutra, ha sido extraído de semillas de *Abyssiniancabbage*. El tipo V son formas truncadas de las tioninas regulares encontradas en algunos granos como el trigo, y hasta ahora no han presentado actividad tóxica.

Todos los cinco tipos de  $\alpha/\beta$  tioninas son altamente homólogos en el nivel de aminoácidos. Trabajos estructurales han mostrado que las cinco clases exhiben el mismo motivo estructural, y las clasificaciones anteriores parecen menos soportadas por estructuras tridimensionales.

Las tioninas aisladas y caracterizadas hasta ahora fueron agrupadas según el origen como toxinas de muérdago (clase III) tioninas biológicamente activas (clases I-III) y todas las tioninas (clase I-V), alineándolas separadamente con ligatoxina B como se muestra en la Fig 1(A).

**A**

Ligatoxin B	KSCPSTTARNIYNTCRLTGA-SRVCASLGGCKIISGSTCDSGWNH	46
Ligatoxin A	KSCPSTTARNIYNTCRLTGT-SRPTCASLGGCKIISGSTCDSGWNH	46
Phoratoxin A	KSCPSTTARNIYNTCRFGGG-SRPVCAKLSGCKIISGTCDSNGNH	46
Phoratoxin B	KSCPSTTARNIYNYCRFGGG-SRPICAKLSGCKIISGTCDSNGDH	46
Denclatoxin	KSCPPTAARNQYNICRLPGT-PRPVCAALSGCKIISGTGCPPGYRH	46
Viscotoxin A2	KSCPNTTGRNIYNTCRFGGG-SRQVCASLGGCKIISASTCPSDYFK	46
Viscotoxin 1-Ps	KSCPNTTGRNIYNTCRFGGG-SREVCARISGCKIISASTCPSDYFK	46
Viscotoxin B	KSCPNTTGRNIYNTCRLGGG-SRERCASLGGCKIISASTCPSDYFK	46
Viscotoxin A1	KSCPSTTGRNIYNTCRLTGS-SRETCALSGCKIISASTCPSNYFK	46
Viscotoxin A3	KSCPNTTGRNIYNACRLTGA-PRPTCAKLSGCKIISGSTCPSDYFK	46
Mistletoe toxin consensus	*****.:** ** *: * . * ** ;*****.: * .. :	
Leaf thionin BTH6	KSCCKDTLARNIYNTCRFAGG-SRPVCAGACRCKIISGPKCPSDYFK	46
Leaf thionin DB4	KSCCKDTLARNIYNTCRFAGG-SRPVCAGACRCKIISGPKCPSDYFK	46
Leaf thionin DG3	KSCCKNTTGRNICYNACRFAGG-SRPVCATACGCKIISGPTCPRDYFK	46
<i>Pyricularia</i> thionin	KSCCRNTWARNICYNVCRLPGTISREICAKKCDCKIISGTCPSDYFK	47
α-avenothionin	KSCCRDTLGRDCYDLCRSRGA-PK-LCATLCRCKIISGLSCPDKFPK	45
β-avenothionin	KSCCKDTLGRDCYDLCRARGA-PK-LCSTLCRCKITSGLSCPDKFPK	45
Secalethionin	KSCCKSTLGRDCYDLCRGRGAE-K-LCAELCRCKITSGLSCPDKFPK	45
α-hordothionin	KSCCRSTLGRNICYNLCRVRAQ-K-LCAGVCRCKLTSSGKCPGTFPK	45
β-hordothionin	KSCCRSTLGRNICYNLCRVRAQ-K-LCANACRCKLTSGLSCPSSFPK	45
α1-purothionin	KSCCRSTLGRNICYNLCRVRAQ-K-LCSTVCRCKLTSGLSCPDKFPK	45
β-purothionin	KSCCKSTLGRNICYNLCRARGA-Q-K-LCANVCRCKLTSGLSCPDKFPK	45
α2-purothionin	KSCCRSTLGRNICYNLCRARGA-Q-K-LCAGVCRCKIISGLSCPDKFPK	45
Active thionin consensus	**** * .*: *: * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Crambin A	TTCCPSIVARSNFVNCRLPGT-PEALCATYTGCIIPGATCPGDYAN	46
Crambin B	TTCCPSIVARSNFVNCRLPGT-SEALCATYTGCIIPGATCPGDYAN	46
Thionin consensus	.:*** .*. :*: * . * : * : * : * : * : *	

**Figura 1:** alineación de la secuencia de aminoácidos de Tioninas. Para las líneas de secuencia se usó el código de una letra para los aminoácidos, donde: \* indica residuos conservados o idénticos en todas las secuencias alineadas. : indica sustituciones conservadas. .Indica sustituciones semi-conservadas. (A) secuencia múltiple alineada de todas las Tioninas secuenciadas con ligatoxina B. (Li et al., 2002)

En todas las Tioninas de muérdago, incluida la ligatoxina B, de los 46 residuos de aminoácidos, 24 fueron idénticos en las posiciones 1-5, 7, 10-11, 13-14, 16-17, 20, 23, 26-27, 30-36 y 40. El C-terminal también se conserva con un residuo de aminoácido básico. Todas las tioninas biológicamente activas presentan una alta homología en el nivel de aminoácidos, con residuos de cisteína altamente conservados, así como también residuos de serina, treonina, tirosina, glicina, alanina y serina en las posiciones 2, 7, 13, 20, 28 y 37 (la numeración corresponde a la secuencia de la tionina de *Pyricularia*) y un residuo de aminoácido menos conservado, cargado positivamente. También se conservan los residuos básicos en N-terminal y C-terminal.

En contraste con las tioninas biológicamente activas, las crambinas no tienen carga positiva a pH neutro, ni un N-terminal o C-terminal básico. La línea general de las tioninas mostró que los residuos de cisteína de la crambina se conservan, lo cual contribuye putativamente a la estabilización de las estructuras avanzadas. Se encontró también una alta conservación en los residuos de alanina y glicina en posiciones 20 y 37 en todas las tioninas. (Li et al. 2002).

Actualmente, algunas especies de granos tales como trigo o arroz han multiplicado variantes de las tioninas diferencialmente expresadas en algunos tejidos. Las tioninas también han sido encontradas en múltiples especies de mistletoe. Samuelsson aisló tioninas de otros miembros de la familia de la *Viscaceae*, tales como foratoxinas A y B de *Phoradendron tomentosum*, denclatoxina B de *Dendrophthora clavata*, y ligatoxinas A y B de *P. liga*. La importancia de estos estudios fue la aplicación de estos extractos para propósitos médicos. Estos extractos mostraron efectos tóxicos severos, especialmente contra células de cáncer (Stein, 1999).

Las  $\gamma$ -tioninas se descubrieron en la década de 1960 como una nueva clase de péptidos de plantas que *in vitro* presentaban actividad letal contra patógenos de plantas. Fueron los primeros péptidos purificados de células eucariotas que tenían un papel clave en la defensa de las plantas. Esta clase de péptidos encontrados en algunos tejidos de plantas, como semillas, estomas y raíces se han localizado dentro y fuera de la célula, incluyendo el espacio extracelular (Selitrinnikoff, 2001).

Se ha encontrado que las  $\gamma$ -tioninas cumplen diversas funciones en la naturaleza, mostrando tanto actividad antimicrobiana como antifúngica (Thevissen et al., 1996), inhibiendo el crecimiento de células de mamíferos por permeabilización de membrana (Li et al., 2002) e inhibiendo  $\alpha$ -amilasas y proteasas en insectos (Bloch & Richardson, 1991). Aunque las  $\gamma$ -tioninas actúan en la defensa de las plantas contra el ataque de patógenos, se han encontrado algunas excepciones como por ejemplo una proteína cargada en forma neutra conocida como



crambina, proveniente de la semilla de *Crambeabyssinica*, aunque no muestra ni actividad antimicrobiana, ni antifúngica, ni inhibición enzimática, es responsable del sabor dulce en las semillas de la planta.

La mayoría de residuos son extremadamente variables, demostrándose en estudios *in silico*, que la homología de la estructura primaria de  $\gamma$ -tioninas no es suficiente para determinar su función biológica (De Lucca et al., 1997; Selitrennikoff, 2001). Sin embargo, se ha encontrado que el dominio C-terminal de las  $\gamma$ -tioninas es un importante determinante en la actividad antifúngica, así como también los aminoácidos básicos lisina y arginina. En otros estudios se ha encontrado una estructura bioactiva muy conservada entre los péptidos antimicrobiales. Cuando NaD1 (*Nicotianaalata*defensina) una proteína parecida a la  $\gamma$ -tionina de las flores de *Nicotianaalata*, con actividad biológica hacia pestes de insectos fue comparada a otras secuencias del banco de datos, se observó una gran semejanza para alfAFP, una defensinaantifúngica de la alfalfa (*Medicago sativa*)(Lay et al., 2003).

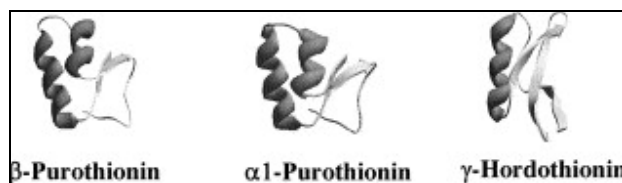
De otro lado, NaD1 mostró solamente baja identidad de secuencia para péptidos antifúngicos como Rs-AFP1, una defensina de planta de semillas de rábano (*Raphanussativus*), Ah-AMP1de castaño de indias (*Aesculushippocastanum*) y para drosomicina de *D. melanogaster*(Lay et al, 2003). Otros estudios desarrollados con Cp-tionina, una proteína de la semilla de frijol (*Vignaunguiculata*), han corroborado la acrecentada semejanza de estas  $\gamma$ -tioninas (57-81%) con otras clases de proteínas que incluyen proteínas ricas en sulfuro, inhibidores de  $\alpha$ -amilasas y proteasas y péptidos antifúngicos. En efecto, las Cptioninas solamente inhiben proteasas de serina tipo tripsina, mientras otras actividades no fueron observadas (Melo et al., 2002) concluyendo que, en este momento es imposible determinar la función usando sólo la estructura primaria.

Analizando las estructuras de diferentes tioninas, es posible observar que las  $\alpha$  y  $\beta$  tioninas son más similares entre ellas que con las  $\gamma$ -tioninas (Castagnaro et al., 1992, 1994). Estas últimas presentan una secuencia de aminoácidos más

pequeña, aunque las Cp-tioninas y la crambina presentan una secuencia más larga. Los residuos de cisteína están casi totalmente conservados entre tioninas, siendo importantes para la estabilidad de la estructura como se anotó anteriormente. A pesar de que estos residuos no están totalmente conservados en  $\gamma$ -tioninas, la construcción de imágenes de  $\gamma$ -tioninas de *M. sativa* y *M. truncatula* mostraron que un residuo cargado positivamente en C-terminal es crítico para la actividad antimicrobial. Los residuos de glicina, están altamente conservados para grupos de  $\gamma$ -tioninas siendo importantes en la flexibilidad de los péptidos y en el desarrollo de la función (Spelbrink et al., 2004).

Por otro lado, mientras la estructura primaria no muestra una correspondencia entre la función y la alta homología en la secuencia, la estructura terciaria de la mayoría de las  $\gamma$ -tioninas está altamente conservada en todos los grupos funcionales (Nitti et al., 1995). La estructura terciaria de las  $\gamma$ -tioninas está compuesta básicamente por una alfa hélice y tres hojas beta antiparalelas, formando un típico sándwich anfipático de dos capas  $\alpha\beta$  (Bruix et al., 1993, y 1995) Figura 2. NaD1 y alfALP muestran esta composición típica, donde las cadenas presentan una topología  $\beta 1$  una  $\beta 3$  una  $\beta 2$ , indicando a primera vista un mecanismo de acción similar entre las dos. Sin embargo, esto no es particularmente cierto para la familia de las  $\gamma$ -tioninas.

La característica central de la estructura 3D de la NaD1 es un motivo común que consiste de una cisteína estabilizada  $\alpha\beta$  (CS $\alpha\beta$ ). De otro lado, la  $\alpha$ -hélice muestra una estructura inusual debido a la presencia de dos residuos (Pro 18 y Pro 19) en conformación trans en la estructura N-terminal (Nitti et al., 1995). La estructura 3D de las  $\gamma$ -tioninas fue comparada exitosamente con otras proteínas, tales como neurotoxinas de escorpión, endotelinas humanas, safarotoxinas de serpiente, opaminas y defensinas animales. La comparación anterior también es válida para Sl $\alpha 1$ , una  $\gamma$ -tionina de las semillas de sorgo bicolor, la cual mostró una topología similar a la toxina de escorpión.



**Figura 2:** Comparación de estructuras 3D de Tioninas de plantas (Guex&Peitish, 1997)

A pesar de que esta clase de proteínas tienen una baja homología de secuencia, parece que las  $\gamma$ -tioninas, las neurotoxinas de escorpión y las defensinas de insectos provienen de un único ancestro (Figura 2).

Algunas descripciones de estructuras de  $\gamma$ -tioninas muestran un proteína plegada similar a una letra mayúscula L, con dos  $\alpha$ -hélices y un tramo corto de una  $\beta$ -hoja antiparalela, conectada por algunos codos de diferentes longitudes (Oita et al., 2000). Sin embargo, se observó una  $\gamma$ -hordotioninas como una proteína plegada similar a una  $\gamma$ -purotionina, la cual está compuesta por una  $\alpha$ -hélice corriendo en sentido contrario a una cadena corta  $\beta$ -hoja antiparalela (Castagnaro et al., 1994).

Se observaron algunas diferencias en crambina, una tionina hidrofóbica de *C. abyssinica*, la cual mostró dos formas isoméricas en una relación 3:2. El isómero principal tiene prolina y leucina en posición 22 y 25 respectivamente (forma PL); el isómero menor tiene serina e Isoleucina en la mismas posiciones (forma SI).

En la estructura cristalina que forma la mezcla, la densidad electrónica de la cadena lateral para residuos heterogéneos esta superpuesta. Las diferencias entre ambas secuencias de aminoácidos de la crambina están situadas sobre los residuos de serina o prolina en posición 22, mientras en la posición 25 se puede encontrar un residuo de leucina o isoleucina. Entonces, la crambina parece tener dos microtipos heterogéneos basados en la estructura primaria, sin diferencias en su estructura terciaria (Yamano et al., 1997). Además la Pro 25 de la crambina puede promover una pequeña angulación en la estructura de la proteína creando pequeñas diferencias conformacionales entre ambas formas. Si estas comparaciones se extendieran un poco más, se podría observar una muy baja homología en la secuencia y una distribución poco homogénea de los

aminoácidos básicos a lo largo de la estructura primaria en la crambina,  $\gamma$ -tioninas,  $\alpha$  y  $\beta$ -tioninas, reflejándose directamente en la estructuras 3D (Fant et al., 1998).

Mientras la crambina y la  $\alpha$ 1-purotionina tienen la forma de la letra T, donde el eje vertical está compuesto por dos  $\alpha$ -hélices antiparalelas y cadenas extendidas en el brazo horizontal, las  $\gamma$ 1-purotioninas y  $\gamma$ 1-hordotioninas muestran un letra L plegada, con una  $\alpha$ -hélice en un arreglo paralelo a tres cadenas  $\beta$ -hojas (Bruix et al., 1993). A pesar de las diferencias y semejanzas de las estructuras de las  $\gamma$ -tioninas, en este momento es imposible relacionar estructura y función.

Se ha demostrado que la estructura 3D de las  $\gamma$ -tioninas puede no estar relacionada con su mecanismo de acción, pero puede estar correlacionada con la distribución de los residuos de aminoácidos en la superficie (Almeida et al., 2002).

El mecanismo de acción de Psd1, un péptido aislado de *Pisum sativum*, fue sugerido por comparación con otras  $\gamma$ -tioninas, de acuerdo a su estructura terciaria y las cargas de los aminoácidos (Almeida et al., 2002). La semejanza de la estructura 3D entre Psd1 y otros péptidos no revelaron función similar, pero una comparación entre la distribución de carga en la superficie de algunas  $\gamma$ -tioninas llevó a algunas semejanzas funcionales como antifúngicos, bactericidas y bloqueadores de canales (Almeida et al., 2000 y 2002).

En la última década, se ha encontrado que algunas  $\gamma$ -tioninas son capaces de inhibir enzimas digestivas, agrupando a las  $\gamma$ -tioninas en un selecto grupo de proteínas sintetizadas en respuesta a pestes de insectos (Franco et al., 2002; Melo et al. 2002). Algunas  $\gamma$ -tioninas descritas hasta ahora son capaces de inhibir  $\alpha$ -amilasas de insectos (Bloch y Richardson, 1991) y otras pueden inhibir serinoproteasas. En este campo,  $\gamma$ -hordotioninas aisladas de sorgo (*S. bicolor*) fueron el primer ejemplo de una  $\gamma$ -tionina capaz de inhibir  $\alpha$ -amilasas de insectos pero incapaz de inhibir  $\alpha$ -amilasas de mamíferos.

Se ha especulado sobre el mecanismo de acción de esta actividad inhibitoria. Estas  $\gamma$ -tioninas forman un complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -Sl $\alpha$ 1, sugiriendo que el calcio es quelatado y la  $\alpha$ -amilasa del patógeno desestabilizada, llevando a la inhibición de la enzima. Por tanto, la actividad de inhibición de las  $\gamma$ -hordotioninas ocurre solamente contra  $\alpha$ -amilasas dependientes de calcio (Castro y Vernon, 2002). Es importante recordar que las  $\alpha$ -amilasas no son la única clase de enzimas inactivadas por  $\gamma$ -tioninas. Un péptido aislado de semillas de *Cassia fistula*, con cuatro puentes disulfuro y semejanza estructural al grupo de  $\gamma$ -tioninas, mostró actividad inhibitoria contra serina proteasas. Este péptido fue el primer ejemplo de una  $\gamma$ -tionina con actividad contra enzimas como tripsina (Wijaya et al., 2000). Además una  $\gamma$ -tionina de la semilla del frijol (*Vigna unguiculata*) también presentó actividad inhibitoria contra algunas tripsinas. El mecanismo inhibitorio presentado por modelación molecular nos sugiere que el sitio catalítico podría ser bloqueado por la  $\gamma$ -tionina del frijol. El residuo inhibidor Lys11 ocupa una cavidad específica, resultando en un mecanismo de forma canónica con una estequiometría 1:1 de interacción Cp-tionina- BPT (Tripsina pancreática de bovino) (Melo et al., 2002). La asociación entre Cp-tionina y tripsina debe ser mediada por el agua, como en el caso del inhibidor de tripsina pancreática de bovino (BPTI) (Freitas et al., 1999). Sin embargo, las Cp-tioninas no fueron capaces de inhibir quimotripsina, haciendo a las Cp-tioninas diferentes de los inhibidores de Bowman-Birk, los cuales pueden inhibir tanto tripsina como quimotripsina (Melo et al., 2002).

Además, estudios recientes mostraron que NaD1 exhibió actividad antifúngica contra patógenos de plantas in vitro, así como también hacia insectos por inhibición de enzimas como tripsina y quimotripsina (Lay et al., 2003). Como muchas otras  $\gamma$ -tioninas, el motivo CS $\alpha$  $\beta$  de la estructura puede ser la llave para la actividad funcional de NaD1.

Las  $\gamma$ -tioninas son conocidas por su efectividad contra bacterias, mostrando esta actividad biológica con extrema especificidad y no toxicidad hacia otros

organismos (Villa-Perelló et al., 2003). Además, estas proteínas parecen ser específicas para un cierto grupo de bacterias.

Las  $\gamma$ -tioninas son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas pero rara vez inhibe el crecimiento de Gram positivas o viceversa (Diaz et al., 1992). Un péptido aislado de espinaca (*S. oleracea*) presentó actividad letal contra bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas considerándose una excepción a la mayoría de  $\gamma$ -tioninas. Además, este péptido mostró una actividad mejorada contra hongos fitopatogénicos ( Segura et al. 1998, García-Olmedo, 1998), deduciéndose por lo tanto, que las  $\gamma$ -tioninas de la espinaca poseen un amplio espectro de acción. Resultados similares se obtuvieron para dos péptidos aislados de la semilla de trigo (*Fagopyrum esculentum*), los cuales presentaron actividad antimicrobial contra bacterias Gram positivas y negativas.

Dos  $\gamma$ -tioninas antimicrobiales aisladas de bulbos de tulipán (*Tulipa gesneriana* L.) mostraron actividad contra bacterias tales como *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Clavibacter michiganensis* *Curtobacterium flaccumfaciens* (Fujimura et al., 2004). Recientemente dos péptidos de raíces de bambú japonés, mostraron actividad contra bacterias patogénicas de plantas (Fujimora&Tadera, 2005).

Como se describió antes, las  $\gamma$ -tioninas exhiben una estructura muy conservada. Esta característica anfipática está estrechamente relacionada con el rompimiento de la membrana microbial y el liposoma fosfolipídico. El mecanismo de defensa molecular antibacterial permanece aún sin ser aclarado, pero sin embargo, algunos mecanismos se han sugerido. Como es conocido la superficie lipofosfobacterial (LPS) es una barrera permeable que confiere resistencia a agentes antimicrobiales y modificaciones ambientales, incrementando la sensibilidad hacia compuestos catiónicos e hidrófobos (Nikaido, 1989).

Una hipótesis para el papel de las  $\gamma$ -tioninas en la actividad antibacterial se infiere sobre la forma en que las proteínas cargadas positivamente interactúan con los fosfolípidos de la membrana cargados negativamente, seguida por la modificación de permeabilidad de la membrana. Sin embargo la implicación de un receptor específico no ha sido descartada, ya que las  $\gamma$ -tioninas se enlazan a fosfolípidos específicos. La interacción de las  $\gamma$ -tioninas con las membranas parece ser la primera etapa en la exposición de toxicidad, seguido de un desbalance catiónico (Caaveiro et al., 1997). De otro lado, en plantas, las tioninas activan las redes de señalamiento que regulan las respuestas innatas, incluida la reacción de hipersensibilidad en plantas (Li et al., 2002).

Otro factor importante está relacionado con la especificidad. Aunque se han encontrado algunas características comunes para algunas tioninas antibacteriales, es importante saber que a pesar de los esfuerzos realizados en este sentido, el mecanismo real de especificidad de  $\gamma$ -tioninas aún no es claro.

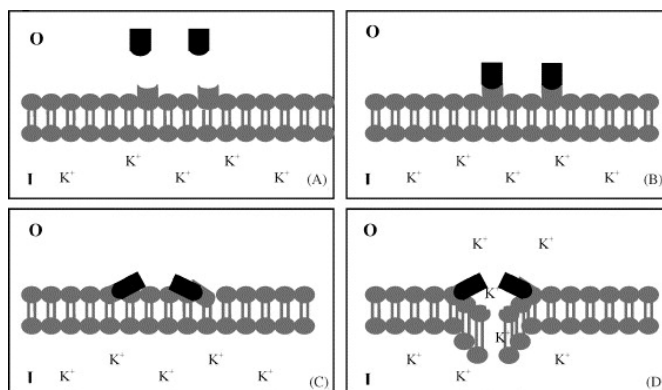
Las  $\gamma$ -tioninas antifúngicas son más numerosas que las  $\gamma$ -tioninas antibacteriales. Sin embargo, algunas  $\gamma$ -tioninas antifúngicas también presentan toxicidad a otros organismos. Un ejemplo de esto es el péptido aislado de bulbos de tulipán y trigo, estos péptidos muestran actividad contra bacterias y hongos, siendo más alta la actividad antibacterial (Fujimora et al., 2004).

El mecanismo de acción antifúngico parece ser ocasionado por una interacción a un receptor específico como un canal iónico o a un esfingolípido (Bloch et al., 1998, Thevissen et al., 1996 y 2005). Una observación interesante es que la interacción electrostática tionina-membrana celular podría ser reducida por cationes divalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$  (Lay et al., 2003). Las  $\gamma$ -hordotioninas de la cebada son capaces de interactuar eléctricamente con la bicapa lipídica del hongo, enlazándose a la superficie de la membrana (pero no insertándose dentro de ella) conduciendo a la permeabilización y rompimiento de la organización de la membrana. Por lo tanto, el mecanismo no puede

ocurrir a través de una interacción directa proteína-proteína, sino a través de un lípido receptor de membrana (Thevissen et al., 1996).

Una posible explicación de cómo se causa el daño de la membrana después de la interacción con la superficie de la célula del hongo, podría explicarse con un trabajo reciente, donde las tioninas se pudieron enlazar a los glicolípidos de la superficie de la membrana del hongo. En este caso los glicolípidos actuaron como receptores de membrana a pesar de dos o más proteínas que podrían estar involucradas, con la consecuente formación de poros permitiendo el flujo de iones hacia adentro y hacia afuera de la membrana. En este trabajo se observó que este mecanismo bloquea la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Spelbrink et al., 2004).

Cómo la membrana celular del hongo mantiene los poros abiertos, es otra cuestión que aún no se ha resuelto, sin embargo, se piensa que esto se puede dar por la repulsión de las cargas positivas de las tioninas o por su interacción hidrofóbica con los fosfolípidos de la bicapa. Por lo tanto, si las cargas positivas de las tioninas mantienen los poros abiertos, los iones  $\text{K}^+$  y/o  $\text{Ca}^{2+}$  serán repelidos hacia fuera de la célula, este mecanismo se puede observar en la Figura 3.



**Figura 3:** Probable mecanismo de acción de las tioninas con actividad antifúngica, usando glucosacáridos como receptores para la inserción del hongo en la membrana celular.



La atracción de las tioninas por los receptores de la membrana del hongo, puede estar dada por las interacciones iónicas entre los residuos de las cadenas laterales de las tioninas y los glicolípidos cargados de la superficie celular (Almeida et al., 2002).

En estudios realizados con Sl $\alpha$ 1, una proteína del sorgo bicolor, se encontró que presenta una actividad dual hacia hongos y bacterias, mostrando una estructura típica de sándwich  $\alpha + \beta$  con una hélice sostenida por dos puentes disulfuro localizados contra la hoja. El mecanismo de acción aún no está definido, pero parece que la conformación de los loops libres de las  $\gamma$ -tioninas son factores importantes para la actividad antimicrobiana (Selitrennikoff, 2001).

### **3.6 Patógeno: *Phytophthora infestans***

Es un parásito facultativo que vive sobre diversas solanáceas, especialmente en papa, y es de gran importancia económica, ya que cuando las condiciones son favorables para su desarrollo produce la enfermedad llamada mildéu, podredumbre, gangrena o tizón tardío de la papa y el tomate, siendo este último el nombre más generalizado; existen cerca de cuarenta variedades de este patógeno, de las cuales la mayoría se encuentran en el suelo (Abad G. and Abad J., 1995).

#### **3.6.1 Clasificación taxonómica**

Reino: *Chromista*, Clase: *Oomycetes*, Orden: *Peronosporales*, Familia: *Pythiaceae*, Género: *Phytophthora*, Especie: *infestans*.

*Phytophthora infestans*, pertenece a la clase Oomycetes; clasificados inicialmente, como hongos inferiores, pero según análisis moleculares recientes (Villegas J. S. 2003), se

mostró claramente que están agrupados dentro del linaje Stramenophile el cual fue creado para incluirlos junto a las algas café (Gigantes marinas), las algas verde-amarillo y las café dorado. Algunos investigadores ubican a todo aquello que no sea planta, animal, hongo o bacteria en un reino diferente llamado Protista y es probable que en los próximos años se ramifique en otros nuevos reinos (Villegas J. S. 2003).

Aunque los Oomycete son un grupo distinto de patógenos de plantas considerados hasta hace poco como hongos y reclasificados en un taxón distinto, más relacionado a las algas que a los hongos (Abad G. and Abad J. 1995, Villegas J. S. 2003, Erwin, D.C. et al., 1996), epidemiológicamente sin embargo, tienen mucho en común con los patógenos fúngicos, en cuanto al espectro de enfermedades producidas en poblaciones de plantas.

### 3.6.2 Descripción

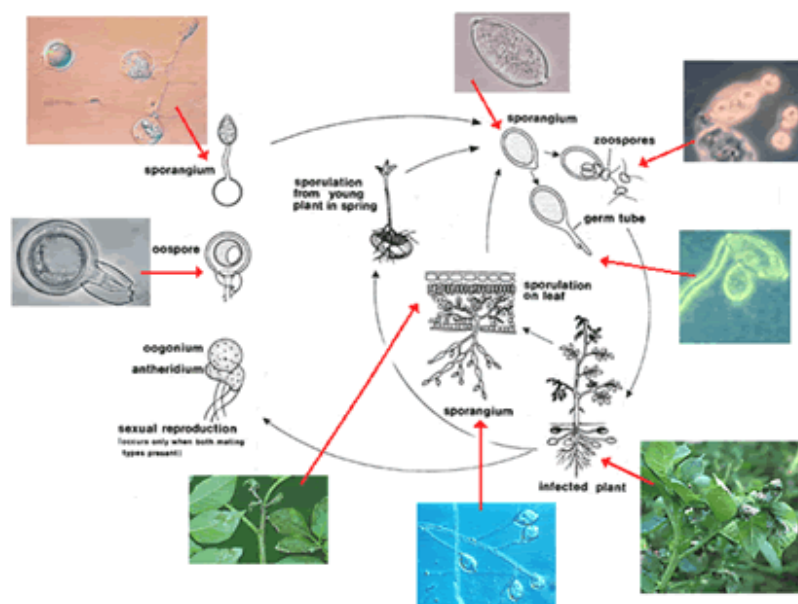
*Phytophthora infestans* presenta un micelio cenocítico, que se ramifica originando esporangióforos o conidióforos, los cuales contienen los zoosporangios o conidios respectivamente. Los zoosporangios se forman en las puntas de las bifurcaciones y tienen forma de un limón. (Carlue M.J. 1983, McLeod A, et al 2001).

En los sitios donde se forman los esporangios, los esporangióforos forman hinchamientos característicos del hongo, y conforme prosigue el crecimiento de las puntas de las ramas, los esporangios son desplazados hacia los lados y más tarde se desprenden.

A temperaturas cercanas a los 15° C, se forman los zoosporangios, que contienen de 2 a 8 zoosporas biflageladas, que son diseminadas cuando se rompe la pared esporangial a nivel de su papila. Cuando la temperatura se eleva entre el rango de 22 a 32° C, surgen los conidios. (McLeod A, et al.,2001), Smith, J. A. et al. 1974).

### 3.6.3 Ciclo biológico

La infección inicial en los cultivos se produce generalmente al inicio de la época lluviosa, al colocarse en la tierra fragmentos de papa con objeto de propagarla. Si alguno de estos fragmentos está infectado con micelio del hongo, al germinar las yemas, el micelio se desarrolla en los brotes y en poco tiempo forma esporangios, sí las condiciones de humedad y temperatura son favorables. Estos esporangios son llevados por el agua o el viento a la superficie de plantas sanas, en donde pueden germinar directamente o formar zoosporas. Así que la primera infección de un cultivo proviene de los tubérculos parasitados, en los que el micelio ha pasado el invierno o el tiempo de almacenamiento de los tubérculos. Los primeros brotes infectados son los que difunden la enfermedad (Domínguez F. 1965., Cortez Pedro E. 2002)



**Figura 4** .Ciclo de vida de *Phytophthora infestans*.

Fuente: <http://www.cals.ncsu.edu/plantpath/people/faculty/ristaino/projects/projects.html>.

Si las zoosporas caen sobre las hojas, ya sea en el haz o en el envés, nadan un poco en el agua de lluvia que exista sobre ellas, se enquistan y luego cada una produce un tubo

de germinación que forma un apresorio y de este una hifa infectiva que atraviesa las células epidérmicas, perforando la cutícula, o bien el tubo penetra directamente o a través de los orificios de los estomas. Una vez que llega a los tejidos internos de la hoja, este tubo desarrolla un micelio intercelular muy ramificado, y muchas de sus hifas forman haustorios dentro de las células. En pocos días (0 o 7), el micelio vegetativo alcanza su madurez y, entonces, principalmente por el envés de las hojas, emergen a través de los estomas numerosas hifas que constituyen esporangióforos ramificados, cuyas ramas están formadas de células colocadas unas a continuación de otras, dando el aspecto de nudos y entrenudos. En la terminación de las ramas, o en las partes laterales de las mismas, y a partir de las células que las constituyen, se forman esporangios con forma de limón. Estos esporangios se desprenden, y por el agua o por el viento son llevados a los tallos o tubérculos de la misma planta o de otras. La germinación de los esporangios se puede efectuar de dos maneras, directa o indirecta. En el primer caso, a partir del esporangio se origina un tubo que penetra por la epidermis y forma un micelio en los tejidos internos. En el segundo caso, que es el más común, el esporangio forma numerosas zoosporas biflageladas que al madurar se escapan por rompimiento de la pared del esporangio en su parte terminal. Una vez libres, las zoosporas se comportan como ya se indicó y dan lugar a nuevas infecciones. (Cortez Pedro E. 2002, Judelson H.1997, Zapata J. 1994).

La reproducción sexual en este oomycete parece ser poco frecuente. Se han encontrado oósporos en tubérculos infectados, pero estos elementos no desempeñan un papel importante en la propagación de la enfermedad, ni en la supervivencia de la especie.

Durante el desarrollo de los órganos sexuales, el oogonio perfora el anteridio, crece a través de este y adopta un aspecto globoso arriba del mismo. El anteridio es plurinucleado y, ya maduro, forma una especie de embudo con aspecto de collar, alrededor de la base del oogonio; es decir, corresponde al tipo llamado anfígeno. Aunque el oogonio tiene varios núcleos, sólo uno es fecundado y los demás se desintegran, de manera que en cada oogonio se forma una sola asopora. Esta es aplerótita, es decir, no

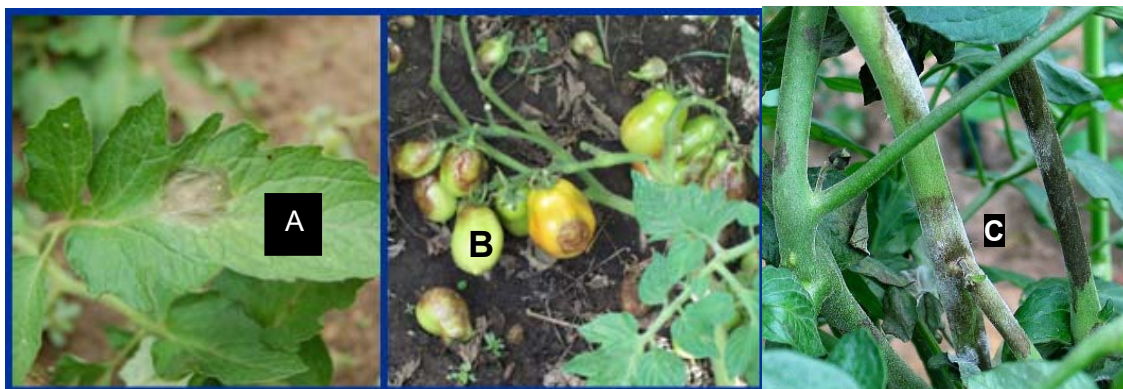
llena la cavidad del oogonio como en otros peronosporales, cuyas oosporas son llamadas pleróticas porque sí llenan las cavidades de sus correspondientes oogonios. Los términos aplerótico y plerótico también se pueden aplicar a los oogonios o a los esporangios, según estén llenos, en forma parcial o total, de elementos reproductores: oosporas o zoosporas, respectivamente. En general, la primera hifa que resulta de la germinación de la oospora forma, en su extremidad, un esporangio que puede germinar directamente o, con más frecuencia, produce zoosporas biflageladas que germinan sobre un hospedante adecuado después de enquistarse e inician una nueva infección en el mismo. (Cortez Pedro E. 2002, Judelson H. 1997, Zapata J. 1994).

### 3.6.4 Enfermedad: Tizón Tardío

Esta es una de las enfermedades más comunes y devastadoras, reportada en la mayor parte de las regiones productoras de tomate y papa (Sung, Z.R. 1976) y puede llegar a destruir la totalidad de un cultivo entre 10 y 15 días, si los campos no se encuentran protegidos con fungicidas y las condiciones climáticas son las apropiadas para el desarrollo del patógeno.

#### 3.6.4.1 Síntomas de la enfermedad

El patógeno es capaz de atacar cualquier parte aérea de la planta, y aunque se observan cambios en tallos, frutos y hojas, los primeros síntomas aparecen en estas últimas.



**Figura 5.** Síntomas del Tizón Tardío ocasionados por *Phytophthora infestans*. A.Hojas B. Frutos y, C. Tallo.

**Hojas:** Manchas amarillas en los bordes y en el ápice de las hojas, que luego se hacen pardas y terminan por ennegrecerse, y al mismo tiempo aumentan de tamaño hasta alcanzar el centro de la hoja. En el envés de las hojas, se forma una zona blanca, algodonosa constituida por hifas del hongo; poco después los folíolos se hacen flácidos y mueren (Domínguez F.1965, Disagro1996.) Figura 5A

**Tallos:** Manchas parduzcas, los tallos se debilitan y parten con facilidad. Figura 5C.

**Frutos:** Es común observar la presencia de manchas de aspecto húmedo en cualquier estado de madurez, éstas son hundidas e irregulares, que al aumentar de tamaño, pueden llegar a cubrir por completo el fruto y ocasionar pudrición. Figura 5B.

### 3.6.4.2 Ciclo de la enfermedad

El hongo puede sobrevivir como oósporos en la tierra y desechos en el campo, o como micelio en los frutos de tomate. La temperatura de 18° C y humedad relativa entre 90 y 100% durante la noche, son condiciones óptimas para el inicio de la infección; después cuando la temperatura oscila entre los 17 y 21° C, la enfermedad se desarrolla rápidamente. Las zoosporas y conidios originan la infección secundaria y son transportados por la lluvia, viento o insectos (Disagro. 1996)

## **4. Materiales y Métodos**

### **4.1. Materiales**

#### **4.1.1. Propagación en invernadero del material vegetal (Tomate, *Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme*)**

Se utilizaron semillas de tomate variedad resistente "*Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme*", perteneciente a la colección del Germoplasma Nacional suministrada por CORPOICA, con número de acceso 1587 que presenta resistencia en campo a *P. infestans* según información de la misma entidad.

Se germinaron 120 semillas de tomate variedad resistente en cámara húmeda en cajas de Petri, durante 12 días, luego se trasladaron en vasos desechables medianos de 200 mL que contenían 250 gramos de tierra de jardín. Se dejaron crecer en condiciones de invernadero durante 4 semanas, después de las cuales se trasladaron a recipientes plásticos que contenían 1 K de suelo debidamente tamizado y con un alto contenido de materia orgánica (%). Se regaron a diario y se fertilizaron 4 semanas después de trasladadas con una dosis de 1g/planta de fertilizante comercial NPK 15:15:15.

#### **4.1.2 Material biológico fitopatógeno**

Para inducir resistencia sistémica en las plantas de tomate, se inocularon con *P. infestans*; libre de cualquier microorganismo en la etapa adecuada de reproductividad para obtener una inoculación exitosa.

El aislamiento A60 de *Phytophthora infestans* empleado para este trabajo fue suministrado por el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la

Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*

---

Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. La virulencia de este aislamiento se potencializó colocando un trozo de micelio en la parte inferior de discos de papa, previamente lavadas con hipoclorito de sodio al 1 %, enjuagadas con agua destilada y flameadas; el patógeno se dejó crecer por 3 días hasta la aparición del micelio en la superficie del disco. Una vez potencializada la virulencia del oomycete, éste se repicó en medio arveja-sacarosa-agar en una proporción (60:20:20) (Anexo A) y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad, durante 25 días para mantener estructuras jóvenes.

Para obtener la suspensión de esporangios, se tomaron cajas de Petri con cultivo de *P infestans* de 11 a 15 días en medio sólido y con ayuda de una espátula se desprendieron del micelio los esporangios y se resuspendieron con 10 mL de agua desionizada estéril a temperatura ambiente. Se determinó la concentración de esporangios mediante cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a  $1 \times 10^4$  células/mL. Esta operación se llevó a cabo en cabina de flujo laminar en asepsia total.

#### **4.1.3 Inducción de resistencia sistémica en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme*) con *P infestans*.**

Después de 3 meses de trasplantadas las plantas de tomate solo el 75% sobrevivió. De estas se tomó el 50% de cada especie para inocular y el otro 50% se dejó como blanco. Se adecuaron dos mesas del invernadero como cámaras, cubriéndolas con polietileno transparente y sobre éste polietileno negro para controlar luminosidad, humedad y temperatura.

En cada mesa se colocaron aproximadamente 45 plantas de cada variedad y se inocularon con la suspensión de esporangios de *P infestans* de  $1 \times 10^4$  células /mL. Una hora antes de la inoculación se rociaron con agua corriente para favorecer la apertura de



estomas. El inóculo se aplicó inicialmente en forma de gota sobre cada hoja y finalmente en forma de espray con atomizador a lo largo de toda la planta.

Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero en la oscuridad durante tres (3) días para promover la propagación del patógeno. Se retiró el polipropileno oscuro después de estos días cambiando de esta manera las condiciones iniciales a las del ambiente del invernadero para inducir las plantas a una respuesta después del ataque del patógeno. Se rociaron todos los días dos veces mañana y tarde para mantener una humedad relativa alta.

Después de 15 días las plantas empezaron a presentar la sintomatología de infección, en algunas hojas, tal como manchas grandes color café y posterior marchitamiento. Una vez observados estos signos se procedió a desfoliar para obtener el líquido de lavado intracelular (Beyer, et al., 1984).

#### **4.1.4 Extracción de la proteína**

Se evaluó el líquido de lavado intercelular de las hojas en plantas sanas y plantas inoculadas. Se utilizó el sistema de infiltración de agua destilada a 4°C

##### **4.1.4.1 Obtención del líquido de lavado intercelular (LLI)( Martin et al., 2003, Meyers, et al., 2005)**

Se siguió el procedimiento realizado por Riaño y col.,(2004). Se recolectaron los folíolos, se lavaron tres veces durante 30 minutos uno a uno utilizando agua destilada a temperatura ambiente. Se secó el material con papel absorbente por el haz y el envés, luego se pesó. Este material se sumergió en agua destilada a temperatura ambiente por dos horas para remover cualquier contaminante y promover apertura de estomas

Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*

---

Al cabo de las 2 horas se retiran los folíolos del agua, se secan y se disponen verticalmente en fajos colocando el envés hacia afuera, para introducirlos en una canastilla plástica con tapa. Esta canastilla se introduce en un desecador para vacío, lleno con 2/3 de agua a 4°C, de tal manera que quede completamente cubierta. Se tapa el desecador, se aplica vacío utilizando una bomba tipo General Electric entre 20 y 30 minutos. Para promover la salida de aire de los espacios intercelulares se agita suavemente el desecador por 5 minutos varias veces. Transcurrido este tiempo se suspende el vacío y se deja reposar por cinco minutos. Se equilibra la presión abriendo la llave del desecador lentamente y permitiendo la entrada de aire. En este momento se observa cambio en la coloración de las hojas indicándonos la entrada del líquido extractor en los espacios ocupados por aire. Se deja en reposo a presión atmosférica por 10 minutos antes de retirar la canastilla.

Se retiraron los folíolos de la canastilla se colocaron sobre papel por 20 segundos a Temperatura ambiente, luego se ubicaron sobre una tira de polietileno de aprox. 8 cm de ancho y 1 metro de largo de manera que el ápice quedara diagonal a la cinta, se enrollaron alrededor de un tubo de PVC de ½ pulgada y 10 cm de largo. Este tubo se introdujo en un tubo para centrifuga. Se centrifugó a 5000xg durante 30 minutos a 4°C. Se recolectó el líquido de lavado intracelular del fondo del tubo de centrifuga se midió el volumen y proteína total.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1. Cuantificación de proteína**

Para la determinación de proteína se utilizó el método de Bradford modificado por Zor y Selinger(1996). Éste se basa en la formación de un complejo entre las proteínas y el colorante Azul Brillante G, lo que provoca un cambio en la absorbancia del colorante, entre las longitudes de onda 465 a 595. Se prepararon diluciones de un estándar de

proteínas (albúmina sérica de bovino) con PBS, a concentraciones de 2 a 20 µg /mL. Se realizaron curvas de calibración por triplicado. Este análisis se realizó en un iMark Microplate Absorbance Reader con Microplate Manager Software, marca BIORAD.

## 4.3 Obtención del péptido

### Ensayos Preliminares:

Se ensayaron dos técnicas de separación: una con sulfato de amonio y la otra con membranas Amicon 10kDa y posterior liofilización, cada uno con 1,5 y 4 mL respectivamente de la muestra correspondiente al LLI de hojas sanas e inoculadas de cada especie una vez terminado el ensayo se determinó contenido de proteína.

### 4.3.1. Microprecipitación con Sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Mittler Ron. 2002-Levine, et al., 1996).

Se molió vigorosamente el sulfato sólido y se tamizó a través de malla No 200, hasta obtener un tamaño de partícula fino y homogéneo de tal manera que al caer sobre el líquido, se disolviera completamente.

En un eppendorf de 2 mL se colocó un mL de muestra y se adicionó lentamente sulfato de amonio en una cantidad tal que se alcanzara el 30% de saturación a 4°C con agitación constante. Se centrifugó a 13000xg durante 15 min. a 4°C. Se determinó proteína al precipitado y al sobrenadante. Al sobrenadante se le siguió adicionando sulfato de amonio hasta alcanzar aproximadamente el 70% de saturación de acuerdo a lo establecido por Riaño y col (2004), siguiendo el procedimiento antes indicado para cada adición.

### **4.3.2 Separación con membranas AmiconUltra-4, 10 KDa**

Para aislar el péptido, el LLI obtenido se pasó a través de una membrana Amicon (dispositivo de filtración por centrifugación, Amicon Ultra-4, Millipore) cuyo tamaño de exclusión es de 10 kDa. Se agregó 4 mL del LLI obtenida de las hojas de las plantas de tomate a cada Amicon, centrifugándose a 6000 x g por 30 min a 4°C. De este centrifugado se obtienen dos fracciones: la fracción retenida donde se encuentran las proteínas de peso molecular > 10 kDa y la fracción no retenida que llamaremos filtrado donde están las proteínas < 10 kDa. Cada una de estas fracciones fue liofilizada y congelada a -20°C hasta hacer electroforesis y determinación de actividad.

### **4.3.3 Liofilización**

La fracción filtrada o no retenida por la filtración con unidades Amicon, luego de ser dializada se distribuyó en eppendorf de 2,0 mL para liofilización, en volúmenes de 1,5 mL, se liofilizaron durante 48 horas a -80°C; el liofilizado contenido en cada eppendorf se resuspendió en 2 ml de amortiguador fosfato pH 7, se centrifugó a 13000g durante 20 minutos con el fin de retirar el material insoluble; posteriormente se le determinó el volumen, concentración de proteína, electroforesis y actividad, finalmente se distribuyó en tubos eppendorf en alícuotas de 2 ml y se almacenó a -20°C.

Este proceso también se realizó con las muestras que presentaban actividad antifúngica obtenidas después de la cromatografía de intercambio iónico.

### **4.3.4 Diálisis**

Cuando al LLI se sometió a precipitación con sulfato de amonio, el precipitado o extracto crudo de proteínas se sometió a diálisis para retirar las sales presentes en el extracto. Para este procedimiento, los tubos de membrana de 1 kDa se trataron previamente con

una solución de EDTA 0,5M y se sometieron a ebullición durante 30 minutos; repitiendo el procedimiento por seis veces. Después de esto, las membranas se lavaron con agua destilada, se colocaron como tapa de un eppendorf de 2 mL teniendo cuidado que la parte externa de la membrana quedara como parte externa en la boca del eppendorf. Se llenó el tubo con el precipitado disuelto en amortiguador fosfato de sodio 50 mM pH 7.0, se tapó y colocó en un Erlenmeyerde 5 L con solución amortiguador fosfato y finalmente se sometieron a agitación continua a 4°C durante 48 cambiando la solución tampón cada 6 horas tres veces. (Van Jagow G., Schagger H.1994).Al dializado se le determinó el volumen de muestra, concentración de proteína y actividad.

## **4.4 Purificación del péptido**

Una vez separadas por las unidades Amicon se procedió a la purificación de estas mediante métodos cromatográficos. Para esto se utilizó cromatografía de intercambio iónico

### **4.4.1. Cromatografía de Intercambio Aniónico**

Para continuar con el proceso de purificación del péptido, se preparó una columna de intercambio aniónico Pharmacia 10/20 de un centímetro de diámetro con un volumen de lecho de 12 mL de DEAE Fractogel TSK 650M<sup>®</sup>, compuesto por un co-polímero sintético de Metacrilato. Se activó con 30 ml de NaCl 2M, luego se equilibró con buffer de equilibrio (Fosfato de sodio 50mM pH 7.0) y se ajustaron las condiciones de separación con un gradiente lineal NaCl (0-1M en buffer de equilibrio)(Morris C, et al., 1976), se ajustó la velocidad de flujo a 18ml/h, midiendo conductancia en cada fracción de 2,0 mL y presencia de proteína a 280 nm.

Para la purificación de la enzima, se adicionó 1 mL de muestra a la columna, conteniendo 28.9 mg/ml de proteína con una conductancia igual a la del buffer de equilibrio, luego se adicionó buffer de equilibrio hasta eluir todas las proteínas no retenidas. Finalmente las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente lineal de 0-1M de NaCl en amortiguador fosfato de sodio 50mM pH 7.0 (Morris C, et al., 1976), a velocidad de flujo constante y colectando fracciones de 2,0 mL. A cada fracción se le midió la absorbancia a 280nm, y

se registró la conductancia. Como el área bajo cada pico era muy amplia se mezclaron 20 fracciones para determinar la actividad y proteína

#### **4.4.2. Cromatografía de Intercambio Catiónico**

Se empleó una columna Biorad 20/40 con un volumen de lecho de 25 mL de CarboximetilSefarosa (CM-Sefarosa), de acuerdo a la separación de macromoléculas según la carga y partiendo del hecho que la(s) defensina(s) y/o tionina(s) tienen naturaleza catiónica. La columna se activó con NaCl 2M, se equilibró con amortiguador fosfato de sodio 50mM pH 6, hasta obtener la misma lectura de conductividad a la entrada y salida de la columna. Se ajustó la conductividad a la del amortiguador de elución antes de aplicar la muestra. Se utilizó un gradiente lineal NaCl 0-1 M con un flujo de 18mL/h

A cada fracción se le determinó la absorbancia a 280nm y se midió la conductancia. Las fracciones correspondientes a cada pico, se mezclaron y se les determinó volumen, concentración de proteína, electroforesis y actividad antifúngica.

### **4.5 Caracterización parcial**

Las defensinas y/o gama tioninas se caracterizan por ser péptidos de bajo peso molecular, para hacer un seguimiento de la purificación de estos, se empleó un sistema de electroforesis en condiciones desnaturizantes adecuado para esta clase de péptidos (Schägger y von Jagow, 1987).

#### **4.5.1. Electroforesis SDS-TRICINA-PAGE**

Para el análisis electroforético de la defensina y/o tionina se emplearon geles discontinuos de poliacrilamida preparados en condiciones reductoras (Anexo D) (Schägger y von Jagow, 1987) utilizando un gel de concentración y dos geles en discontinuo, gel de

separación y espaciador, teniendo en cuenta que las proteínas aplicadas en la electroforesis tienen un peso molecular superior a 3kDa e inferior a 10kDa.

En el primer carril se colocaron 5µl de Marcador M 3546 SIGMA de bajo peso molecular y en los otros pozos se agregaron 5 µL de muestra (planta sana y planta infectada) de la misma concentración. Empleando como buffer de concentración tris glicina 0.5M pH 6.8, amortiguador de separación tris glicina 1.5M pH8.8; amortiguador de corrida tris glicina pH 8,3; para la polimerización de los geles se adicionó persulfato de amonio al 10% y TEMED concentrado, y como marcador de frente de corrida se aplicó azul de bromofenol 0.1% . El voltaje inicial aplicado fue de 100V durante media hora, luego 200V, permaneciendo constante hasta faltando 1 cm del frente de corrido para terminar el gel.

Después de corridas las electroforesis, los geles se colorearon con azul Coomassie (Verterberg, 1971),Wewtermeir, 1993), empleada para visualizar las bandas correspondientes a proteínas, la muestra se fijó con una solución de ácido tricloroacético 5% por 30 minutos, se coloreó con azul de Coomassie R disuelto en una mezcla etanol-ácido acético2:1 por dos horas y finalmente se decoloró con una mezcla de etanol: ácido acético: agua 5:5:2.

#### **4.5.2 Determinación de Peso Molecular**

Se empleó el sistema de electroforesis con SDS-PAGE en geles T10%C.3%. Las muestras se prepararon en condiciones reductoras empleando β-mercaptoetanol para reducir puentes disulfuro y estimar el peso molecular relativo. Para calcular el peso molecular de la proteína, primero se calculó el Rf o migración relativa de la proteína purificada y este valor se interpoló en una gráfica del logaritmo de los pesos moleculares de los patrones Vs la migración relativa (RF) de cada uno de ellos.

### 4.5.3 Determinación Punto Isoeléctrico (PI):

Se determinó utilizando el sistema ZOOM® IPGRunner™

- Preparación de la muestra: Se preparó el amortiguador de rehidratación de muestra de la siguiente manera: 25 mL de amortiguador 1X.

A 15 mL de agua desionizada se agregó 12 g de urea, 0,5 g de CHAPS, 125 µL de anfolitos (para pH 3-10) 63 µL para pH 9-10) 0,5 mL de azul de bromofenol al 0,1% y se completó a 25 mL. Se almacenó a -20°C. Antes de usar este buffer se adicionó ditiotreitól (DTT) a una concentración final de 20 mM

A 1 mL de este amortiguador se adicionaron 50 µg del péptido puro y también se tomaron 140 µL de esta solución para rehidratar cada tira ZOOM® durante una hora o 155 µL si se deja rehidratando toda la noche.

- Se aplicó el amortiguador de rehidratación que contiene la muestra dentro de los casetes y se insertaron las tiras. Se sellaron los pozos cargados.
- Se llevó a cabo el Isoelectroenfoque (IEF) en el ZOOM® IPGRunner™ Mini-Cell, montando la siguiente rampa de voltaje:

- Rampa de voltaje para las tiras de pH 3-10:

175 V por 15 min

175–2,000 V rampa por 45 min. (40V/min)

2,000 V por 30 min

- Para las tiras de pH 9-12

175 V por 15 minutos

175–2,000 V rampa por 45 min. (40V/min)

2,000 V por 60 min.

- Una vez terminada la corrida se equilibraron las tiras y se realizó la segunda dimensión mediante una electroforesis SDS-PAGE a 200 V por 40 min.



- Por último se procedió a teñir el gel de la segunda dimensión con azul de Coomassie.

#### **4.5.4 Determinación del Contenido de Aminoácidos por HPLC**

La técnica más común para la identificación y cuantificación de aminoácidos es la de HPLC desarrollada en fase reversa. Los aminoácidos a analizar deben ser previamente derivatizados para lo cual se encuentran diferentes reactivos cada uno con características determinadas para el análisis.

- O-ftalaldehído (OPA): los derivados de OPA son detectados por fluorescencia. No reacciona con aminoácidos secundarios. Los derivados son poco estables.
- Fenilisotiocianato (PITC) – 4-nitrofenilisotiocianato (NPITC): los derivados de estos reactivos son estables y pueden ser fácilmente detectados por UV.
- Dansyl: derivados inestables. Con base en esta literatura se escogió el PITC.

El patrón de AA utilizado fue: Solución Estándar de Aminoácidos Básicos, Ácidos y Neutros que contiene los 20 aminoácidos esenciales. Se utilizó como estándar interno MetSO<sub>2</sub>

##### **4.5.4.1 Hidrólisis del Péptido**

Se diluyó la muestra (aprox. 100µg) con 3 mL de agua. Se llevó al ultrasonido durante 40 segundos. Se adicionaron 3 mL de HCl 6M y 1% fenol (w/v) bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Se calentó a 150°C durante 60 minutos. Se filtró. Se neutralizó a pH 4-6. Se completó a 50 mL con agua. Se adicionaron a 2,0 mL de extracto, 50 µL de 0,01 M de estándar interno. Se derivatizó. Esta hidrólisis se hizo por triplicado.

##### **4.5.4.2 Derivatización con PITC**

Se liofilizó la muestra hidrolizada. Se solubilizaron los aminoácidos con 20 mL Metanol:agua:trietilamina 1:1:1 (v/v/v). Se rotoevaporó. El residuo se trató con 20 mL de Metanol:agua:trietilamina:fenilisotiocianato 7:1:1:1 (v/v/v/v). Se dejó en reposo por 35

Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*

---

min. a temperatura ambiente. Se rotoevaporó. Se reconstituyó con 200µL de diluyente (amortiguador fosfato:ACN (95:5 v/v)) para análisis por HPLC

#### **4.5.4.3 Análisis por HPLC**

Se utilizó un Cromatógrafo con bomba ternaria BAS, Automuestreador e inyector VARIAN. Columna fase reversa Waters Pico-Tag® (300 mm x 3,9 mm id). Detector UV 254 nm. Volumen de inyección: 100µL. Se utilizó un sistema de gradiente con dos fases móviles **A**:ACN: CH<sub>3</sub>COONa 70mM ajustado a pH 6,55 con CH<sub>3</sub>COOH 10% (2,5:97,5) y **B**:ACN:agua:metanol (45:40:15) y el siguiente gradiente de elución:

Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	100	0
13.5	97	3
24	94	6
30	91	9
50	66	34
62	66	34
62.5	0	100
66.5	0	100
67	100	0
87	100	0

(Albin, D., y colaboradores, 2000; Alberto, M.y colaboradores 2002; Gheshlaghi, R. y colaboradores, 2008; Garde, T. y colaboradores, 2007; Crossman, D.J.y colaboradores, 2000; González, A.M. y colaboradores, 2006; Soufleros, E.H, 2003)

## 4.6 Actividad antimicrobiana

### 4.6.1. Efecto sobre el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas

La actividad antibacteriana fue medida por un método similar al de Broekaert et al.(1990),utilizando un medio de PD (Sigma) que contenía  $1 \times 10^5$  unidades de bacterias formadoras de colonias/mL. Una solución del péptido(20  $\mu$ L) esterilizada por ultrafiltración con membrana de nitrocelulosa y solución estéril del cultivo (80  $\mu$ L) fue colocada en cada pozo del microplato con diferentes concentraciones de la solución del péptido (5, 10, 15, 20 y 25  $\mu$ g/ $\mu$ L). Se incubó por 24 horas a 30°C. La turbidez de la solución(OD) se midió a 490 nm. Se hizo un control negativo con las bacterias pero sin péptido y un control

positivo con antibiótico en cambio de péptido. Todas las medidas se hicieron por triplicado. Las bacterias utilizadas en este ensayo fueron: *E. coli*, *Pseudomonasp.*, *Enterococcus* y *Streptococcus*.

#### **4.6.2. Efectos sobre el Crecimiento de *P. infestans***

La actividad inhibitoria se determinó espectrofotométricamente siguiendo la metodología utilizada en otros trabajos realizados con proteínas de estas características (WoloshukC. P. et al. 1991), utilizando cajas para micro titulación de 96 pozos y un lector de micro placas Biorad.

Para evaluar el efecto inhibitorio *in Vitro* del péptidopurificado sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* se realizaron lecturas de absorbancia a 590 nm de micro cultivos del oomycete a los cuales se les había adicionado diferentes concentraciones del péptido.

El procedimiento se llevó a cabo colocando en cada pozo de la microplaca 80µL de una suspensión esporangial de *P. infestans* con una concentración de ( $1 \times 10^4$  cel/ml) y adicionando 20µL del péptido a concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 µg/µL. Al cabo de 30 minutos se realizó la primera lectura de absorbancia y a las 48 horas después de incubar a temperatura ambiente y en oscuridad. Los microcultivos de control contenían 20µL de la muestra proteica a ensayar en condiciones estériles y 80µL de la suspensión de esporangios, inactivados por calentamiento durante 10 minutos. Todas las medidas se hicieron por triplicado.

Una vez obtenidas las 2 lecturas de absorbancia, se aplicó el factor de corrección para el análisis tanto para los controles como para las muestras. Los valores corregidos son

iguales a la absorbancia a 595nm a las 48 horas menos la lectura a los 30 minutos de iniciado el ensayo:

$$Abs^*_{590nm} = Abs_{48hs} - Abs_{30min}$$

$Abs^*_{595nm}$  = Absorbancia a 590nm corregida

Después de la corrección de estos valores se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento, que se definió como 100 veces la relación de la absorbancia corregida a 595nm del micro cultivo de control menos la absorbancia corregida del ensayo sobre la absorbancia corregida del control:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{100 \times Abs^*_{595nm} \text{ control} - Abs^*_{595nm} \text{ ensayo}}{Abs^*_{595nm} \text{ control}}$$

#### **4.6.3 Ensayo de citotoxicidad en células MCF-7(adenocarcinoma de mama)**

La sal de tetrazolium se ha utilizado para desarrollar un ensayo colorimétrico cuantitativo para la proliferación y supervivencia de células de mamíferos. Este método se basa en la reducción del MTT ([3-4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl

tetrazoliumbromide) a formazan, ocasionado solamente por células metabólicamente activas; la señal generada depende del grado de activación de las mismas. Los cristales de formazan resultantes se solubilizan con isopropanolácido y la absorbancia de la solución colorida generada se lee a 570 nm en un lector de microplacas marca Biorad.



## 5. Resultados y Análisis

### 5.1. Material vegetal

#### 5.1.1. Cultivo de plantas de tomate.

Las plantas de tomate se obtuvieron de acuerdo a lo establecido en la metodología y lográndose un 100% de germinación de las cuales el 91,7% sobrevivieron al trasplante, representando una pérdida de 10 plantas lo que equivale sólo a un 8,3 % del total de las plantas sembradas. Considerando las exigencias de este cultivo se obtuvo una cantidad de plantas apropiada para realizar el trabajo de forma adecuada.

**Tabla 1.** Resumen de los resultados obtenidos en cada uno de los pasos realizados durante la propagación del material vegetal

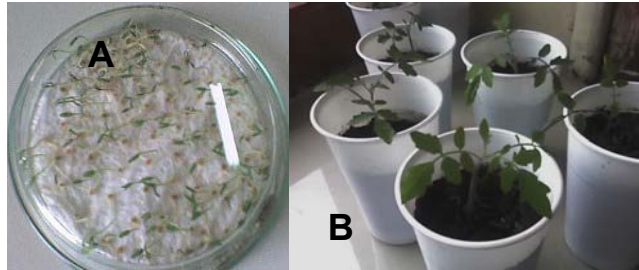
proceso	plantas resistentes	% de éxito en el proceso
Siembra	120	100
Germinación	120	100
Trasplante	110	91,7

Los resultados de este proceso muestran que de las 120 plantas sembradas, solo se perdieron 10 las cuales no crecieron en forma adecuada y al cabo de unos días se murieron representando una pérdida de tan solo el 9,2%. Esto se pudo deber a las condiciones ambientales que si bien se tenían controladas, estas plantas son exigentes en su cuidado, mantenimiento y requerimientos nutricionales; a pesar de eso la cantidad de plantas que sobrevivieron fue suficiente para desarrollar el trabajo aquí planteado.

Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*

---

Se obtuvieron 110 plantas de tomate sanas, con un tamaño y forma de hoja donde cada peciolo contenía entre 7 y 9 folíolos de entre 2 y 5 cm de longitud aproximadamente



**Figura 6.** Obtención del material vegetal. **A** Germinación de semillas de *L. esculentum* en cámara húmeda, **B.** Plántulas de *L. esculentum* var. *cerasiforme* 15 días después de trasplantadas,

Las condiciones climáticas y de luminosidad en la época en que las plantas fueron trasplantadas favorecieron su crecimiento. La dosis de fertilizante suministrada a cada planta fue adecuada ya que se obtuvieron plantas sanas y vigorosas.

## 5.2. Material biológico del fitopatógeno

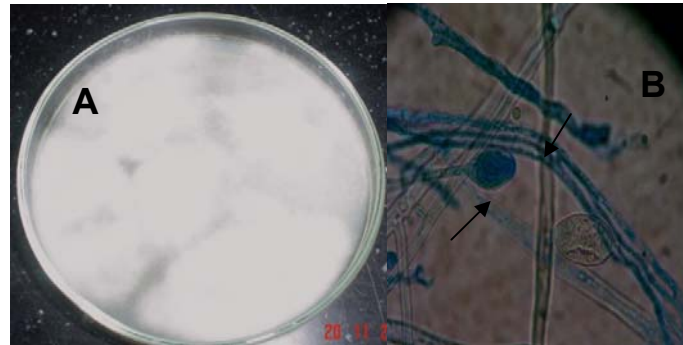
### 5.2.1. Propagación de *P. infestans* *in vitro*.

La obtención en forma pura y virulenta de éste Oomicete, agente de inducción, es un factor significativo para obtener péptidos microbianos con actividad antimicrobiana como las defensinas y/o gama tioninas que estamos buscando.

El micelio puro de *P. infestans* presentó estructuras algodonosas, entrelazadas y abundantes, con crecimiento en forma radial característica bien conocida de este Oomicete. Al microscopio se observaron estructuras esporangiales en forma de



limoncillos con su interior lleno de zoosporas indicativo de su fase de reproducción asexual, la cual se escogió para preparar el inoculo Fig.7B.



**Figura 7.** Obtención de material biológico. A. Vista macroscópica del aislamiento A60 de *Phytophthora infestans*. B. Vista microscópica de las estructuras de *P. infestans*, la flecha indica un zoosporangio en forma de limón.

### **5.3 Inducción de resistencia sistémica en plantas de tomate con *P. infestans***

Una vez inoculadas las hojas con *P. infestans* como se estableció en la metodología, empezaron a presentar síntomas de infección en aproximadamente el 85% de las plantas con un promedio de 4 a 5 ramas por planta infectada. Durante este proceso no se observó daño en flores frutos o tallos, lo cual evidenció la tolerancia de esta variedad al ataque del patógeno.

### **5.4 Extracción de proteína**

#### **5.4.1. Obtención del líquido de lavado intercelular (LLI)**

La extracción de LLI se llevó a cabo tanto para plantas inoculadas (PI) como sin inocular (PS). Para esta extracción se empleó agua destilada a 4°C teniendo en cuenta que las defensinas y/o tioninas tienen carácter catiónico y son altamente básicas a pH fisiológico, por lo tanto para su solubilización se necesita una fuerza iónica alta. Se utilizó

ácido ascórbico directamente sobre el LLI para evitar oxidación de fenoles presentes en las muestras y se almacenaron a -20°C inmediatamente después de la extracción.

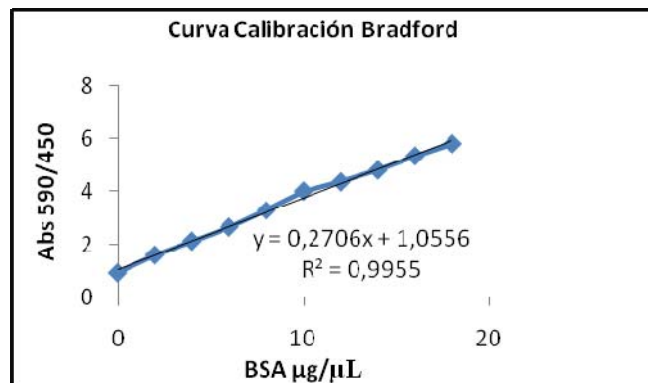
Teniendo en cuenta que aunque para cada extracción se tomaron 10 hojas compuestas, estas no tenían el mismo número de foliolos y por lo tanto diferente peso, dando como resultado en cada extracción diferentes volúmenes de extracción. Estos extractos se reunieron y se obtuvo un total de 60 mL con un contenido de proteína de 214,3 µg/mL para plantas sanas(PS) y 75 mL con 415.8 µg/mL para plantas inoculadas (PI). A cada extracto se le determinó el volumen, cantidad de proteína y actividad antifúngica (Tabla 2).

**Tabla 2:** Resultados de la extracción del LLI para plantas sanas e inoculadas

Muestra	Volumen total (mL)	Proteína µg/mL	Actividad antifúngica
PS	60	214,3	sí
PI	75	415,8	sí

## 5.5. Cuantificación de proteína

Se realizó por el método de Bradford modificado según Sor & Selinger. Se realizaron curvas de calibración por triplicado obteniéndose en todos los casos líneas rectas con coeficientes de correlación de 0,9955. Gráfica 1.



**Gráfica 1.** Curva de calibración para la cuantificación de proteínas según Zor y Selinger

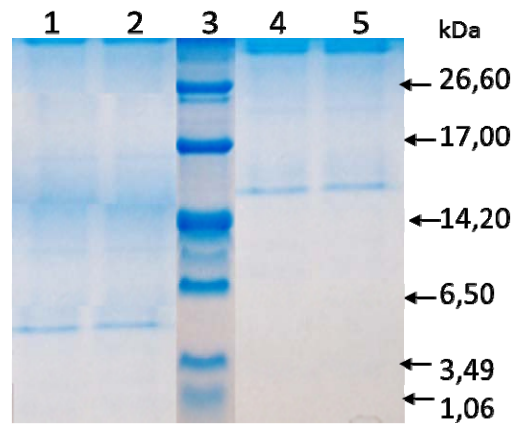
La evaluación de la actividad antifúngica evidenció la presencia de proteínas antifúngicas en los extractos crudos. Sin embargo cabe anotar que esta actividad puede deberse en parte también a la presencia de otro tipo de proteínas que se han encontrado en otros estudios del grupo como por ejemplo quitinasas ó  $\beta$ -1,3-glucanasas.

## 5.6. Obtención de la proteína:

Se hizo un estudio preliminar para determinar el mejor procedimiento para obtener la proteína.

### 5.6.1. Filtración por membranas amicon 10 KDa

Se tomaron 4 mL de LLI de plantas sanas e infectadas se pasaron por la membrana de filtración AmiconUltra-4, 10 kDa de Millipore. Se obtuvieron dos fracciones; la primera, una fracción no retenida **ofiltrado** en donde se encuentran moléculas de peso molecular menores a 10kDa obteniéndose **3,8 mL** en cada unidad. La segunda corresponde a la fracción retenida en donde se encuentran las moléculas de peso molecular mayor a 10kDa de la cual se obtuvo un volumen de **10mL** después de retirarlas de la membrana. Cada una de estas fracciones se liofilizó, se determinó proteína, electroforesis y actividad antifúngica.



**Figura 8.** Electroforesis Tris Tricina para el extracto de plantas infectadas filtradas a través de membranas Amicon 10K. Carriles 1 y 2 fracción que paso a través de Amicon (Filtrado) Carril 3 Marcador M 3546 SIGMA de bajo peso molecular. Carril 4 y 5 fracciones retenidas.

Mediante la observación de la electroforesis para el tratamiento con membranas Amicon tanto en plantas sanas como en infectadas vemos que se llevó a cabo la separación de proteínas por peso molecular, en el filtrado del LLI de plantas inoculadas se observan dos fracciones de proteína una por debajo de 6,5kDa y otra por encima de 6,5 kDa. Mientras que en el filtrado de plantas sanas no se observan bandas. En la fracción del retenido se observan aproximadamente 3 bandas de proteína con pesos superiores a 10 kDa tanto en las PS como en las PI. La proteína obtenida en el extracto LLI de PI filtrado por membranas Amicon 10kDa fue de 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y en el retenido fue de 261,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 5.6.2. Microprecipitación con sulfato de amonio.

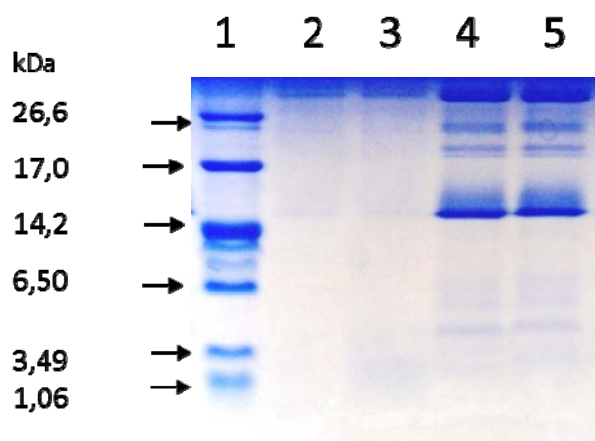
Se llevó a cabo un análisis preliminar con el fin de obtener el porcentaje de saturación de sulfato de amonio en el cual precipita la mayor cantidad de proteína del LLI. Se encontró que antes del 30% la cantidad de proteína que precipitó fue muy baja y que en 70% se precipito la mayor cantidad de proteína.

Con los anteriores resultados se procedió a obtener la proteína, lo cual se hizo en dos pasos de precipitación: 1- se agregó  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en una concentración de

saturación del 25% siguiendo la metodología establecida anteriormente y luego se adicionó hasta completar 70% de saturación obteniéndose una recuperación de la proteína del 80,5% (172,5µg/mL para PS y 334,1µg/mL para PI).

**Diálisis.** Al extracto obtenido en la fase anterior se le realizó una microdiálisis para retirar el sulfato de amonio y luego utilizar este extracto para separar las proteínas por electroforesis.

El **filtrado dializado** obtenido anteriormente se liofilizó, y el **esteliofilizado** obtenido en cada Falcon se resuspendió en 2 ml de solución amortiguadora de fosfato pH 7.0, obteniendo un volumen total de **81 mL** de muestra, con 10.9 mg/mL de proteína,



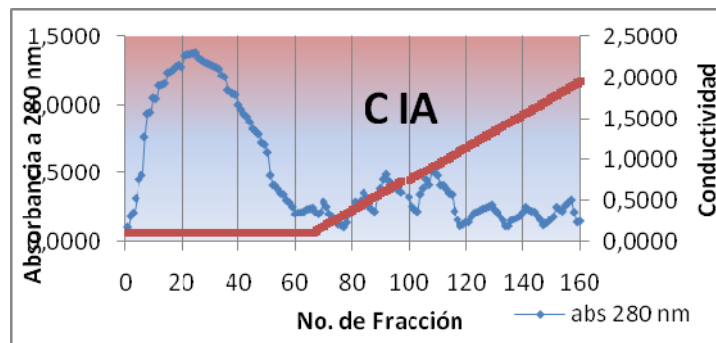
**Figura 9.** Electroforesis Tris Tricina para plantas sanas y plantas infectadas: Carril 1: Marcador M 3546 SIGMA de bajo peso molecular. Carril 2 y 3 plantas sanas. Carril 4 y 5 plantas infectadas

En este caso se observan las bandas correspondientes a proteínas presentes en los dos extractos PS y PI, se observan tanto las fracciones de bajo peso molecular como las de alto peso molecular, a diferencia de la separación con placas Amicom donde la separación es selectiva y se evidencia la separación por peso molecular. Con este resultado del ensayo preliminar se decidió utilizar la filtración con membranas Amicom 10 KDa.

En este ensayo también se puede evidenciar que las plantas sanas no presentan ninguna banda de proteína por debajo de 6,5 kDa lo cual sugiere que los péptidos menores de 10 kDa obtenidos en las plantas infectadas son producto de la resistencia sistémica o inducida de la planta después de ser infectada con *P. infestans*.

### 5.6.3. Cromatografía de intercambio aniónico (CIA)

Para la CIA se aplicaron 2 ml de muestra después de su paso por membrana Amicom con 90 µg/ml de proteína, se recolectaron en total 165 fracciones de 1,5 ml. A cada fracción se le midió la absorbancia a 280nm y conductividad obteniendo un pico correspondiente a la fracción no retenida y varios picos pequeños en intensidad para la fracción retenida. Debido a que el área bajo cada pico era muy amplia se reunieron cada 25 fracciones para determinar proteína y actividad.



**Gráfica 2.** Cromatografía de intercambio aniónico, separación de proteínas de PM entre 3 – 10 kDa presentes en el filtrado dializado, utilizando una columna Pharmacia 10/20 con DEAE Fractogel TSK 650M.

Una vez determinada la actividad antifúngica a todas las fracciones se encontró que la única fracción que mostraba actividad era la **fracción no retenida**, correspondiente al primer pico que contenía las fracciones 1 a 56. Estas fracciones se mezclaron para dejar una sola fracción que correspondía a la fracción no retenida por la columna aniónica. El volumen de la fracción no retenida fue de 84 mL y la proteína fue de 83 µg/mL; a las muestras reunidas cada 20 fracciones se les determinó proteína y actividad antifúngica,

Tabla 3.

**Tabla 3.** Cuantificación de proteína y actividad antifúngica de cada uno de las fracciones obtenidos después de la cromatografía de intercambio aniónico en DEAE.

Fracción	1-20	21-40	41-60	61-80	81-120	121-150	151-160
Muestra No.	1	2	3	4	5	6	7
Volumen muestra (mL)	30,0	30,0	30,0	30,0	60,0	45,0	15,0
Proteína µg	122,2	119,2	34,6	3,6	4,8	2,4	3,2
Proteína µg/mL	4,07	3,97	1,16	0,12	0,08	0,05	0,2
Actividad antifúngica (%)	31,9	43,9	36,7	0,1	0,0	0,0	0,0

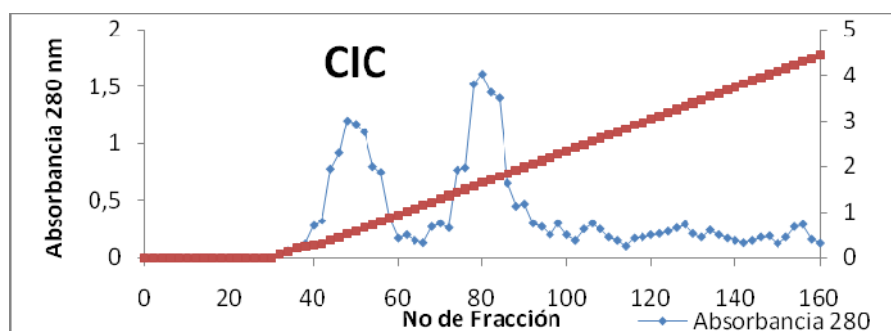
Los 84 ml de **Filtrado No Retenido** se dializaron y liofilizaron, y el sólido obtenido en cada Falcon de 15 mL se resuspendió en 1 ml de solución amortiguadora de fosfato de sodio 50mM pH 7.0, se distribuyó en volúmenes de 2 ml en tubos eppendorf y se guardaron a -20°C para continuar con la purificación.

El pico obtenido en este paso de la cromatografía muestra como los péptidos eluidos no presentan ninguna afinidad con la fase estacionaria indicando que son péptidos catiónicos.

#### 5.6.4. Cromatografía de intercambio catiónico (CIC)

Para esta cromatografía se agregaron 2 mL de **filtrado no retenido** con concentración de 204 µg/ml, y se recolectaron en total 168 fracciones de 1,5 ml, obteniendo 2 picos significativos correspondientes a la fracción no retenida en la cromatografía anterior. Las fracciones correspondientes a cada pico, se mezclaron y se les determinó volumen de muestra, concentración de proteína y actividad antifúngica

Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*



**Gráfica 3.** Cromatografía de intercambio catiónico, para la fracción no retenida en la CIA. Pharmacia 16/20 con CM Sefarosa.

**Tabla 4** Cuantificación de proteína y actividad antifúngica de cada uno de las fracciones obtenidas después de la cromatografía de intercambio catiónico en CM Sefarosa.

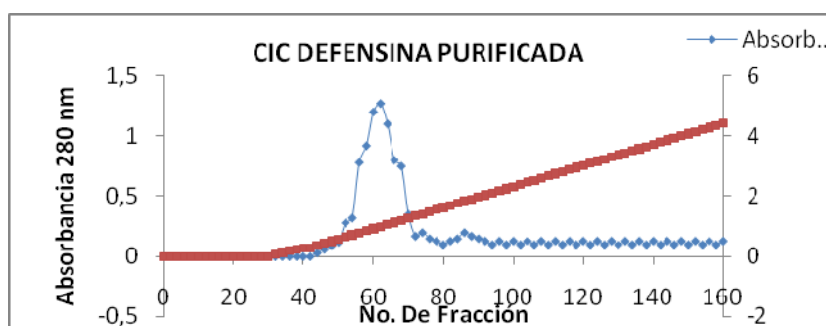
Fracción	30-65	66-100	101-135	136-165
	1	2	3	4
Volumen de muestra ml	35	35	35	35
Proteína Total µg	197	207	0.8	0.8
Concentración de proteína µg/ml	5,63	5,9	0.023	0.023
Actividad antifúngica%	65	0.5	0.0	0.0

Se obtuvieron 2 picos significativos a partir de la fracción no retenida por cromatografía de intercambio catiónico, confirmando que estos péptidos son catiónicos y el pico número 1 correspondiente a las fracciones 46-75 fue el único que presentó actividad antifúngica; los otros picos que se obtuvieron muy poco significativos pueden ser consecuencia de ruido del equipo (bomba peristáltica) o de absorción de residuos de solución de Bradford en los pozos al medir la absorbancia de cada fracción a 280 nm. La fracción 1 se liofilizó en Falcon de 15 mL, el sólido de cada Falcon se resuspendió en 5 mL de solución amortiguadora fosfato pH 7. Después de esto se obtuvieron 15 mL de muestra con una concentración de proteína 4,35 µg /ml. Esta fracción se sometió a electroforesis.

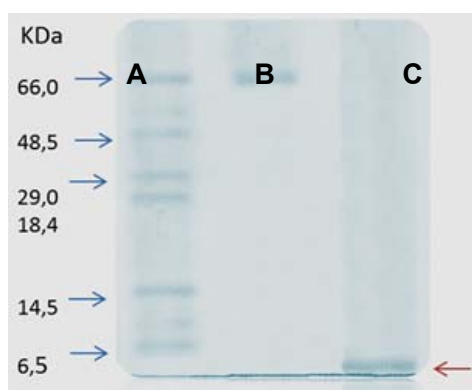


### 5.6.5. Electroforesis con sds-tricina-page

De igual forma que con el extracto de la fracción obtenida con membrana Amicom, al extracto obtenido de la fracción número 1 de la cromatografía de intercambio catiónico después de liofilizarse y dializarse, se realizó electroforesis SDS-TRICINA-PAGE, en condiciones reductoras para comprobar que se había obtenido una sola proteína y que esta correspondía a la defensina y/o tionina que estábamos buscando. En el perfil electroforético que se obtuvo Figura10 se observa una sola banda por debajo de 6,5 kDa, lo cual nos indica que se separó adecuadamente la proteína con propiedades antifúngicas. Para tratar de obtenerla lo más pura posible, esta fracción se volvió a pasar por columna catiónica obteniéndose una fracción con un solo pico, que nos indicaba que se había separado y purificado la proteína buscada. Gráfica 4.



**Gráfica 4.** Cromatografía de intercambio catiónico, para la fracción 1 (F1) que presentó actividad antifúngica. Pharmacia 16/20 con CM Sefarosa.

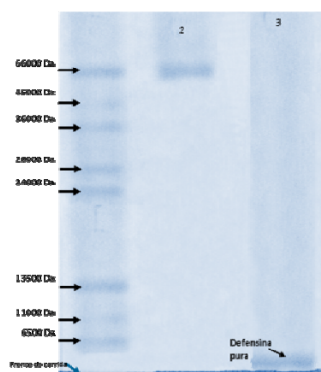


**Figura 10.** Perfil electroforético con SDS- TRICINA-PAGE en condiciones reductoras de la fracción 1 (F1) de la cromatografía catiónica. **A.** Marcador de bajo peso molecular (Sigma) **B.** Patrón de BSA (5 $\mu$ g), **C.F1** (5 $\mu$ g) después de la tercera CIC.

## 5.7. Caracterización de la defensiva o gama tionina.

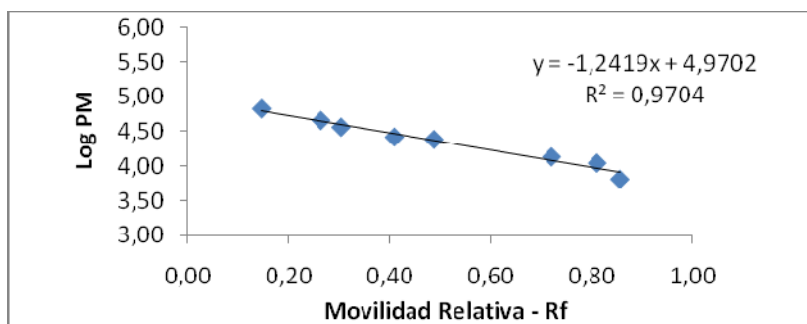
### 5.7.1 Determinación del peso molecular

Para determinar el peso molecular de la proteína purificada, se realizó una electroforesis con SDS-PAGE. Corriendo, en el primer carril patrones de bajo peso molecular marca Sigma, en el segundo carril BSA como control, y en el tercer carril la Defensiva y/o gama Tionina (Figura 11)



**Figura 11.** Electroforesis SDS-TRICINA-PAGE: Carril 1: Marcador SIGMA de bajo peso molecular. Carril 2: Patrón de BSA. Carril 3: defensina purificada

Para determinar el peso molecular de la proteína purificada, se realizó una gráfica del logaritmo del PM de cada uno de los patrones Vs su movilidad relativa (RF); y se interpoló en ella el valor de la movilidad relativa de la muestra obteniendo de esta forma el valor de su peso molecular (PM). Anexo C.



**Grafica 5.** Curva de calibración para la determinación de peso molecular.

La proteína catiónica con actividad antifúngica migro 0,758 cm en el gel, presentó una movilidad relativa de 0,9974 y un peso molecular calculado de 5,27 KDa. Estos datos son concordantes con los obtenidos por Riaño et al., (2004) quien determinó y aisló una posible defensina del LLI de hojas de tomate (*L. esculentum* var. *Ceraciforme*) y cuyo peso molecular fue de 5,24 kDa con actividad antifúngica contra *P. infestans* y el trabajo

de Rojas et al., (2010) donde aislaron genes correspondientes a DEF y LTP a partir de hojas de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* infectadas con *P. infestans*. Tras emplear las secuencias de aminoácidos en la herramienta "Compute pI/Mw" de ExPASy, el programa predijo un peso molecular de 5,35 kDa para el gen DEF hallado en ese trabajo.

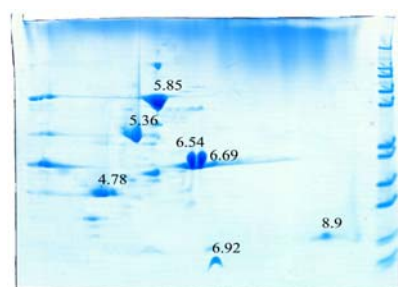
### **5.7.2. Determinación del punto isoeléctrico.**

La primera dimensión en la separación de proteínas en base al contenido de aminoácidos ácidos o básicos. Los grupos cargados de los residuos de aminoácidos son los que contribuyen a la carga neta de la proteína. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en un gradiente de pH, bajo la acción de un campo eléctrico, el cual provocó el movimiento de la proteína en el gradiente donde su carga es cero (0). Si la proteína se difunde lejos de su pI, inmediatamente gana carga y migra hacia su pI. Este es el efecto de enfoque del IEF, el cual concentra las proteínas en sus pI y permite la separación de proteínas en base a diferencia de carga muy pequeñas (Adams, L.D., et al., (2005)). Para el análisis del IEF se utilizó un gel delgado de poliacrilamida como tamiz molecular que contiene un gradiente de pH inmovilizado (IPG), que garantiza que el gradiente de pH sea muy estable y por lo tanto se obtiene una mayor reproducibilidad. La aplicación de la muestra también es un paso importante para tener buenos resultados. Se rehidrata el gel para facilitar la aplicación de altas cantidades de muestra y reducir los tiempos de enfoque (López, J.L., (2007)).

Después del IEF, es necesario equilibrar las tiras IPG, con el fin de permitir la solubilización de las proteínas previamente enfocadas y una completamente interacción con el dodecil sulfato sódico (SDS) de la segunda dimensión. El equilibrio se llevó a cabo tratando las tiras IPG con soluciones amortiguadoras reductoras que contienen SDS e iodoacetamida/DTT para asegurar que las proteínas estén completamente cubiertas con SDS y que las cisteínas estén reducidas y alquiladas (Gorg, A., et al., (2004)).

En la segunda dimensión las proteínas se separan con base en su aparente peso molecular en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Los aniones de SDS se unen a la cadena principal polipeptídica a razón de un SDS por cada dos residuos de aminoácidos. Este complejo de SDS con una proteína desnaturizada tiene una gran carga negativa, que es aproximadamente proporcional a la masa de la proteína. La carga negativa conseguida por unión de SDS es normalmente mucho mayor que la carga de la proteína nativa, por lo que esta se considera no significativa (Stryer L., et al., (1995)). Durante la electroforesis los complejos SDS-proteína migran hacia el ánodo y su movilidad es principalmente dependiente de su peso molecular pero también puede ser influenciada por su hidrofobicidad. La migración de las proteínas en estas condiciones es linealmente proporcional al logaritmo de su masa (Friedman, D.B., et al., (2009)). Las proteínas pequeñas se desplazan rápidamente a través del gel, mientras que las grandes se quedan arriba. Con la ayuda de la co-migración de marcadores estándar de peso molecular y pI conocidos, se pudo aproximar el punto isoeléctrico de la proteína purificada.

Para la determinación del punto isoeléctrico de la proteína purificada se utilizó primero una tira con gradiente lineal de pH 3-10 y un set de proteínas con pI conocidos en un rango de 4,5 – 8,9 como marcadores para poder determinar el punto isoeléctrico de la proteína purificada. En la Figura 16 se observan las diferentes proteínas utilizadas como marcadores pero no se encuentra la muestra, lo que nos llevó a concluir que el pI de esta proteína está por encima de 10.



pH3

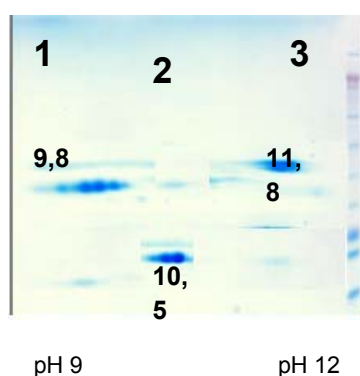
pH10

**Figura 12.** Primera dimensión de IEF de un set de proteínas con pI conocido y la proteína purificada llevada a cabo sobre una ZOOM® pH 3–10 Lineal. El gel resultante de 2D fue teñido con SimplyBlue™ SafeStain.

Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*

---

Dado el resultado anterior se realizó otro análisis con una tira ZOOM® pH 9–12 y con dos marcadores de proteína: Cytochrome C, pI 9,5-10 e Histona H3, pI 11,8. Obteniéndose tres manchas dos de las cuales se conoce exactamente su pI y una tercera que es el péptido purificado el cual nos indica que el pI es aproximadamente 10,5



**Figura 13.** Primera dimensión IEF de un set de proteínas básicas 1. Cytochrome C, pI 9.5–10.0; 2. Defensina y/o tionina, pI; 3. Histone H3, pI 11.8) llevado a cabo sobre una tira ZOOM® pH 9–12. El gel resultante de 2D fue teñido con SimplyBlue™ SafeStain.

### 5.7.3. Determinación de la composición de aminoácidos por HPLC

#### 5.7.3.1 Análisis de reproducibilidad y recuperación de las soluciones de estándares de aminoácidos marca Sigma

Para determinar la precisión y exactitud del método, primero se hizo un estudio de calibración con los estándares de aminoácidos. Se tomó una cantidad equimolecular de solución de estándares ácidos, básicos y neutros (300 pmol de cada aminoácido y 150 pmol para cisteína) y una cantidad exacta de estándar interno (MetSO<sub>2</sub> como estándar interno (173 pmol)) esta mezcla se utilizó para las curvas de calibración. La mezcla fue

diluida con HCl 0,1 M para obtener un amplio rango de concentraciones (entre 20 -700 pmol). Las soluciones estándar se secaron a vacío y se reconstituyeron para ser derivatizadas y segundo, con la defensina y/o gama tionina pura. Esta fue sometida a hidrólisis dividiéndose en tres alícuotas. Cada alícuota se disolvió en 0,1 M de HCl. Se tomaron alícuotas de 20, 30, 40  $\mu\text{L}$  para derivatizar. Las muestras derivatizadas se almacenaron como polvo seco bajo atmosfera inerte a  $-20^{\circ}\text{C}$  y ensayadas después de cinco días para minimizar los escollos técnicos. De hecho se ha reportado que el aminoácido derivatizado con PITC se degrada lentamente a su correspondiente aminoácido feniltiohidantoina cuando se deja en solución por varias horas a temperatura ambiente (Strydom, D.J., et al., (1994)). Los cromatogramas de la mezcla de estándares de aminoácidos (100,0 pmol inyectados) y el estándar interno después de la derivatización con PITC, demostró una excelente relación señal-ruido. El límite de detección de los aminoácidos derivatizados estuvo entre 1 a 4 pmol. Para la muestra se encontró que el nivel de detección fue más alto, esto debido a la presencia de impurezas quizás en los solventes o químicos e incluso en el material de vidrio que fue utilizado. Este límite de detección fue de 20 pmol aproximadamente. La respuesta final de cada aminoácido fue normalizada con el estándar interno ( $\text{MetSO}_2 = 1,00$ ). La Tabla 5 muestra la lista de aminoácidos estudiada en el mismo orden que salieron los picos en el cromatograma, la media del tiempo de retención y la desviación estándar en minutos, las pendientes (m) en términos de unidades de  $\mu\text{Vpmol}^{-1}$  y los coeficientes de regresión lineal ( $R^2$ ) de las curvas de calibración. Se encontró que la mayoría de los aminoácidos tuvo una muy buena recuperación. El promedio de las desviaciones estándar relativas se encontraron entre 3,2% (Pro) y 7,3% (His) concuerdan con la media de la desviación estándar para las soluciones estándar de los aminoácidos de Sigma ( $\pm 4,5\%$ ). Se encontró también que la treonina, alanina, e isoleucina tuvieron las más altas desviaciones (11,1% a 11,7%). Los coeficientes de correlación estuvieron en el rango de 0,09931 y 0,9986. Para Gln y Cys los interceptos se aproximaron a cero y los coeficientes de correlación fueron 0,992 y 0,9980 respectivamente. Los resultados del análisis de los estándares descritos en la tabla 5 mostraron una gran correspondencia entre los interceptos y la recuperación de los aminoácidos demostrando que la técnica tiene una muy buena reproducibilidad y exactitud.

Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas  
presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente  
*Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con  
*Phytophthora infestans*

---

**Tabla 5:** Estudio estadístico de los patrones de aminoácidos obtenido de la derivatización con PTC y sus curvas de calibración. La normalización fue con respecto a el estándar interno MetSO<sub>2</sub>=1,00, unidades de m=  $\mu\text{Vmol}^{-1}$

AA	t <sub>R</sub> (SD)	Normalización (SD)	Pendiente m	R <sup>2</sup>
Asp	3,28 (0,13)	0,982(0,053)	939	0,9991
Glu	3,76 (0,15)	0,977(0,053)	650	0,9978
Ser	8,62(0,44)	0,988(0,056)	659	0,9981
Asn	9,03(0,49)	0,995(0,041)	437	0,9937
Gly	9,65(0,49)	0,993(0,035)	641	0,9989
Gln	10,29(0,53)	0,991(0,030)	670	0,9992
His	15,27(0,76)	0,982(0,072)	540	0,9947
Thr	18,58(0,91)	0,938(0,115)	577	0,9861
Ala	19,45(0,96)	1,02(0,110)	667	0,9946
Arg	21,38(1,10)	1,005(0,021)	685	0,9972
Pro	25,25(1,21)	0,993(0,032)	681	0,9989
Tyr	40,15(0,43)	0,993(0,036)	722	0,9985
Val	43,27(0,35)	0,996(0,032)	705	0,9976
Met	44,73(0,39)	0,994(0,064)	717	0,9931
Cyst	47,00(0,46)	-	1250	0,9980
Ile	50,75(0,29)	0,971(0,112)	800	0,9710
Leu	51,42(0,37)	0,993(0,035)	710	0,9972
Phe	54,53(0,48)	0,992(0,052)	730	0,9972
Trp	55,25(0,54)	1,004(0,031)	819	0,9986
Lys	59,88(0,95)	1,010(0,062)	1330	0,9972

### 5.7.3.2 Análisis de la composición de los aminoácidos del péptido purificado.

La tabla 6 reporta la composición de aminoácidos del péptido derivatizado. Los resultados son expresados como pmol/ $\mu\text{g}$  péptido y representa la media y desviación estándar para 9 diferentes corridas (3 por cada alícuota). Los aminoácidos con las más altas



concentraciones son arginina, cisteína, glicina y lisina dos de ellos aminoácidos básicos. También se puede observar que la más alta concentración es para la cisteína indicándonos que es un péptido rico en este aminoácido propiedad característica de las defensinas o  $\gamma$ -tioninas (Kevin A.T., et al., 2007).

Con este análisis podemos concluir que la proteína aislada y purificada puede ser una defensina o  $\gamma$ -tionina. Esto solo se podrá confirmar con la secuenciación del péptido encontrado.

. **Tabla 6.** Composición de Aminoácidos presentes en la Defensina y/o gamma tionina purificada

<b>AA</b>	<b>Conc. <math>\pm</math>RSD pmol</b>	<b>%Recuperación <math>\pm</math> SD</b>	<b>% AA</b>
Arginina (R)	45.5	98,6 $\pm$ 3,3	10.5
Isoleucina (I)	11.3	112 $\pm$ 4,0	2.6
Cisteína (C)	79,8	96,7 $\pm$ 1,5	18.4
Glicina (G)	45.1	96,0 $\pm$ 2,0	10.4
Lisina (K)	44,3	100,2 $\pm$ 2,5	10.2
Serina (S)	22.1	101,1 $\pm$ 2,6	5.1
Histidina (H)	4.4	94,7 $\pm$ 4,3	1.0
Fenilalanina (F)	33.2	98,7 $\pm$ 5,5	7.7
Treonina (T)	21.1	103,3 $\pm$ 6,0	4.9
Ácidoaspártico (D)	12.2	111,8 $\pm$ 2,0	2.8
Leucina (L)	33,1	96,2 $\pm$ 2,3	7.6
Alanina (A)	11.7	101,9 $\pm$ 2,7	2.7
Valina (V)	11.1	100,0 $\pm$ 2,2	2.6
Glutamina (Q)	33.5	98,6 $\pm$ 1,8	3.1
Ácido Glutámico (E)	11.4	99,6 $\pm$ 1,4	2.6
Asparagina (N)	11.6	99,7 $\pm$ 2,3	2.7
Tirosina (Y)	21.3	99,0 $\pm$ 5,0	4.9

#### **5.7.4 Evaluación del efecto del péptido en el crecimiento de bacterias gram positivas y negativas.**

Debido a la resistencia que han adquirido los patógenos por el uso indiscriminado de pesticidas agrícolas en el caso de patógenos agrícolas o de fármacos convencionales en el evento de patógenos alimentarios, se han buscado alternativas para su control. En

Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*

---

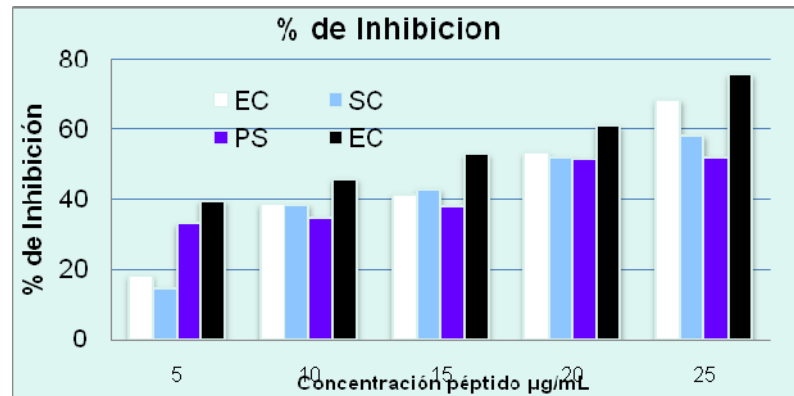
este sentido los péptidos antimicrobianos pueden ser una alternativa viable, ya que han demostrado tener efectos antibacterianos y antifúngicos, pueden inactivar virus e incluso ser citotóxicos en contra de células tumorales (Sitaram y Nagaraj, 1999; Hancock y Scott, 2000; Risso, 2000; Loeza-Angeles et al., 2008). Incluso algunos de estos péptidos ya están siendo utilizados de manera terapéutica, clínica y comercial (Papo y Shai, 2005; Lupetti et al., 2002).

En este trabajo se evaluó la capacidad antimicrobiana del péptido obtenido sobre patógenos bacterianos de mamíferos, de manera particular *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* y *Enterococcus*. Lo anterior se realizó en base a que se ha demostrado que los péptidos antimicrobianos tienen capacidad bactericida contra *Staphylococcus epidermidis* (Caparelliet al., 2008), son capaces de atravesar las membranas celulares de mamíferos (Takeshima et al., 2003; Imura et al., 2008) y además de internalizarse en las células mediante un mecanismo pasivo dependiente de concentración, independiente de la temperatura y sin causar algún efecto citotóxico (Imura et al., 2008).

En este trabajo se demostró que el péptido obtenido presenta actividad antimicrobiana contra los patógenos *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas* y *Enterococcus*, ya que se observó una reducción de hasta un 70% a las 24 horas en las bacterias tratadas con este péptido respecto al control. Estos resultados coinciden con otros estudios donde se demostró que la tionina Thi2.1 de *A. thaliana*, muestra actividad antibacteriana sobre *S. aureus* (Loeza-Angeles et al., 2008). Por otro lado, en otro trabajo mostró una baja actividad antibacteriana de una  $\gamma$ -tionina sobre *S. aureus* (Anaya – López et al., 2006a).

Sin embargo, en este trabajo mostró una reducción importante entre 50 y 60% para *S. aureus* cuando se trató con este péptido (Figura 18). Estos datos podrían ser explicados mediante la hipótesis de que el péptido defensina o gama tionina obtenido del LLI podría estar induciendo la producción de óxido nítrico en las células, hecho que se determinó en

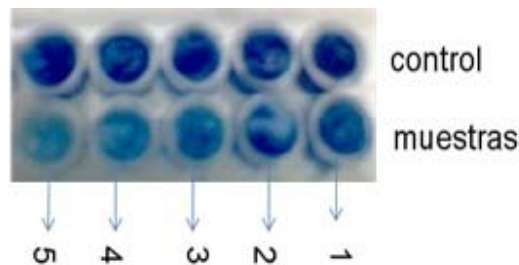
células infectadas por este microorganismo y tratadas con una  $\gamma$ -tionina de *C. chinense*. Para poder confirmar esta hipótesis se deberán medir los niveles de NO producido por las células utilizadas.



**Gráfica 6.** Actividad antibacteriana de la defensina y/o gama tionina encontrada en el LLI del *L. esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *P. infestans* contra bacterias Gram(+) y Gram (-)

### 5.7.4.1 Evaluación de los efectos del péptido en el crecimiento de *Phytophthora infestans*

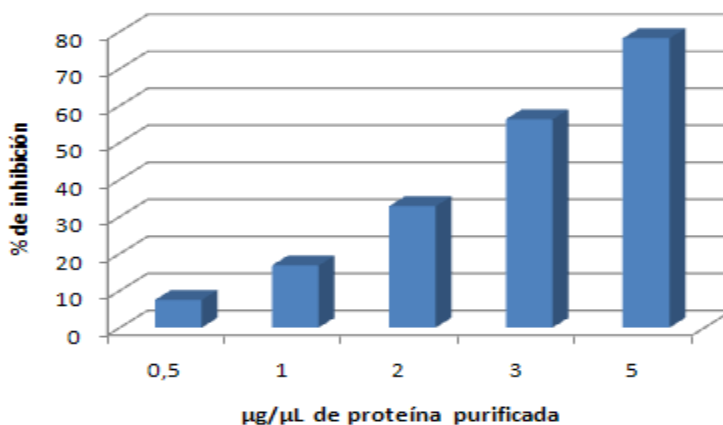
En el bioensayo utilizado para la evaluación de la actividad antifúngica, los controles conteniendo esporas del hongo y ausencia del péptido presentan zonas de mayor intensidad de coloración indicando la presencia de micelio de *P. infestans*; una reducción en dicha intensidad demuestra disminución o no crecimiento del microorganismo. Anexo D.



**Figura 14.** Evaluación de la actividad antifúngica e inhibición del crecimiento para la defensina y/o tionina presente en el LLI de plantas de tomate *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme* una

Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*

vez purificada. Fila 1: Controles, Fila 2. Muestras. 1. 0,5 µg/µL, 2. 1 µg/µL, 3. 2 µg/µL, 4. 3 µg/µL y 5. 5 µg/µL.



**Gráfica 7.** Inhibición del crecimiento de microcultivos de *P. infestans* en función de la concentración de la defensina y/o tionina de *L. esculentum* var. *cerasiforme* purificada.

Para elucidar la actividad antimicrobiana del péptido, se evaluó la actividad antifúngica del péptido, la cual mostró actividad (Figura 19) ya que inhibió la viabilidad de *P. infestans* (aproximadamente 78%). Esta evidencia es soportada basados en que las defensinas de plantas o  $\gamma$ -tioninas tienen principalmente actividad antifúngica (Hancock y Chapple, 1999; Thomma et al., 2002; Pelegrini y Franco, 2005). De manera general, los péptidos antimicrobianos con actividad antifúngica interactúan con los hongos de dos maneras diferentes: 1) lisando la MP, esto puede ocurrir por varios mecanismos, la mayoría de ellos regidos por interacciones electrostáticas inespecíficas, o por la unión a receptores específicos; o 2) interfiriendo con la síntesis de la pared celular o la biosíntesis de componentes celulares esenciales como la glucanasa o la quitina (De Lucca y Walsh, 1999).

El efecto de las  $\gamma$ -tioninas sobre la viabilidad de hongos patógenos representa una ventaja importante para su posible uso como bioinsumo o su uso terapéutico.

Los resultados aquí obtenidos apoyan el posible uso como bioinsumo de la  $\gamma$ - tionina en el combate contra hongos patógenos agrícolas como *P. infestans*.

La inhibición del crecimiento de *P. infestans* debido a la  $\gamma$ -tionina purificada es directamente proporcional a la concentración de proteína aplicada, obteniendo un 78.2% de inhibición cuando se aplicaron 20 $\mu$ L con 5  $\mu$ g/ $\mu$ L de proteína; un 32.8% cuando se aplicaron 2  $\mu$ g/ $\mu$ L, y un 5% de inhibición con la aplicación de 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L del péptido.

### **5.7.5 Ensayo de citotoxicidad:**

La línea celular utilizada fue: MCF-7 (adenocarcinoma de mama) suministrada por el Laboratorio de Biología Molecular de la US. Este ensayo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de La Sabana (US)

#### **5.7.5.1 Mantenimiento General de cultivos celulares**

Las líneas se cultivó en medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS), gentamicina (50  $\mu$ g/ml) y bicarbonato de sodio (2,2 g/L) en cajas de cultivo estériles de 75 cm<sup>2</sup> e incubadas en condiciones estándar (5% CO<sub>2</sub> en el aire, 37°C y 100% de humedad relativa).

#### **5.7.5.2 Conteo y comprobación de viabilidad**

Para la prueba fue necesario tratar los cultivos en estado de 90% de confluencia con una solución de tripsina 0,025%-EDTA 0,03% (ácido etilendiamino tetracético) durante 5 min a 37°C. Tomando una alícuota de la suspensión obtenida por tripsinización, se llevó a cabo una tinción con azul de tripano al 4%, y se hizo el conteo en una cámara de Neubauer.

Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*

---

### 5.7.5.3 Inoculación de placas

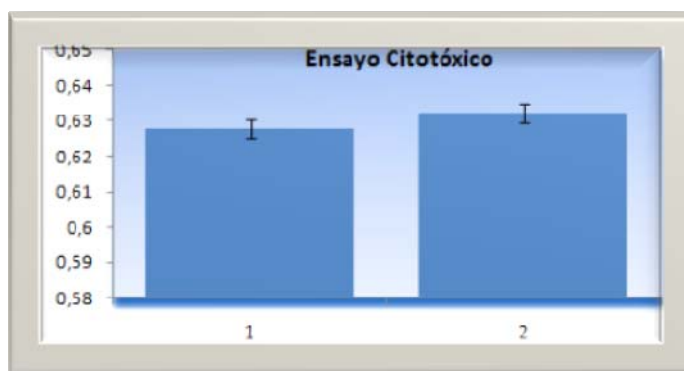
La densidad celular que se utilizó en cada pozo de placas de 96 fue de: 15.000 células/cm<sup>2</sup> para MCF-7

### 5.7.5.4 Análisis de datos

Las absorbancias obtenidas al evaluar la defensina y/o tionina en la línea celular MCF-7 fueron muy similares tanto para las muestras como para los controles.

Tabla 7. Determinación actividad citotóxica

Abs. 570 nm	control	Péptido purif.
1	0,6251	0,6321
2	0,6264	0,6357
3	0,6282	0,6292
<b>promedio</b>	0,6266	0,6323
<b>SD</b>	0,00127105	0,002658738



Gráfica 8. Ensayo citotóxico de la defensina y/o tionina purificada sobre células MCF-7

Los valores oscilan entre 0,632 y 0,627 respectivamente (Tabla 7), evidenciando que a las concentraciones utilizadas no se observó un efecto citotóxico sobre las células (Figura 20). Asimismo, cabe resaltar que los resultados obtenidos para los dos ensayos (control y péptido) por triplicado conservan una tendencia similar y no difieren de manera notable, lo que lleva a tener resultados reproducibles.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

Se encontraron proteínas de bajo peso molecular con actividad antifúngica en el LLI de las hojas de la planta de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme*) después de ser infectadas con *P. infestans*.

Las proteínas presentes en el líquido de lavado intercelular (LLI) se separaron utilizando ultrafiltración con membranas Amicom-Ultra-4 con el fin de retener moléculas de pesos moleculares superiores a 10 kDa.

La proteína de bajo peso molecular se purificó por cromatografía de intercambio iónico (Catiónico y Aniónico) obteniéndose un solo pico que presentó actividad antifúngica, estableciéndose que es una proteína catiónica.

El peso molecular de la proteína fue de 5,25 kDa y su pI fue de 10,5 aproximadamente.

Se implementó y estandarizó un método para HPLC para determinar la composición de aminoácidos de la defensina o gama-tionina aislada y purificada, con muy buena reproducibilidad y recuperación.

Se determinó el porcentaje de cada uno de los aminoácidos que conforman la proteína por HPLC y se encontró que es una proteína rica en aminoácidos básicos y el aminoácido en mayor concentración es la cisteína.

La proteína mostró actividad antimicrobiana hacia bacterias y hongos especialmente contra *P. infestans*. La concentración requerida del péptido para inhibir el crecimiento del hongo fue de aproximadamente 2 a 3 µg/mL.



## 6.2 Recomendaciones

Terminar de Caracterizar la defensina y/o tionina encontrada en el LLI de las hojas de la planta de tomate (*L. esculentum* var. *Cerasiforme*) empleando espectrometría de masas para conocer la secuencia de aminoácidos y establecer si se trata de una defensina o una tionina.

Determinar la estructura terciaria por medio de RMN la cual permitiría confirmar el tipo de plegamiento característico de estos péptidos antimicrobianos denominados Defensinas de plantas.

Evaluar más ampliamente la actividad antimicrobiana empleando una mayor cantidad de bacterias y hongos patógenos a plantas y animales con el fin de establecer su posibilidad de utilizarla como un bioinsumo en el cultivo del tomate y la papa.

Buscar nuevas defensinas en otras plantas como opción para el mejoramiento de los cultivos.



## **A. Anexo: Medio de cultivo agar arveja sacarosa**

### **Reactivos**

- 60 gramos de arveja
- 20 gramos de azúcar
- 20 gramos de agar
- 1 litro de agua destilada

### **Procedimiento**

1. Agregar los 60 gramos de arveja verde en 1 litro de agua destilada y dejarlos allí durante 24 horas.
2. Hervir por 1 hora y media hasta que estén blanditas
3. Retirar del fuego, licuar y filtrar con muselina.
4. Calentar el filtrado y agregar lentamente los 20 gramos de azúcar y agar mezclando continuamente para evitar la formación de grumos.
5. Esterilizar a 120°C y 14 libras de presión durante 30 minutos.
6. Dejar enfriar a 60°C y servir en cajas de Petri conservando las mejores condiciones de esterilidad y asepsia.
7. Dejar solidificar el agar, sellar las cajas con vinipel y guardar en refrigeración a 4°C durante no más de 30 días para mantener los medios frescos.

Nota: Para la preparación del caldo se realiza el mismo procedimiento, exceptuando la aplicación de agar a la mezcla.

## **B. Anexo. Cuantificación de proteínas por el método de zor y selinger (Bradford modificado)**

La base de este método es la misma que la del método de Bradford, con la excepción de que se realizan lecturas a dos longitudes de onda distintas con el fin de obtener una razón 595/465 nm que permite linearizar la curva entre concentraciones de 0,5 y 50 µg

### **Reactivos**

Azul de Coomassie Brillante G- 250

Etanol 96%

Ácido Fosfórico 80%

Agua Desionizada

Patrón de Albumina Sérica Bovina (BSA)

### **Preparación**

Se toman 100 mg de Azul de Coomassie Brillante G- 250 y se disuelven en 50 mL de etanol al 96%, se adicionan 100 mL de ácido fosfórico al 80%, se lleva a 1 litro con agua des ionizada, ésta solución se filtra dos veces y se guarda a 4°C protegiendo el recipiente de la luz.

Tabla 8. Datos de la curva de calibración para la cuantificación de proteínas.

<b>Proteína µg/mL</b>	Primera lectura Abs.590/450	Segunda lectura Abs.590/450	Tercera lectura Abs.590/450	<b>Promedio lectura Abs.590/450</b>
<b>0</b>	0,9375	0,8931	0,9512	<b>0,9273</b>
<b>2</b>	1,4576	1,6678	1,6750	<b>1,6001</b>
<b>4</b>	1,9814	2,1595	2,2280	<b>2,1230</b>
<b>6</b>	2,6389	2,5858	2,7375	<b>2,6541</b>
<b>8</b>	3,1453	3,2857	3,4222	<b>3,2844</b>
<b>10</b>	3,9594	4,0081	4,0875	<b>4,0155</b>
<b>12</b>	4,3604	4,3696	4,3604	<b>4,3602</b>
<b>14</b>	4,8539	4,6573	4,9025	<b>4,8045</b>
<b>16</b>	5,3140	5,1566	5,5502	<b>5,3402</b>
<b>18</b>	5,7559	5,8323	5,8127	<b>5,8003</b>

- 32 Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*
- 

## Anexo C

### Determinación del peso molecular. (PM)

La distancia recorrida por el frente de corrida fue de 7,6 cm

Tabla 10. Datos de la curva de calibración para determinar el peso molecular (PM).

<b>PM</b>	<b>log PM</b>	<b>Distancia recorrida</b>	<b>Rf</b>
66000	4,82	1,1	0,145
45000	4,65	2	0,263
36000	4,56	2,3	0,303
26000	4,41	3,1	0,408
24000	4,38	3,7	0,487
13500	4,13	5,5	0,724
11000	4,04	6,2	0,816
6500	3,81	6,5	0,855

Para realizar este análisis se utilizó un marcador de bajo peso molecular marca **SIGMA**

## Anexo D

### Electroforesis en geles de poliacrilamida sds-tricina-page

Este tipo de electroforesis utiliza un sistema tampón Tris-Tricina, el cual permite una mayor resolución de las bandas de proteínas de bajo peso molecular (Schägger y von Jagow, 1987). En este tipo de gel las proteínas son fraccionadas por peso molecular y consta de tres partes, la primera de aproximadamente 6,5 cm de alto tiene la siguiente composición: 17 % (p/v) de poliacrilamida a partir de un “stock” de acrilamida/bisacrilamida 48:3 % (p/v), tampón Tris- HCl 1 M, pH 8,9, SDS 0,1 % (p/v), glicerol 9,3 % (v/v), persulfato de amonio 0,03 % (p/v) y Temed 0,03 % (v/v). La segunda parte del gel mide aproximadamente 2 cm de alto con la siguiente composición: 10 % (p/v) de poliacrilamida a partir de un “stock” de acrilamida/bisacrilamida 48:1,5 % (p/v), tampón Tris-HCl 1 M, pH 8,9, SDS 0,1 % (p/v), persulfato de amonio 0,05 % (p/v) y Temed en similares concentraciones que en la primera parte. La tercera parte que corresponde al gel espaciador, mide aproximadamente 2 cm de alto con la siguiente composición: 5 % (p/v) de poliacrilamida a partir de un “stock” de acrilamida/bisacrilamida 30:0,8 % (p/v), tampón Tris-HCl 0,128 M, pH 6,8, EDTA 2 mM, persulfato de amonio 0,1 % (p/v) y Temed 0,05 % (p/v).

#### Soluciones stock

- **Acrilamida – Bisacrilamida (48:3):** Se prepara disolviendo 48g de acrilamida y 3 g de bisacrilamida en un volumen de 100mL. La solución se filtra y se guarda en un frasco protegiéndola de la luz.
- **Persulfato de Amonio (15% p/v):** 0,15g de persulfato de amonio disueltos en 10 mL de agua. La solución debe utilizarse recién preparada.

34            Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicum esculentum var. Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*

---

- **Buffer del de concentración (Tris –HCl 0.5 M pH 6.8):** Se disuelven 6g de Tris en 70 mL de agua y se ajusta pH con HCl. Completar volumen a 100mL.
- **Buffer de gel de resolución (Tris- HC 3M pH 8.8):** Se disuelven 36.3g de Tris en 70 mL de agua y se pH con HCl. Completar volumen a 100 mL.
- **Buffer para los reservorios (Tris-glicina pH 8.3):** Disolver 3.0g de Tris y 14.4 de glicina en agua y completar a un volumen final de 1L.
- **TEMED:** Se utiliza puro.

### **Preparación de la muestra**

Generalmente se agregan entre 15 a 20  $\mu$ L. En total por pozo, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.2%, la muestra y el volumen final se completa con amortiguador de concentración.

### **Condiciones de corrido**

Una vez sembradas las muestras, se conectan los electrodos a la cámara y a la fuente; se aplica un potencial de 100V hasta que el frente de corrido pase al gel de separación y después se aplica 200 V hasta que el frente de corrido llegue al final del gel.



**Anexo E****Efectos del péptido purificado sobre el crecimiento de microcultivos de *P. infestans***

Tabla 22. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Phytophthora infestans*, en función a la concentración de Defensina y/o Tionina purificada aplicada.

Concentración péptido		Absorbancia 595nm Corregida (SD)	% de inhibición	Actividad antifúngica
0,5 µg/µL	Control	0.054	7,5%	Si
	Muestra	0.030		
1 µg/µL	Control	0.128	16,4%	Si
	Muestra	0.107		
2 µg/µL	Control	0.329	32,8%	Si
	Muestra	0.224		
3 µg/µL	Control	0.387	56,3%	Si
	Muestra	0.169		
5 µg/µL	Control	0.465	78,2%	Si
	Muestra	0.113		



## Bibliografía

1. Abad G. and Abad J., 1995. Historical evidence on the occurrence of late blight of potato, tomato and pearl melon in the Andes of South America. Page 36 – 49
2. Adams, L.D., Gallagher, S. R., 2005. Two-dimensional gel electrophoresis. CurrProtoclimmunol. Chapter8 : p. Unit 8 5.
3. Alberto, M.; Arena, M.; Manca de Nadra, M., 2000. A comparative survey of two analytical methods for identification and quantification of biogenic amines. Food Control. 13: 125.
4. Albin, D., Wubben, J., Gabert, V., 2000. The influence of hydrochloric acid concentration and measurement method on the determination of amino acid levels in soya bean products. Animal Feed Science and Technology. 87: 173.
5. Almeida, M. S., Cabral, K. M., Kurtenbach, E., Almeida, F. C., & Valente, A. P., 2002. Solution structure of Pisumsativumdefensin 1 by high resolution NMR: Plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. J. Mol. Biol. 315: 749–757.
6. Almeida, M. S., Cabral, K. M., Kurtenbach, E., & Zingali, R. B., 2000. Characterization of two novel defense peptides from pea (Pisumsativum) seeds, Arch. Biochem. Biophys. 378: 278–286.
7. Anaya-López-, J.L., Lopez-Meza, J.E., Baizabal\_Aguirre, V.M., Cano-Camacho,

- H., Ochoa-Zarzosa, A., 2006. Fungicidal and citotoxic activity of a Capsicum chinensedefensin expressed by endotelial cells. *Biotechnol. Lett.* 28 (14): 1101-1108
8. Andrews A.T., 1986. *Electrophoresis Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications*. Clarendon Press. London. Pp 5-74.
9. Beyer, M. Y Diekmann, H., 1984. The Laminarinase System of *Streptomyces* Sp. Atcc 11238. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 207-212.
10. Bloch, C., Jr., Patel, S. U., Baud, F., Zvelebil, M. J. J. M., & Carr, M.D., 1998. H NMR structure of an anti-fungal  $\gamma$ -thionin protein Sl $\alpha$ 1: Similarity to scorpion toxins, *Proteins* 32: 334–349.
11. Bloch, C., Jr., & Richardson, M., 1991. A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect alpha-amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) have sequence homologies with wheat gamma-purothionins, *FEBS Lett.* 279: 101–104.
12. Broekaert, W.F., Terras, F.R.G., Cammue, B.P.A., and Vanderleyden, J., 1990. An automated quantitative assay of fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.*, 69, 55-60.
13. Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology* 3, 238-250.
14. Bruix, M., Gonzales, C., Santoro, J., Soriano, F., Rocher, A., Mendez, E., et al.,

1995. <sup>1</sup>H NMR studies on the structure of a new thionin from barley endosperm, *Biopolymers* 36: 751–763.
15. Bruix, M., Jiménez, M. A., Santoro, J., Gonzales, C., Colilla, F.J., Mendez, E., et al., 1993. Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by <sup>1</sup>H-NMR: A structural motif common to toxic arthropod proteins, *Biochemistry* 32: 715–724.
16. Buchanan B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L., eds 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Amer. Soc. PlantPhysiologist, Rockville MD.
17. Caaveiro, J.M. Molina, A. Gonzalez-Manas, J.M. Rodriguez -Palenzuela, P. García-Olmedo F. and Goni, F.M., 1997. Differential effects of five types of antipathogenic plant peptides on model membranes, *FEBS Lett.* 410: 338–342.
18. Cammue, B.P.A., De Bolle M .F.C., Terras F.R.G., Proost P., Van Damme J. And Broekaert W.F., 1992. Isolation And Characterization Of A Novel Class Of Plant Antimicrobial Peptides From *Mirabilis Jalapa* L, Seeds. *The J. Biol. Chem.* 267(4): 2238-2233.
19. Carlüe M.J., 1983. "Motility, Taxis and Tropism In *Phytophthora*". In *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology And Pathology*. American Phythopathological Society. St Paul. 95-107.
20. Castagnaro, A. Manara, C. Carbonero P. and García-Olmedo, F., 1994. cDNA cloning and nucleotide sequences of  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-thionins from hexaploid wheat endosperms, *Plant Physiol.* 3: 1221–1222.
21. Castro M.S., Fontes W., Morhy L. and Bloch Jr. C., 1996. Complete amino acid

sequences of two gamma-thionins from maize (*Zea mays* L.) seeds, *Prot. Pep. Lett.* 3: 267–274.

22. Castro V.R.O. and Vernon L.P., 2003. Stimulation of protrombinase activity by the nonapeptide Thr-Trp-Ala-Arg-Ser-Tyr-Asn-Val, a segment of a plant thionin, *Peptides* 24: 515–521.

23. Cortez Pedro E., 2002. *El Reino De Los Hongos*. Ed. Limusa. Pp. 126-130; 370-380.

24. Crossman, D.J.; Clements, K.D.; Cooper, G.J.S., 2000. Determination of protein for studies of marine herbivory: a comparison of methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 244: 45.

25. De Lucca and Walsh T., 1999. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1–11.

26. Diaz I., Carmona M.J. and García-Olmedo F., 2000. Effects of thionins on beta-glucuronidase in vitro and in plant protoplasts. *FEBS Lett.*, 296, 279–282.

27. Disagro. 1996. *Cultivo De Tomate*. Boletín Disagro 4(1): 1-8.

28. Domínguez F., 1965. *Plagas Y Enfermedades De Las Plantas Cultivadas*. 3ª Ed. Dossan S.A. Madrid. Pág. 10-17.

29. Erwin, D.C. and Ribeiro O.K., 1996. *Phytophthora "Diseases W worldwide*. APS

Press, St. Paul, Minnesota.

30. Fant F., Vranken W., Broekaert W. and Borremans F., 1998. Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by <sup>1</sup>H NMR, *J. Mol. Biol.* 279: 257–270.
31. Franco O.L., Rigden D.J., Melo F.R. and Grossi-de-Sá M.F., 2002. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases. Structure, function and potential for crop protection, *Eur. J. Biochem.* 269: 397–412.
32. Freitas S.M., Ikemoto H. and Ventura M.M., 1999. Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI), *J. Prot. Chem.* 85: 2444–2448.
33. Friedman, D.B., S. Hoving, and R. Westermeier, 2009. Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol*, 463: 515-40.
34. Fujimura M., Ideguchi M., Minami Y., Watanabe K. and Tadera K., 2004. Purification, characterization and sequencing of novel antimicrobial peptides, Tu-AMP 1 and Tu-AMP 2, from bulbs of tulip (*Tulipa gesneriana* L.), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 571–577.
35. Fujimura M., Ideguchi M., Minami Y., Watanabe K. and Tadera K., 2005. Amino acid sequence and antimicrobial activity of chitin-binding peptides, Pp-AMP 1 and Pp-AMP 2, from Japanese bamboo shoots (*Phyllostachys pubescens*), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 642–645.
36. García-Olmedo F., Molina A., Alamillo J.M. and Rodríguez-Palenzuela P., 1998. Plant defense peptides, *Biopolymers* 47: 479–491.

37. Garcia-Olmedo y colaboradores, 2001. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.* 498: 219-222
38. Garde, T.; Arias, M.; Marsellés, R.; Ancín, C.; Martín, O., 2007. Effects of thermal and non-thermal processing treatments on fatty acids and free amino acids of grape juice. *Food Control.* 18: 473.
39. Gheshlaghi, R.; Scharer, J.M.; Moo-Young, M., Douglas, P.L., 2008. Application of statistical design for the optimization of amino acid separation by reverse-phase HPLC. *Analytical Biochemistry.* 383 93.
40. González, A.M.; Alfonso, J.; Cordón, C.; García, R.; Sánchez, J., 2006. HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry.* 95:148.
41. Gorg, A., Weiss, W., Dunn, M.J., 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 4 (12): 3665-85.
42. Guex N. and Peitsch M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18: 2714–2723.
43. Hancock, R.E.W. and Scott, M.G., 2000. The role of membranes in the activities of microbial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 206 , 143-149
44. Hancock, R.E.W., Chapple, D.S., 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents*



- Chemother. 43 (6): 1317-1323.
45. Hames B.D. And Rickwood D., 1996. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach Oirlpress. New York.
46. Imura Y., Choda N. y Matsuzaki K. 2008. Magainin 2 in action: distinct modes of membrane permeabilization in living bacterial and mammalian cells. *Biophys J.* 12: 5757-5765.
47. Judelson H., 1997. The Genetics and Biology of Phytophthora Infestans: Modern Approaches To A Historical Challenge. *Fungal Genet. Biol.* 22: 65-76.
48. Kashmerick, C., Souza-castro, M., 1998. Functional and structural features of  $\gamma$ -zeathonins, a new class of sodium channel blockers. *FEBS Lett.* 440: 302-306
49. Kevin A.T. Silverstein, William A. Moskal Jr. , Hank C. Wu , Beverly A. Underwood, Michelle A. Graham, Christopher D. Town and Kathryn A. VandenBosch. 2007. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *The Plant Journal* 51, 262–280.
50. Lay F.T., Schirra H.J., Scanlon M.J., Anderson M.A., and Craik D.J., 2003. The three-dimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP, *J. Mol. Biol.* 325: 175–188.
51. Lay, F.T., Anderson, M.A., 2005. Defensins: Components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6: 85-101

- 44 Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*
- 

52. Levine A, PenellRi, Alvares M., 1996. Calcium- Mediated Apoptosis In Plant Hypersensitive Disease Resistance Response. *Current Opinion Biology* 6: 427-437.
53. Li S.-S., Gullbo J., Lindholm P., Larsoon R., Thunberg E. and Samulesson G. et al., 2002. Ligatoxin B, a new cytotoxic protein with novel helix-turn-helix DNA-binding domain from the mistletoe *Phoradendron ligae*, *Biochem. J.* 366: 405–413.
54. Loeza-Angeles H., Sagrero-Cisneros E., Lara-zárate L., Villagómez E., López-Meza J.E., y Ochoa-Zarzosa A. 2008. Expression of thionin hi2.1 from *Arabidopsis thaliana* in endothelial cells with antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotech Lett.* 30: 1713-1719
55. Lopez,J.L.,2007. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J. Chromatography B Analyt Technol Biomed LifeSci*, 849 (1-2): 190-202.
56. Lupetti, A., Danesi, R., Van'twout, J.W., Van Dissel, J.T., Senesi, S., Nibbering, P.H., 2002. Antimicrobial peptides: therapeutic potencial for the treatment of *Candida* infections. *Expert Opin Investig Drugs.* 11(2) 309-318.
57. Maldonado A.M., Doerner P., Dixon R.A., Lamb, J.C., and Cameron R.K., 2003. A putative lipid transfer Protein involved in systemic resistance Signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 419:399-403.
58. Martin Gregory B, and Bogdanove Adam J., 2003. Understanding the Functions of Plant Disease Resistance Proteins. *Annual Reviews Plant Biology* 54: 23-61.

59. McLeod A, Denman S., Sadie A., and Denner F., 2001. Characterization of South African Isolates of *Phytophthora Infestans*. *Plant Diseases* 85(3): 278-291.
60. Melo F.R., Ridgen D.J., Franco O.L., Mello L.V., Ary M.B. and Grossi-de-Sá M.F. et al., 2002. Inhibition of trypsin by cowpea thionin: Characterization, molecular modeling, and docking, *Proteins* 48: 311–319.
61. Meyers, Blake C. and Kaushik, Shaíl. 2005. Evolving Disease Resistance Genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8:129-134
62. Mitler Ron. 2002. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance. *Trends In PlantScience* Vol. 7 No 9: 405-410.
63. Morantes Sandra J., Páez Alexandra, Cordero Claudia P., Rincón Javier y Aristizábal Fabio A., 2006. Actividad Citotóxica y Análisis Fitoquímico de Fracciones Aisladas del Extracto Etanólico total de *Acnistusarborescens*. *Acta Farm. Bonaerense* 25 (4) 491-6
64. Morris C, J.O.R., Morris P., 1976. Ion- Exchange Chromatography. *Separation Methods in Biochemistry*. Pitman Publishing. Pp 251-357.
65. Nitti G., Orru S., Bloch Jr. C, Morhy L., Marino G. and Pucci P., 1995. Amino acid sequence and disulphide-bridge pattern of three gamma-thionins from *Sorgum bicolor*, *Eur. J. Biochem.* 228: 250–256.
66. Oita S., Ohnishi-Kameyama M. and Nagata T., 2000. Binding of barley and wheat alpha-thionins to polysaccharides, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 958–964.

46            Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*

---

67. Pelegrini, P.B., Franco, O.L., 2005. Plant  $\gamma$ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multifunctional class of defense proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 2239-2253.
68. Papo, N., Shai, Y., 2005. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 784-790.
69. Riaño L.D., and Zamora H. M., 2004. Determinación de la presencia de posibles defensinas en hojas de plantas de tomate *Lycopersicon esculentum* cerasiforme) variedad resistente y su acción frente a *Phytophthora infestans*.
70. Risso, A., 2000. Leukocyte antimicrobial peptides: Multifunctional effector molecules of innate immunity. *J. leukoc. Biol.* 68: 785-792.
71. Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cázares, B. and Lucas, W.J., 2001, The Phloema as conduit for inter-organ communication. *Current opinion Plant Biology*, 4:202-209.
72. Ryals J, Lawton KA, Delaney TP, Friedrich L, Kessmann H, Neuenschwander U, Uknes S, Vernooij B, Weyman K., 1995. Signal transduction in systemic acquired resistance. *ProcNatlAcadSci USA* 92:4202–4205.
73. Ryan, C.A. and Pearce, G., 1998. Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 1±17.
74. Schagger, H., and Jagow, G.V., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the range from 1 to 100 kDa. *Anal.*

- Biochem., 166: 368 -379.
75. Sitaram, N., Nagaraj, R., 1999. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: Structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462, 29-54
76. Segura A., Moreno M., Molina A. and García-Olmedo F., 1998. Novel defensin superfamily from spinach (*Spinaciaoleracea*), *FEBS Lett.* 435: 139–162.
77. Selitrennikoff C.P., 2001. Antifungal proteins, *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2883–2894.
78. Shah, J. &Klessig, D.F. 1996. Identification of a salicylic acid-responsive element in the promoter of the tobacco pathogenesis-related  $\beta$ -1,3-glucanase gene, *PR-2d*. *Plant J.*, 10: 1089 1101.
79. Smith, J. A. And D. R. Berry. 1974. *An Introduction to Biochemistry of Fungal Development.* Academic Press. New York.
80. Soufleros, E.H.; Bouloumpasi, E.; Tsarchopoulos, C.; Biliaderis, C.G., 2003. Primary amino acid profiles of Greek White wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. *Food Chemistry.* 80: 261.
81. Spelbrink R.G., Dilmac N., Allen A., Smith T.J., Shah D.M.andHockerman G.H., 2004. Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins, *Plant Physiol.* 135: 2055–2067.
82. Stryer L., B.J.M., Tymoczko J.L., 1995. Investigación en proteínas, in *Bioquímica*,

- 48            Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicum esculentum* var. *Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*
- 

Reverté: Barcelona, España. p. 77-116.

83. Sung, Z.R., 1976. Turbidimetric Measurement of Plant Cell Culture Growth. *Plant Physiol.* 57: 460-462.
84. Takeshima K., Chikushi A., Lee K.K., Yonehara S., y Matsuzaki K. 2003. Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes. *J. Biol Chem.* 2: 1310-1315.
85. Terras, F.R.G., y colaboradores 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defense. *Plant Cell.* 7: 573-588
86. Thevissen K., Ghaze A., De Samblanx G.W., Brownlee C., Osborn R.W. and Broekaert W.F., 1996. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins, *J. Biol. Chem.* 271: 15018–15025.
87. Thevissen K., Idkowiak-Baldys J., Im Y.J., 2005. SKN1, a novel plant defensin-sensitivity gene in *Saccharomyces cerevisiae*, is implicated in sphingolipid biosynthesis, *FEBS Lett.* 579: 1973–1977.
88. Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., Thevissen, K., 2002. Plant Defensins. *Planta* 216: 193-202.
89. Thomma B.P.H.J., Cammue, B.P.A., Thevissen, k., 2003. Mode of action of plant defensins suggest therapeutic potential. *Curr. Drug Targets Infect Disord.* 3, 1-8.

90. Van Jagow G., Schagger H., 1994. A Practical Guide to Membrane Protein Purification. Academic Press. San Diego. USA. Pp 3-21.
91. Verterberg O. 1971. Biochemistry Biophysics Acta. 243:345-348.
92. Villa-Perelló M., Sánchez-Vallet A., García-Olmedo F., Molina A. and Andreu D., 2003. Synthetic and structural studies on Pyrulariapuberathionin: A single-residue mutation enhances activity against Gram-positive bacteria, FEBS Lett. 536: 215–219.
93. Villegas J. S., 2003. "Monografía sobre Phytophthora infestans". Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias Agropecuarias. Medellín. Colombia. Pp. 4-120.
94. Webster, J., 1980. Introduction to Fungi. Cambridge University Press, London.
95. Wewtermeir R., 1993. Electrophoresis in Practice a Guide to Theory and Practice. Weinheim. New York. Pp 12-19, 75-82.
96. Wijaya R., Neumann G.M., Condrón R., Hughes A.B. and Ploya G.M., 2000. Defense proteins from seed of Cassia fistula include a lipid protein homologue and a protease inhibitory plant defensin, Plant Sci. 159: 243–255.
97. Woloshuk, C.P.; Meulenhoff, J.S; Sela-Buurlage, M; P.J.M; Corneliessen, B.J.C., 1991. Pathogen Induced Proteins Whith Inhibitory Activity Toward Phytophthora infestans . The Plant Cell, 3: 619-628.
98. Yamano A., Heo N. and Teeter M.M., 1997. Crystal structure of Ser-22/Ile-25 form crambin confirms solvent, side chain substrate correlations, J. Biol. Chem. 272: 9597–9600.

50            Determinación, aislamiento, purificación y caracterización parcial de tioninas presentes en espacios intercelulares de plantas de tomate resistente *Lycopersicum esculentum var. Cerasiforme* después de infección con *Phytophthora infestans*

---

99. Zapata J., 1994. Principios Básicos De Fitopatología. 2ª Ed. Zamorano Academic. Honduras. Pág.80-150.

100. Zhang, V., Lewis, K., 1997. Fatalins: New antimicrobial plant peptides. FEMS Microbiol. Lett. 149: 59-64.

101. Zor T and Sellinger Z., 1996. Linearization Of Bradford Proteins Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. AnalyticalBiochemistry. 236:302-308.