



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias, Udelar

PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN FUNCIONAL DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN LA AGRICULTURA

Licenciado en Bioquímica Diego Alem

C.I.: 3.671.947-3

Tutor: Ing. Agr. Marco Dalla Rizza, Ph D

Co tutor: Bqca. Paola Díaz Dellavalle, Ph D



“No esperes resultados diferentes si siempre haces lo mismo”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Marco y Paola; quienes confiaron y permitieron crecer profesional y humanamente.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y la Agencia Nacional de Investigación e Inivación (ANII) por financiar este trabajo.

A Mónica Marín por el apoyo en su rol de Directora Académica, y a la Maestría en general por generar una instancia en el país que permite desarrollar profesional y humanamente a los que queremos esta profesión.

A los correctores por la disposición de corregir rápidamente y las correcciones y consejos dados.

A los compañeros del laboratorio que me aguantaron estos años María Sara, Matías Andrea, Paola

A los compañeros de la Unidad de Biotecnología, representados en Rafa, Pablo, Silvita y Carlitos

A los compañeros de la estación experimental Salto Grande en especial Ana Arruabarrena, Mario Giambiasi, Pablo Varela y Fernando Rivas donde desarrolle el ensayo *in vivo*.

A la Unidad de Proteínas del Instituto Pasteur Montevideo en especial a Madelón Portelña y Rosario Duran quienes han tenido que aguantar consultas en cuanto a la espectrometría de masas

Al Dr. Giovanni de Simone y a la gente del Laboratorio de Proteínas y Peptideos (Fiocruz, Rio de Janeiro) quines me recibieron muy amablemente en la pasantía realizada,

Al Dr. Gustavo Varela (Instituto de Higiene) y su laboratorio en general.

Finalmente un eterno agradecimiento a mis padres José y Graciela, a mis hermanos Fernando y Analaura, a mi Amor Meli, a toda mi familia y a la familia que uno elige que son los amigos, que tanto me han sabido aguantar, que han compartido todo lo bueno y lo malo de este proceso y la de la vida misma.

ABREVIACIONES

% I	porcentaje de inhibición
% H	Porcentaje de hemólisis
% R	porcentaje de rendimiento
aa	aminoácidos
Abs	Absorbancia
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Antimicrobial peptides
Aq-AMP	Péptido antimicrobiano de <i>Amaranthus quitesnis</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BCA	Ácido bicinónico
Cs-AMP	Péptido antimicrobiano de <i>Cynara scolymus</i>
CHCA	α -cyano-4hidroxy cinnamic acid (α -ciano-4-hidroxicinámico)
Da	Dalton
Dm-AMP	Péptido antimicrobiano de <i>Dalhia merckii</i>
DON	deoxinivalenol
DIEA	Dirección de estadísticas agropecuarias
EC	Extracto crudo
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiaminotetraacético)
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> entero patógena)
g	gramo
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	High performance liquid chromatograph (Cromatografía líquida de alta eficacia)
IMZ	Imazalil
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
IPM	Instituto Pasteur Montevideo
kDa	kilo Dalton
LDL	Low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad)
LL-37	Péptido antimicrobiano de humano
LSMEANS	Least squares means
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MASCOT	Programa de identificación de péptidos y proteínas
MBC	Minimal concentration bactericidal (Concentración mínima bactericida)
MFC	Minimal concentration fungicidal (Concentración mínima fungicida)
MIC	Minimal concentration inhibitory (Concentración mínimainhibitoria)
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
μM	Micro molar
M	Molar
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina)
MS	Mass spectrometry (Espectrometría de masas)

MW	Molecular weight (Masa molar molecular)
m/z	Relación masa carga
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (Nicotinamida adenina dinucleótido)
ns-LTPs	Non-specific lipid-transfer proteins (proteínas de transferencia de lípidos no específica)
PAGE	Polyacrilamide gel electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida)
PAM	Péptido antimicrobiano
PBS	Phosphate buffered saline (Tampon fosfato salino)
PDA	Potato Dextrose Agar (Agar papa dextrosa)
PDB	Potato Dextrose Broth (Agar papa caldo)
Pdb	Protein data bank
pH	Medida de acidez o alcalinidad de una solución
pI	Punto isoeléctrico
PMS	Peptide mass fingerprinting (Huella peptídica de masas)
PR	Proteína de resistencia en plantas
PR-39	Péptido antimicrobiano de cerdo
Pses	Péptido antimicrobiano de sintético, originado de péptidos de sésamo
ROS	Reactive oxygen species (Especies reactivas del oxígeno)
TFA	Trifluoroacetic acid (Ácido trifluoroacético)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dodecilsulfato sódico)
TOF	Time of fly (tiempo de vuelo)
Trx-Aq-AMP	Péptido antimicrobiano de Amaranthus quitesnis unido a Tiorredoxina
V	Volts
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
W	Masa de extracto o fracción enriquecida

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Estructuras representativas de péptidos antimicrobianos. (Extraída de Sakira 2012 con modificaciones).	21
Tabla 2. Ejemplos de péptidos antimicrobianos aislados de plantas.....	27
Tabla 3: Masa total (Mt) recuperada en cada una de las fracciones obtenidas.(% R).....	49
Tabla 4: Evaluación de la actividad antifungica en <i>F. oxysporum</i>	50
Tabla 5. Digestión tríplica teórica del péptido Dm-AMP 1 obtenida mediante el programa MASCOT.	59
Tabla 6. Actividad antimicrobiana de los péptidos evaluados frente a patógenos de interés agronómico y clínicos.	63
Tabla 7. Estabilidad frente a distintos pH de Pses y Trx-Aq-AMP. Se compara la actividad relativa al control sin tratamiento.	64
Tabla 8. Ensayo de estabilidad de Pses y Trx-Aq-AMP frente a distintas temperaturas. Se usaron los péptidos sin tratamiento como control. (+) mantiene inhibición, (-) pierde actividad	65
Tabla 9. Evaluación de los péptidos antimicrobianos a distintas concentraciones de sales inorgánicas: a) KCl; b) CaCl ₂	65
Tabla 10. Estabilidad frente a proteasas.	66
Tabla 11. Evaluación in vivo de la actividad de péptidos (TrxAq; Pses) tomando como referencia el fungicida de uso comercial Imazalil (IMZ). Las medias de los tratamientos fueron analizados mediante la estadística LSMEANS.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Los diversos mecanismos de acción propuestos para los péptidos antimicrobianos en las células microbianas. (A) Interrupción de la integridad de la membrana celular: (1) inserción aleatoria en la membrana, (2) alineación de secuencias hidrófobas, y (3) eliminación de secciones de membrana y formación de poros. (B) Inhibición de la síntesis de ADN. (C) Bloqueo de la síntesis de ARN. (D) Inhibición de las enzimas necesarias para la vinculación entre proteínas estructurales de la pared celular. (E) Inhibición de la función ribosomal y síntesis de proteínas. (F) Bloqueo de proteínas chaperonas necesarias para el correcto plegado de las proteínas. (G) Orientación de las mitocondrias: (1) inhibición de la respiración celular e inducción de la formación de ROS y (2) interrupción de la integridad de la membrana celular y mitocondrial, eflujo de ATP y NADH. Tomado de Peters 2010.....24

Figura 2. Imagen del modelado de una defensina vegetal (SPE10 de semillas *Pachyrrhizus erosus*), obtenida por rayos X y modelado molecular (código Pdb 3PSM). Se observan estructura estabilizadora de cisteínas α/β , formada por los cuatro puentes disulfuro (amarillo), la α -helice y las tres hojas β antiparalelas. 28

Figura 3. A) Planta de alcachofa, se observa la flor. B) Semillas de alcachofa, de donde se obtuvo el extracto activo 33

Figura 4. A) A lo largo del ecuador se realizan 4 heridas con un punzón estéril. B) Se inoculan 5 μ L de solución de conidios del hongo con el tratamiento correspondiente. C) Los frutos se colocan en cámara a 20 °C y 90 % humedad relativa, durante los 7 días siguientes a la inoculación, determinándose la aparición y número de los síntomas. 47

Figura 5. Estrategia de obtención de la fracción enriquecida en PAMs.....48

Figura 6. Ensayo de actividad antimicrobiana. (A) Imagen representativa del resultado obtenido en el ensayo de difusión en disco. (B) Imagen representativa del ensayo de microdilución en placa. Las muestras ensayadas fueron. A: Agua estéril, B: Extracto crudo (EC), C) pellet 1V, D) pellet 6V, E) Captan., todas ellas ensayadas a una concentración de proteínas de 0.5 mg/ml. ...50

Figura 7. Gel de SDS PAGE tricina al 10 % de los distintos pasos de purificación, Carril 1: Molecular weight low range (MWLR), Carril 2: 10 μ g de extracto crudo (EC), Carril 3: 2,5 μ g de extracto crudo (EC/4), Carril 4: 10 μ g pellet un volumen de acetona (1V), Carril 5: 2,5 μ g pellet un volumen de acetona (1V/4), Carril 6: 10 μ g pellet seis volúmenes de acetona (6V), Carril 7: 2,5 μ g pellet seis volúmenes de acetona (6V/4). 52

Figura 8. Cromatografía de intercambio catiónico en columna Mono S HR 5/5. El área entre las líneas punteadas indica la fracción activa (IC1) frente a *F. oxysporum*. 53

Figura 9. Cromatografía de fase reversa en columna C2C18. Las fracción 5 (F5), presentó 100 %I frente a <i>F. oxysporum</i> . La fracción 8 (F8) mostró un 45 % I.....	54
Figura 10. Bioensayo de las fracciones resultantes de la cromatografía de fase reversa C2C18 frente a <i>F. oxysporum</i> . La fracción 5 presenta 100% de inhibición y además resultó fungicida.	54
Figura 11. Geles de SDS PAGE Tricina 16 % de las fracciones de la corrida cromatográfica C2C18. a) tinción con Commassie de la fracción 5 (F5). b) tinción con plata de la fracción activa F5 y las fracciones pre y post pico de cromatografía.....	55
Figura 12 Espectro MALDI-TOF de la fracción activa. Se observa una señal mayoritaria con valor de m/z 5748,56.....	56
Figura. 13. Espectro de masas de la fracción activa CsAMP reducido, alquilado y digerido con tripsina.....	57
Figura 14. Secuencia aminoacídica de Dm-AMP 1, obtenida de Osborn 1995.....	59
Figura 15. Acercamiento de Figura 13. Se resalta el fragmento de m/z 1380, que coincide con el valor teórico de un fragmento tríptico de Dm- AMP.	60
Figura 16. Secuencia aminoacídica de Dm-AMP 1, obtenida de Osborn 1995. Se subraya en la Figura los fragmentos identificados, el N-terminal obtenido por degradación de EDMAN y el fragmento observado por digestión tríptica en espectrometría de masas.	60
Fig 17. Ensayo de hemólisis para los péptidos Trx-Aq-AMP, Pses y Melitina. Se usaron PBS y Triton 0,1 % como controles.	67
Fig 18 A) Ensayo de decaimiento en fruta, el Trx-AqPAM protege al 64 % de las heridas infectadas con <i>P. digitatum</i> . B) Ensayo al día 7, de izquierda a derecha control con agua, Trx-Aq-AMP 64 µM, Imazalil 1000 ppm. Las medias con igual letra (a, b, c) no difieren estadísticamente entre sí.....	69

INDICE

1 RESUMEN	12
1.1 Resumen	12
1.2 Abstract.....	13
2 INTRODUCCIÓN	14
2.1 Introducción general.....	14
2.2 Características generales de los patógenos empleados en el presente estudio.	15
2.2.1 <i>Penicillium</i> sp.....	16
2.2.2 <i>Fusarium</i> sp.....	17
2.2.3 <i>Alternaria</i> sp.	17
2.2.4 <i>Clavibacter</i> sp	18
2.2.5 <i>Pseudomonas</i> sp	19
2.2.6 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	19
2.2.7 <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente (MRSA).....	19
2.3 Péptidos Antimicrobianos (PAMs) de origen natural	20
2.4 Características funcionales de los PAMs	22
2.5 PAMs aislados de plantas	26
2.4.1 Defensinas.....	27
2.4.2 Proteínas de transferencia de lípidos no específica (non specific Lipid transfer protein, nsLPTs).....	29
2.4.3 Tioninas	30
2.4.4 Ciclotidos.....	30
2.4.5 Heveína y péptidos tipo heveína (Hevein like peptides)	30
2.4.6 Otras familias de PAMs vegetales	31
2.6 Estrategias de purificación de PAMs vegetales.....	31
2.7 Antecedentes antimicrobianos en Alcachofa (<i>Cynara scolymus</i>).....	32
2.8 Antecedentes de los péptidos evaluados AqAMP y Pses.	34
2.9 Péptidos antimicrobianos en protección vegetal.....	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo general:.....	36
3.2 Objetivos específicos:	36
4. MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1 Estrategia experimental para el cumplimiento del primer objetivo.	37

4.1.1. Obtención del extracto proteico crudo.....	37
4.1.2. Bioensayo.....	38
4.1.3. Cuantificación de proteínas.....	39
4.1.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida tricina (TRICINE-SDS-PAGE)	39
4.1.5. Purificación por cromatografía en HPLC	40
4.1.6. Espectrometría de masas.....	41
4.1.7. Secuenciación N- terminal de la molécula aislada.....	42
4.1.8. Búsqueda de secuencias similares a la molécula identificada	42
4.2. Estrategia experimental para el cumplimiento del segundo objetivo.....	42
4.2.1. Péptidos recombinante y sintéticos	42
4.2.2. Determinación de la mínima concentración inhibitoria y la mínima concentración fungicida/bactericida	43
4.2.3. Pruebas de estabilidad	44
4.2.3.1 pH	44
4.2.3.2 Temperatura	45
4.2.3.3 Proteasas.....	45
4.2.3.4 En presencia de sales	45
4.2.4 Hemólisis	45
4.2.5 Ensayo de decaimiento de frutas	46
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1 Resultados del primer objetivo.	48
5.1.1 Obtención de un extracto enriquecido de péptidos de bajo peso molecular de Cynara scolymus.	48
5.1.2 Ensayos de actividad antimicrobiana.	49
5.1.3 Evaluación por electroforesis de las fracciones obtenidas.....	51
5.1.4 Purificación de los péptidos activos	52
5.1.5 Identificación de la molécula activa purificada	55
5.2 Resultados del segundo objetivo.....	60
5.2.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de AqTrxAMP y Pses	60
5.2.2 Estabilidad.....	62
5.2.3 Ensayo de actividad Hemolítica.....	65
5.2.4 Ensayo de decaimiento en fruta	66
6 CONCLUSIONES.....	70
7 PERSPECTIVAS	71
8 BIBLIOGRAFÍA.....	72
9 ANEXOS	86
9.1 Anexo1: Identificación de proteínas por mapeo peptídico.....	86

9.2 Anexo2: Blastp de fragmento identificado en mapeo peptídica.	93
9.3 Anexo3: Secuenciación del N-terminal por degradación de Edman.	110
9.4 Anexo4: Blastp del fragmento identificado por degradación de Edman.	133

1 RESUMEN

1.1 Resumen

Los fitopatógenos causan importantes pérdidas en cultivos, disminuyendo su calidad, inocuidad y rendimiento. Actualmente, el control de los fitopatógenos se realiza principalmente con productos agroquímicos. Sin embargo, debido a los efectos negativos sobre la salud humana, el medio ambiente y desarrollo de resistencia de los patógenos, la utilización está cada vez más regulada, limitando considerablemente los compuestos que pueden ser aplicados. La creciente demanda de producción y la limitación en el uso de agroquímicos, justifican la búsqueda de nuevos compuestos activos y nuevas estrategias de control.

La inmunidad innata constituye la rama evolutivamente más antigua de los mecanismos de defensa de cualquier organismo. Entre sus diversos componentes, en la actualidad ha cobrado gran importancia el estudio de los péptidos antimicrobianos (PAMs). Una alternativa emergente, es la aplicación biotecnológica de PAMs en la agricultura.

La presente tesis consistió en la purificación cercana a homogeneidad de un péptido antimicrobiano de origen vegetal. Se logró obtener un PAM de la planta de alcachofa (*Cynara scolymus*), no reportado previamente, el cual presenta actividad antifúngica *in vitro* contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Paralelamente se llevó a cabo la puesta a punto y desarrollo de técnicas que permiten la valorización y caracterización biológica de PAMs. Por último la evaluación *in vivo* de dos PAMs en un sistema que emuló las condiciones de postcosecha de la cadena citrícola permitió identificar el PAM obtenido a partir de *Amaranthus quitensis* (Trx-Aq-AMP) como potencial fungicida biológico, el cual controló el 62% de las infecciones de *Penicillium digitatum*

Estos avances permiten proyectar la aplicación biotecnológica de PAMs en sistemas agrícolas.

1.2 Abstract

Plant pathogens are responsible for important losses in crop production, due to yield losses, low product quality and low product safety associated to pesticide residues. Nowadays, plant pathogens are managed by the use of agrochemicals. However, as a result of the negative effects on the human health, the environment and the development of pathogen resistances, their use is being restricted and the available active ingredients limited. The increasing demand of food and the need of new pesticides justify the search of new active ingredients and control strategies.

Innate immunity is considered one of the oldest evolutionarily branch of defense of any biological organisms. It comprises several compounds, among them the antimicrobial peptides (AMPs). Today, biotechnological studies of AMPs to develop new pesticides with agricultural purposes are a novel field of study.

This work deals with the purification to near homogeneity grade of an antimicrobial peptide originated from artichoke (*Cynara scolymus*) seed extracts. A no- reported AMP with activity against the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* was obtained. Also, efforts were done for the development of procedures to biologically characterize and to evaluate the activity in vitro/in vivo against pathogens.

Finally, the in vivo evaluation of two AMP in postharvest management of citrus highlighted the performance of Trx-Aq-AMP (obtained from *Amaranthus quitensis*) as a biological fungicide by controlling 62% of *Penicillium digitatum* infections in orange fruits. These results are promising for the development of biotechnological applications of AMPs under agricultural systems.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Introducción general

Las pérdidas económicas en cultivos y postcosecha debido a enfermedades causadas por patógenos vegetales en la agricultura y los inconvenientes en el tratamiento de enfermedades causados por microorganismos, es causa de preocupación tanto a nivel agrícola como a nivel de la salud humana. Una estimación de las pérdidas globales que se ocasionan en agricultura se estima en el orden del 35% de la producción anual por término medio, por un lado debido a factores abióticos (condiciones climatológicas y medioambientales) y por otro a factores bióticos, entre los que se encuentran los insectos y las enfermedades ocasionadas por agentes infecciosos (virus y viroides, bacterias y hongos, nematodos, protozoos o plantas superiores parásitas) (Agrios 1997). Específicamente los fitopatógenos son causantes del 16% de las pérdidas mundiales en la agricultura (Oerke 2006).

Las pérdidas en el rendimiento, y la disminución en la calidad e inocuidad de los productos agrícolas, han hecho que los productores tengan que recurrir al uso intensivo de pesticidas. Sin embargo, su uso prolongado, masivo y muchas veces descontrolado ha generado una serie de problemas como son la aparición de nuevas cepas de patógenos resistentes a la acción de los fungicidas. Además, se agrega el problema de la presencia de residuos en los frutos, con el consecuente incremento de los riesgos para la salud humana y el medio ambiente (Oerke 2006). Actualmente, uno de los principales desafíos que enfrenta la exportación de productos agrícolas en general, es el aumento en los mercados internacionales de la demanda de productos sin residuos de agroquímicos. Ante esta situación, se hace cada vez más evidente la necesidad de buscar nuevas alternativas de control que sustituyan o complementen a los pesticidas de una manera eficaz y segura tanto para el medio ambiente como para los consumidores, sin comprometer la calidad postcosecha de estos productos.

Los hongos fitopatógenos son los principales agentes infecciosos en plantas, causando alteraciones postcosecha, y problemas de calidad relacionados con el aspecto, valor nutricional, características organolépticas y conservación de frutas y hortalizas (Agrios 1997). Existe una gran variedad de géneros de hongos causantes de pérdidas tanto en el

campo durante el cultivo como en las posteriores etapas de recolección, almacenamiento y distribución, ya sea el órgano aprovechable, fruto, tallo, hojas, raíces o tubérculos de la planta (Agrios 1997). En frutas, estas enfermedades son ocasionadas por diversos hongos, entre los que se destacan los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. Además, en algunos casos, son indirectamente los responsables de trastornos patológicos, alérgicos o tóxicos en los consumidores debido a la producción de micotoxinas o alérgenos que contaminan los productos vegetales. En este sentido, dos son los ejemplos más representativos: determinadas especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* son capaces de originar intoxicaciones por patulinas (clariformina o leucipina, producidas por *P. expansum* o *P. griseofulvum*) o aflatoxinas (producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*) (Moss 2002; Peraica *et al* 1999).

Dado el impacto económico que la ocurrencia de hongos fitopatógenos tiene sobre la postcosecha, cualquier esfuerzo en la disminución de estas pérdidas redundará en beneficio de los productores, de la cadena agroalimentaria, del medio ambiente y de la sociedad en general.

Los métodos actuales de control de enfermedades en la agricultura están basados en el uso de productos de síntesis que en general son inespecíficos, generan problemas de resistencia en los microorganismos que se desean controlar, además de ser poco amigables con el medio ambiente y la salud. La investigación de enfoques alternativos para su control en ambos campos, es creciente y necesario. Esto lleva a la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana. Es deseable que estas moléculas posean ciertas características: que sean más activas (eficaces a dosis más bajas que las actuales), que presenten mayor especificidad (que no afecten a organismos no blanco), que no generen resistencia y sean biodegradables.

2.2 Características generales de los patógenos empleados en el presente estudio.

La elección de los patógenos en este trabajo se realizó primero en función de la importancia agronómica y de los daños potenciales que pueden causar en Uruguay, y luego se evaluaron patógenos de interés clínico.

Entre los fitopatógenos se evaluaron los hongos causantes de enfermedades de postcosecha de cítricos: *P. digitatum* y *P. italicum*. Además se evaluaron *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causante de fusariosis vascular en tomate y *Alternaria solani* que afecta entre otros al tomate durante el cultivo y en postcosecha. Además con el fin de evaluar la posible actividad antibacteriana, se incluyeron bacterias patógenas vegetales, *Clavibacter* sp. (cepa aislada de tomate), bacteria gram positiva que ocasiona podredumbre en hortalizas, *Pseudomona* sp. (cepa aislada de pera), bacteria gram negativa que ocasiona la necrosis de las yemas florales del peral (Cabrera *et al* 2007). Los patógenos de interés clínico evaluados fueron *Escherichia coli* entero patógena (EPEC) gram negativa, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) gram positiva, y *Candida albicans* (hongo levaduriforme),.

2.2.1 *Penicillium* .

P. digitatum es un deuteromiceto u hongo imperfecto cuya forma de reproducción es mediante esporas asexuales o conidios (Agrios 1997). Es el patógeno cuantitativamente más importante en la postcosecha de cítricos en todas las zonas productoras, causante de la podredumbre verde. Un aspecto relevante es que *P. digitatum* es un patógeno específico de frutos cítricos, no descrito en otros sistemas vegetales. Es un patógeno de herida que necesita pequeñas lesiones preexistentes en la piel para penetrar en el tejido vegetal. Los conidios están latentes en la superficie de los frutos hasta que encuentran una herida en la cutícula para penetrar y germinar. La contaminación por este hongo tiene lugar durante la recolección, transporte, confección y comercialización, aunque el inóculo mayoritario procede, en última instancia, del campo (Agrios 1997).

En nuestro país, la cadena citrícola es un rubro netamente exportador (150.000 ton; aproximadamente el 50% de la producción total), alcanzando cifras de 85.000.000 U\$S al año 2010 (DIEA 2011). El 95% de la fruta que exporta se destina al Mercado Europeo, uno de los más exigentes en cuanto a calidad se refiere. Se estima una pérdida anual debido a enfermedades de postcosecha por encima del 8% del volumen de exportación (comunicación personal F. Rivas, Director Programa Nacional de Citrus-INIA). El problema se agrava dado la existencia de biotipos resistentes de *P. digitatum*

y *P. italicum* a los fungicidas usualmente usados como son el Imazalil y el Tiabendazol (Lado *et al* 2010; Vero *et al* 2005)

En este trabajo, uno de los hongos evaluados es *P. digitatum* provenientes del programa de mejoramiento de INIA Salto Grande.

2.2.2 *Fusarium*.

El género *Fusarium* abarca diversas especies de hongos causante de múltiples enfermedades en vegetales y flores, plantas ornamentales y cultivos en campo. Las especies más representativas y conocidas son *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. solani* y *F. graminearum*. Esta última especie es uno de los mayores patógenos de trigo y cebada, ha sido muy estudiada a nivel molecular y su genoma está totalmente secuenciado y accesible en las bases de datos públicas (Goswami y Kistler 2004).

Uno de los cultivos de importancia agronómica en Uruguay afectado por el género *Fusarium*, es el trigo. La fusariosis de espiga ocasionada por *F. graminearum* se ha convertido en una de las enfermedades más importantes de los cereales de invierno debido al marcado incremento en incidencia y severidad en todo el mundo. Varias micotoxinas pueden ser producidas por los agentes causales de fusariosis de la espiga, de las cuales deoxinivalenol (DON) ha sido la que ha tomado mayor atención (Mazzilli *et al* 2007).

F. oxysporum es un grupo complejo de hongos que ataca un amplia gama de cultivos, produciendo marchitez vascular y podredumbre, causando grandes pérdidas. , Por ejemplo en el cultivo de tomate la especie *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* es responsable de la enfermedad “Marchitamiento vascular” que ocasiona severas pérdidas económicas (Agrios 1997).

2.2.3 *Alternaria*.

El género *Alternaria* es, después de las especies de *Cladosporium*, el moho cuyas esporas se encuentran suspendidas en el aire con mayor frecuencia. En los cultivos de cereales, las hojas y los granos son colonizados por especies de *Alternaria* y puede haber una penetración sub-epidérmica si toleran las aplicaciones de los fungicidas, por

lo que suelen ser aisladas de la mayoría de los granos en el momento de la cosecha (Agrios 1997).

Uno de los cultivos más importantes en nuestro país afectado por *Alternaria solani* es el de papa (*Solanum tuberosum*). El tizón temprano es después del tizón tardío (ocasionado por *Phytophthora infestans*), la enfermedad foliar más importante del cultivo de papa, se presenta con mayor incidencia en las zonas paperas ubicadas en regiones húmedas y cálidas de países como India, Uruguay, Brasil y del Caribe (Torres 2002). El hongo permanece en residuos de tejidos de hojas infectadas que se encuentran en el suelo, en tubérculos infectados y en otras solanáceas hospedantes. Los conidios del hongo germinan e ingresan directamente a las hojas de la planta a través de la epidermis. La infección se inicia en las hojas del tercio inferior de la planta y ocurre, a partir de los 45 días después de la siembra. En el campo, sin embargo, a veces se presenta sólo en la etapa de senescencia. Los tubérculos en desarrollo son susceptibles pero los tubérculos maduros son resistentes. El hongo ingresa a los tubérculos, generalmente a través de las heridas y aberturas naturales (Torres 2002).

Otro de los cultivos afectados por especies del género *Alternaria*., son los cítricos. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en Australia en 1903. En España, se ha detectado principalmente en la comunidad Valenciana, Huelva, y Murcia. Las variedades más afectadas son las mandarinas Fortune, Nova y el Tangelo Orlando. También es muy susceptible a la enfermedad, el estado de Florida, Estados Unidos. Esta enfermedad es relativamente nueva en Uruguay. Se la observó en frutas de Murcott, Fortune, Tangelo Orlando y en Nova, donde se realizaron aislamientos de este patógeno para identificarlo. En mandarina Fortune, es muy difícil controlarla cuando existe alta infección, aunque esta variedad no tiene importancia económica en la cadena citrícola uruguaya. Los problemas más graves fueron detectados en Nova en diferentes quintas de Salto y Paysandú (Bernal *et al* 2009).

2.2.4 *Clavibacter*

Es un actinomicete gram positivo, que se propaga a través del xilema y causa marchitez bacteriana y canchros (Gartemann *et al* 2003). Es el agente causal del cancro bacteriano

del tomate, una de de las enfermedades más importantes del cultivo en Uruguay (Maeso y Walasek 2012).

2.2.5 *Pseudomonas*

Los patovares de *Pseudomona syringae* son un grupo de bacterias gram negativas, que actúan como patógenos vegetales en un amplio rango de especies de plantas, existiendo más de 50 diferentes patovares (Agrios 1997). *P. syringae* pv. *syringae*. ha sido encontrado repetidamente asociado necrosis y mancha foliar en pera (*Pyrus communis*) causando pérdidas económicas a nivel mundial (Natalini *et al* 2006). *P. syringae* pv. *tomato* es particularmente perjudicial para las plantas de tomate, donde causa una enfermedad conocida como mancha bacteriana, disminuyendo el rendimiento de los cultivos mediante la inducción de la necrosis foliar o mancha en los frutos, produciendo pérdida de calidad, haciéndolos inadecuados para el mercado (Fanelli *et al* 2007).

2.2.6 *Escherichia coli* enteropatógena clásico (EPEC)

La bacteria gram negativa *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) es un virotipo diarreogénico importante y se asocia a episodios enfermedad diarreica aguda en niños menores de 5 años de Asia, África y Latinoamérica. Esta enfermedad es responsable de 12.000 muertes por día en niños de estas regiones. En Uruguay EPEC se confirma localmente como un enteropatógeno importante para niños pequeños usuarios del Centro Hospitalario Pereira Rossell que presentan diarrea aguda adquirida en la comunidad. (Varela *et al* 2007).

2.2.7 *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA)

El *S. aureus* es un microorganismo gran positivo, que se aísla con mayor frecuencia en infecciones de piel. Es un patógeno capaz de producir desde infecciones leves hasta otras con compromiso vital. Su protagonismo ha ido creciendo en los últimos años por la aparición de una nuevas cepas de *S. aureus* resistentes al antibiotico meticilina

(MRSA). Estudios confirman la presencia de cepas de MRSA en nuestro país (Bonino *et al* 2007).

2.3 Péptidos Antimicrobianos (PAMs) de origen natural

Los PAMs son moléculas efectoras de la inmunidad innata, un mecanismo de defensa conservado a lo largo de la evolución, presente desde procariotas hasta animales y plantas superiores. Son un grupo amplio de moléculas que contienen generalmente de 15 a 100 residuos de aminoácidos (< 10 kDa), en su gran mayoría son catiónicos a pH fisiológico y anfipáticos. Pueden presentar actividad antimicrobiana frente a diversos patógenos como bacterias gram positivas y gram negativas, micobacterias, hongos, levaduras, parásitos, protozoos, virus y células tumorales. (Broekaert *et al* 1997; Brogden 2005; Hancock y Sahl 2006; Zasloff 2002).

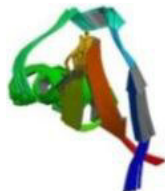
A nivel de estructuras, si bien no existe conservación aminoacídica, se pueden tomar determinados grupos estructurales de péptidos (Hancock y Chapple 1999). Básicamente los péptidos se pueden agrupar en péptidos lineales y los péptidos con puentes disulfuro (Boman 2003; Ganz 2003b; Sarika *et al* 2012). En la Tabla 1 se observan los motivos estructurales representativos, los orígenes y las actividades de los distintos grupos de PAMs.

Los péptidos lineales usualmente se dividen en los que forman α -hélices y los que están enriquecidos en determinados aminoácidos. Dentro de los primeros son ejemplos la melitina y cecropinas de insectos, magaininas y buforinas de anfibios, o la LL-37 de humanos (Tossi *et al* 2000). En los segundos encontramos los péptidos que contienen prolina (drosocina de drosófila y PR-39 de cerdo), péptidos que contienen triptófano incluyen indolicidina de bovinos, o los PAMs ricos en histidina como las histatinas de primates (Brogden 2005).

Los péptidos con puentes disulfuro, se suele subdividir a su vez en subgrupos en función del número de puentes disulfuro que posean, uno, dos, tres, o más de tres y la presencia de α -hélices y hojas- β . Pertenecen a este grupo las defensinas de animales,

plantas e insectos (Ganz 2003a). La alta presencia de residuos de cisteínas que forman puentes disulfuro intramoleculares, proporcionan estabilidad estructural y termodinámica a este tipo de moléculas (Broekaert *et al* 1997; Lay y Anderson 2005).

Tabla 1 Estructuras representativas de péptidos antimicrobianos. (Extraída de Sakira 2012 con modificaciones).

Estructura	Péptidos representativos	Fuente (especie y tejido)	Patógeno	Estructura 3D (con PDB ID)
4 puentes disulfuro Hélice α , hoja β	Defensinas de plantas Drosomicina	Plantas Hemolinfa de artrópodos	Hongo	 1TI5
3 puentes disulfuro Rico en hojas β	α defensinas β defensinas	Neutrofilos de vertebrados Epitelios de mamíferos	Bacteria, hongo, Virus	 1ZMM
3 puentes disulfuro Hélice α , hoja β	Defensinas de insectos	Hemolinfa de artrópodos Moluscos	Bacteria Gram +	 1ICA
3 puentes disulfuro 2 Hélice α , hoja β	γ Tioninas	Plantas	Bacteria, hongo, células mamíferos	 1IPT
2 puentes disulfuro Hoja β	Protegrinas Tachyplesinas,	Neutrofilos de cerdo Hemocitos	Bacteria, hongo, Virus	 1N5H

Hélice α	Cecropinas	Hemolinfa de insectos	Bacteria	 1F0F
	Magaininas, PGLa	Piel de anfibios		
	LL-37	Leucocitos de mamíferos		
Péptidos lineales con motivos repetidos	Bactenecinas, PR-39, indolicidina	Leucocitos de mamíferos	Bacteria	 1G8C
	Diptericina, apidaecina	Hemolinfa de insectos		

También se ha reportado actividad en fragmentos peptídicos, provenientes de proteínas de mayor peso molecular. Ejemplo de ello son la lactoferricina de lactoferrina, la casocidina I a partir de caseína humana, y dominios antimicrobianos en α -lactoalbúmina bovina (Brogden 2005; Marcos *et al* 2008).

2.4 Características funcionales de los PAMs

Si bien no existe un modo de acción único que explique la actividad antimicrobiana frente a distintos patógenos, todos los mecanismos propuestos se explican en base a las características intrínsecas de los PAMs y la interacción con membranas y/o macromoléculas de los microorganismos. En ciertos péptidos las propiedades estructurales permiten que el péptido se pliegue en una estructura anfipática en tres dimensiones, formando parches separados ricos en aminoácidos cargados positivamente e hidrofóbicos, que con frecuencia al entrar en contacto con las membranas interaccionan de diversas formas (Peters *et al* 2010; Shai 1999; Thevissen *et al* 2007).

La naturaleza catiónica de los PAMs vegetales conlleva una atracción electrostática por las moléculas y/o componentes con carga negativa presentes en las envolturas celulares, como en el caso del lipopolisacárido, de bacterias gram negativas, ácidos teicoicos y lipoteicoicos de bacterias gram positivas, o de las glicoproteínas y glicoesfingolípidos

de las paredes fúngicas (Brogden 2005). De hecho, esta es una razón plausible para la especificidad de algunos PAMs frente a microorganismos y ausencia de toxicidad frente a células de animales y plantas (Larrañaga *et al* 2012). Una vez se ha producido la interacción del péptido con el microorganismo, se puede producir una serie de efectos y cambios dinámicos que afectan la morfología e integridad de la membrana, y en última instancia se ve afectada la viabilidad de la célula (Brogden 2005; Hancock y Sahl 2006) (Figura 1).

Sin embargo, estos efectos no son los únicos mecanismos de muerte celular inducida por PAMs, ya que algunos péptidos matan a los microorganismos sin producir disrupción de la membrana. En este tipo de mecanismo los péptidos interactúan inicialmente con la superficie polianiónica de la membrana del patógeno, causando alteraciones (permanentes o instantáneas) en la integridad de la membrana, como ser, formación de poros de corta duración, o interacción con moléculas propias de la membrana. Por ejemplo, el péptido PR-39 interacciona con el transportador tipo permeasa de la membrana interna de bacterias (Nicolas 2009), las defensinas vegetales se unen a los esfingolípidos de hongos (Aerts *et al* 2008). Una vez que los péptidos ingresan a la célula, pueden tener como blanco de acción, macromoléculas celulares (ADN, ARN, proteínas, etc.), provocando diversos efectos en los patógenos. Ejemplos de estos son la interferencia con las rutas biosintéticas del patógeno (alterando la biosíntesis de la pared y membrana celular, del ADN, ARN, proteínas estructurales y enzimas, etc.), bloqueando chaperonas necesarias para el correcto plegamiento de proteínas, alterando el balance de ATP y NADH, fomentando la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS), induciendo la apoptosis, etc. (Aerts *et al* 2009; Marcos *et al* 2008; Nicolas 2009; Peters *et al* 2010; Thevissen *et al* 2007) (Figura 1).

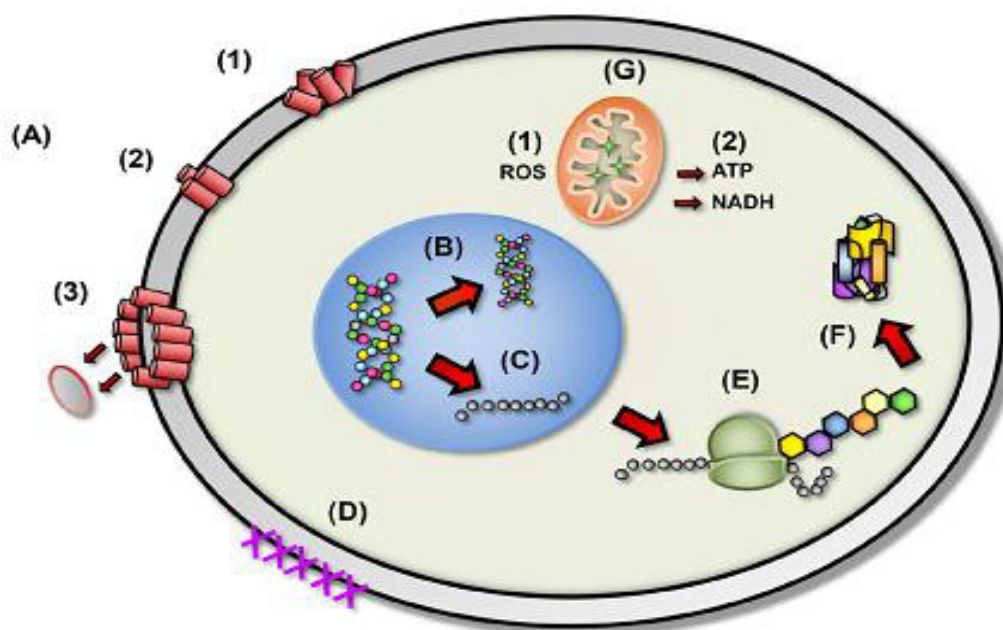


Figura 1. Los diversos mecanismos de acción propuestos para los péptidos antimicrobianos en las células microbianas. (A) Interrupción de la integridad de la membrana celular: (1) inserción aleatoria en la membrana, (2) alineación de secuencias hidrófobas, y (3) eliminación de secciones de membrana y formación de poros. (B) Inhibición de la síntesis de ADN. (C) Bloqueo de la síntesis de ARN. (D) Inhibición de las enzimas necesarias para la vinculación entre proteínas estructurales de la pared celular. (E) Inhibición de la función ribosomal y síntesis de proteínas. (F) Bloqueo de proteínas chaperonas necesarias para el correcto plegado de las proteínas. (G) Orientación de las mitocondrias: (1) inhibición de la respiración celular e inducción de la formación de ROS y (2) interrupción de la integridad de la membrana celular y mitocondrial, eflujo de ATP y NADH. Tomado de Peters *et al* 2010.

En mamíferos, se ha demostrado que algunos péptidos antimicrobianos tienen un número de funciones inmunomodulatorias, incluyendo la alteración de genes del hospedero, son capaces de actuar como quimiocinas y/o inducir la producción de quimiocinas, inhibir la formación de lipopolisacáridos, inducir la producción de citoquinas proinflamatorias, promover la cicatrización de heridas, modular las respuestas de las células dendríticas, monocitos, neutrófilos, e incluso de las células de la respuesta inmune adaptativa (células T). Los modelos en animales indican que los péptidos de defensa del huésped son cruciales para la prevención y eliminación de la infección (Bowdish *et al* 2005; Nijnik y Hancock 2009).

Conocer el modo de acción de los péptidos antimicrobianos es de gran importancia para desarrollar nuevas estrategias de control de patógenos vegetales y el desarrollo de nuevos fármacos en el área clínica, ya que a partir del conocimiento del modo de acción se puede optimizar la actividad o intentar corregir las posibles limitantes.

Dado que, como se menciona anteriormente, la actividad antimicrobiana de los PAMs, independientemente del modo de acción que empleen, está relacionada con cualidades propias de la molécula (carga, hidrofobicidad, estructura, etc) y estas se ven afectadas por las condiciones del entorno, es importante determinar la actividad antimicrobiana en distintas condiciones experimentales, como ser variaciones del pH, temperatura, distintas concentraciones de iones y estabilidad frente a proteasas.

Una propiedad que presentan ciertos PAMs y que los hacen extremadamente atractivos para moléculas de uso biotecnológico es que no son tóxicos frente a células de mamíferos o plantas. La base para esta selectividad parece estar relacionado con la composición lipídica de la membrana diana (fluidez, carga negativa, y ausencia / presencia de colesterol), y la posesión, por el organismo microbiano, de un potencial transmembrana negativo; (Nicolas 2009). La carga negativa de una membrana externa bacteriana es un ejemplo de un blanco de acción típico para los PAMs. Por el contrario, las membranas bipolares que se encuentran comúnmente en plantas y animales no son normalmente accesibles a los PAMs (Larrañaga *et al* 2012; Matsuzaki 2009; Zasloff 2002). Por otra parte, la presencia de colesterol en la membrana puede por lo general reducir la actividad de los PAMs, ya que el colesterol ayuda en la estabilización de la bicapa lipídica, reduciendo de este modo la fluidez y la flexibilidad de la membrana (Matsuzaki 2009). Los ensayos de hemólisis de eritrocitos animales así como ensayos de toxicidad en polen o protoplastos en vegetales, permiten realizar una aproximación primaria de la posible toxicidad del PAM evaluado como agente de control.

Una vez que una molécula presenta actividad “*in vitro*” es necesario validar sus cualidades mediante estudios “*in vivo*”, de manera de verificar la capacidad inhibitoria y/o microbica de estas moléculas así como su capacidad de inhibición de lesiones en diferentes órganos de las plantas (fruto, hoja, etc.) y/o tejidos animales..

El estudio de estas características, es necesario para determinar la posible aplicación de los PAMs como agentes de control de crecimiento de microorganismos patógenos. Para iniciar el desarrollo de un posible compuesto biotecnológico ya sea de uso animal o vegetal se debe explotar su potencial y conocer las bases científicas de su modo de acción, estabilidad, inocuidad, entre otros.

2.5 PAMs aislados de plantas

Aunque se estima que existen entre 250.000 y 500.000 especies de plantas, sólo en algunas han sido estudiados péptidos con actividad antimicrobiana. El potencial comercial de los compuestos antifúngicos producidos en planta sigue siendo en gran parte inexplorado (De Lucca *et al* 2005).

Si bien las plantas carecen de un sistema inmunológico propiamente dicho, producen una serie de proteínas constitutivas y/o en respuesta a la infección microbiana (defensa inducida), para complementar las barreras estructurales y bioquímicas a la infección microbiana (Broekaert *et al* 1997; García Olmedo *et al* 1998; Selitrennikoff 2001). Las distintas clases de péptidos antimicrobianos se agrupan en base a homología de secuencia aminoacídica, difieren en tamaño y estructura y se encuentran en todos los órganos vegetales, siendo su concentración mayor en semillas. Los péptidos antifúngicos (Tabla 2) incluyen las α -defensinas, las proteínas de transferencia de lípidos (ns-LTPs), tioninas, los ciclopéptidos, péptidos del tipo heveína y otros grupos de péptidos únicos (Tabla 2) (Broekaert *et al* 1997; García Olmedo *et al* 1998). Varias de estas familias de péptidos (defensinas, ns-LTPs, y tioninas) se clasifican dentro de las proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR). Las proteínas PR se definen como proteínas genéticamente codificadas por la planta huésped, pero se producen sólo cuando ocurre inducción específica en situaciones patológicas o relacionadas, y pueden o no tener propiedades para el control de los patógenos (van Loon *et al* 2006; van Loon y van Strien 1999).

Tabla 2. Ejemplos de péptidos antimicrobianos aislados de plantas.

Familia	Péptido	Planta	Referencia
Defensinas	Dm-AMP1	<i>Dalhia merckii</i>	Osborn 1995
ns-LPTs	Ace-AMP1	<i>Allium cepa</i>	Cammue 1995
Tioninas	Viscotoxina	<i>Viscum album</i>	Giudici 2006
Ciclótidos	Hypa A	<i>Hybanthus parviflorus</i>	Broussalis 2001
Péptidos tipo heveína	Ac-AMP1	<i>Amaranthus caudatus</i>	Broekaert 1992
Otras familias	Mj-AMP	<i>Mirabilis jalapa</i>	Cammue 1992

Se ha observado que el aumento de los niveles de ciertos péptidos antimicrobianos, ya sea a través de la sobreexpresión de los genes correspondientes o por tratamientos exógenos apropiados, dan como resultado una mayor resistencia a patógenos particulares (Epple *et al* 1997; Hoshikawa *et al* 2012; Jha y Chattoo 2009).

Una característica de estos péptidos es su alto contenido en cisteínas y puentes disulfuro, que unido a su pequeño tamaño hacen que su estructura sea muy compacta y estable. La frecuente presencia de múltiples puentes de disulfuro en PAMs se cree que es debido a que proporciona resistencia a la digestión proteolítica por las proteasas del patógeno (Steffen *et al* 2006).

2.4.1 Defensinas

Las defensinas se encuentran presentes en las semillas u hojas, son un grupo de péptidos básicos, de aproximadamente 4-5 kDa (entre 45 y 54 aminoácidos) (Broekaert *et al* 1995). Pertenecen al grupo PR-12 (van Loon *et al* 2006). Presentan al menos ocho cisteínas conservadas que forman un patrón de plegamiento tridimensional característico e invariante, que estabiliza la molécula (Figura 2). Este patrón llamado estructura estabilizadora de cisteínas α/β (cysteine stablized α/β structure; CS α/β), está formado por ocho cisteínas unidas por puentes disulfuro intramoleculares, una triple hoja β antiparalela y con una sola α -hélice. A pesar de su similitud estructural y de que muestran una clara aunque relativamente limitada conservación de secuencia aminoacídica, las defensinas vegetales son altamente diversas (Osborn *et al* 1995; Thevissen *et al* 2007; Thomma *et al* 2002).



Figura 2. Imagen del modelado de una defensina vegetal (SPE10 de semillas *Pachyrrhizus erosus*), obtenida por rayos X y modelado molecular (código Pdb 3PSM). Se observa la estructura estabilizadora de cisteínas α/β formada por los cuatro puentes disulfuro (amarillo), la α -helice y las tres hojas β antiparalelas.

Las defensinas de plantas comparten propiedades estructurales y funcionales con las defensinas de mamíferos e insectos (Broekaert *et al* 1995; Thevissen *et al* 2004). La conservación filogenética como parte del sistema inmune innato de plantas, vertebrados e invertebrados, sugiere que son un grupo muy antiguo y posiblemente originado antes de la divergencia entre plantas y animales (Thevissen *et al* 2004; Thomma *et al* 2002). Se pueden agrupar en 4 subfamilias en función de su secuencia de aminoácidos (García Olmedo *et al* 1998). Inhiben el crecimiento *in vitro* de un número importante de microorganismos, sin ser tóxicas para células de mamíferos ni de plantas. Observaciones *in planta* apoyan el papel protector de las defensinas. Representan el 30% de las proteínas liberadas durante la germinación de semillas y se inducen por distintas moléculas reguladoras de la respuesta SAR (Respuesta Sistémica Adquirida) así como por ataque de hongos fitopatógenos (Broekaert *et al* 1997).

Estos péptidos, actúan aparentemente en la etapa temprana de desarrollo de hifas del patógeno. Las defensinas Hs-AFP1 (aislada de *Heuchera sanguinea*) y Rs-AFP2 (aislada de *Raphanus sativus*) son letales para la germinación de los conidios, pero no lo son con conidios sin germinar de *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*, lo que indicaría hifas en estadio temprano de desarrollo tienen sitios de unión para estas defensinas, no así los conidios latentes (De Lucca y Walsh 1999). La actividad de las defensinas de plantas se reduce por un aumento en la fuerza iónica, especialmente por cationes divalentes (Broekaert *et al* 1997; Osborn *et al* 1995; Terras *et al* 1992b) los cuales podrían competir por los sitios de interacción.

Las defensinas se localizan preferentemente en las capas de células periféricas y también se han reportado en el xilema, en las células de estomas y en las células que revisten la cavidad subestomática, todos los cuales son lugares en los que el primer contacto y la entrada de los patógenos tienen lugar (Broekaert *et al* 1997).

Ejemplos de defensinas son Dm-AMP1 de *Dhalia merckii* (Osborn *et al* 1995), Rs-AFP2 de *Raphanus sativus* (Terras *et al* 1992b), Na-D1 de *Nicotiana glauca* (Lay *et al* 2003), SPE10 de *Pachyrrhizus erosus* (Song *et al* 2004).

2.4.2 Proteínas de transferencia de lípidos no específica (non specific Lipid transfer proteins, nsLTPs)

Las ns-LTPs tienen la capacidad de transferir fosfolípidos a través de las membranas. Son de mayor tamaño (~ 10 kDa, 90-95 aa), tienen actividad antimicrobiana *in vitro*, sin embargo, su función biológica no está tan clara. Inicialmente se relacionaron con el transporte de lípidos entre orgánulos o la biosíntesis de cutina; pero también han sido implicadas en defensa vegetal (Kader 1996). Tienen como característica la presencia de 8 cisteínas unidas por 4 puentes disulfuro, un alto pI (~9) y la ausencia de triptófano (García Olmedo *et al* 1998; Kader 1996; Yeats y Rose 2008). En general muestran una baja similaridad de secuencia aminoacídica (aproximadamente el 30% de identidad de secuencia). Ejemplos de esta familia son el Ace-AMP de *Allium cepa* (Cammue *et al* 1995), el Cw18 de cebada (*Hordeum vulgare*) (Molina *et al* 1993) o el ns-LTP de semillas de rábano (*Raphanus sativus* L) (Terras *et al* 1992a).

2.4.3 Tioninas

Las tioninas constituyen una familia de péptidos básicos, con peso molecular bajo (~ 5 kDa, ~ 45 aminoácidos), rico en residuos básicos (arginina, lisina) y cisteínas. La secuencia aminoacídica está muy conservada, y su estructura tridimensional es similar a la letra griega gamma mayúscula. Las tioninas pueden clasificarse en al menos 5 tipos distintos en función de la homología de su secuencia y del número de puentes disulfuro (2, 3 ó 4) (Broekaert *et al* 1997; García Olmedo *et al* 1998). Las tioninas tienen actividad *in vitro* frente a bacterias y hongos fitopatógenos, cultivos celulares eucariotas (tanto líneas celulares de mamíferos, como protoplastos de plantas). Se ha observado toxicidad en mamíferos e insectos al ser inyectados, pero no al ser administrados por vía oral (Broekaert *et al* 1997; Castro y Fontes 2005). Ejemplos de esta familia son la viscotoxinas de *Viscum album* (muérdago europeo) (Giudici *et al* 2006), la purotionina aislada de semillas de trigo (Fernández De Caleyra *et al* 1972) y la Cp-thionin II del poroto tape (*Vigna unguiculata*) (Franco *et al* 2006).

2.4.4 Ciclotidos

Los ciclotidos son la mayor familia conocida de péptidos circulares (Daly *et al* 2009). Presentan aproximadamente de 28 a 37 aminoácidos (~ 3 kDa), entre ellos seis residuos de cisteína conservados que están vinculados en pares para formar tres enlaces disulfuro. Los ciclotidos están conformados por un esqueleto cíclico, formado por una periodicidad continua de uniones peptídicas. Ejemplos de esta familia son Circulina A de *Chassalia parvifolia* (Gustafson *et al* 1994), el Hypa A de *Hybanthus parviflorus* (Broussalis *et al* 2001).

2.4.5 Heveína y péptidos tipo heveína (*Hevein like peptides*)

La heveína, es una molécula de 4,7 kDa, tiene 6 cisteínas y se une a quitina, fue aislada del látex del árbol de goma (*Hevea brasiliensis*) y presenta leve actividad antifúngica (van Parijs *et al* 1991). Los péptidos tipo heveína, (llamados también péptidos de unión a quitina), son más pequeños, mantienen la unión a quitina y presentan una mayor

actividad frente a diversos patógenos. Ejemplos son el Ac-AMP1 y Ac-AMP2 de *Amaranthus caudatus*, (Broekaert *et al* 1992), el IWF4 de hojas *Beta vulgaris*, (Nielsen *et al* 1997) y los análogos a heveína, Pn-AMP1 and Pn-AMP2 de *Pharbitis nil* (Koo *et al* 1998).

2.4.6 Otras familias de PAMs vegetales

Otros péptidos antimicrobianos descritos incluyen las knotinas que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos (García Olmedo *et al* 1998), la familia de las snakinas, identificada inicialmente en tubérculos de papa (Berrocal-Lobo *et al* 2002), o las puroindolinas con actividad antifúngica, relacionadas con las LTPs y tioninas (Dubreil *et al* 1998). Entre estos péptidos hay un gran número aislados de semillas, por ejemplo de *Impatiens balsamina* (Ib-AMP) (Tailor *et al* 1997), de *Mirabilis jalapa* (Mj-AMP) (Cammue *et al* 1992), o de melón (*Cucumis melo* L.) (Ribeiro *et al* 2007).

2.6 Estrategias de purificación de PAMs vegetales

Si bien no existe una estrategia única para aislar PAMs de origen vegetal, la mayoría de las veces se utilizan características mencionadas anteriormente que comparten en general y que por ende son esperadas en los PAMs de plantas. La mayoría de ellos se basan en las propiedades fisicoquímicas intrínsecas de los péptidos, como son su bajo peso molecular, la cationicidad (la carga positiva neta), la anfipaticidad (presentan tanto regiones hidrofílicas como hidrofóbicas), la tolerancia a los ácidos y disolventes orgánicos, y su estabilidad térmica. (Osborn *et al* 1995; Terras *et al* 1992a).

En cuanto al tampón de extracción la mayoría de los autores utilizan tampones ácidos, se usa tanto ácidos inorgánicos por ejemplo ácido clorhídrico 0.1% v/v, como ácidos orgánicos por ejemplo ácido acético al 10% v/v (Lipkin *et al* 2005; Pelegriani *et al* 2006; Scopes 1994; Wilson y Walker 1994)

Una vez obtenido el extracto se realiza la precipitación de proteínas y péptidos. Esta se realiza generalmente al agregar sales aumentando la saturación relativa por ejemplo sulfato de amonio o mediante la adición de solventes orgánicos como en el caso de la precipitación con acetona (Broekaert *et al* 1992; Lipkin *et al* 2005; Scopes 1994; Wilson y Walker 1994)

Posteriormente se puede emplear una o la combinación de diversas técnicas cromatográficas, como son exclusión molecular, intercambio catiónico y fase reversa -l (Lay *et al* 2003; Pelegrini *et al* 2006) (Osborn *et al* 1995).

2.7 Antecedentes antimicrobianos en Alcachofa (*Cynara scolymus*)

La alcachofa (*Cynara scolymus*) (Figura 3) pertenece a la familia Asteraceae, es un componente importante de la dieta mediterránea. Es una planta medicinal de amplio uso popular, conocida por sus propiedades nutricionales y curativas debido a la presencia de moléculas con actividades antioxidantes y antimicrobianas. Desde hace años, en medicina popular, se utilizan partes y/o extractos de *C. scolymus* como, astringente, limpiador de la sangre, cardiotónico, desintoxicante, estimulante digestivo, diurético, hipoglucemiante, hipocolesterolémico, así como para el tratamiento de enfermedades del hígado (Lattanzio *et al* 2009). Por otra parte, extractos de hojas de alcachofa demostraron tener efectos hepatoprotectores, anticancerígenos, antioxidantes, antiinflamatorios, antibacterianos, anti VIH, así como la capacidad de inhibir la biosíntesis de colesterol y la oxidación de LDL (Bundy *et al* 2008; Lattanzio *et al* 2009; Vamanu *et al* 2011). Estas funciones terapéuticas variables no se pueden atribuir a un único compuesto activo; sin embargo, podría ser debido a la presencia de varios componentes bioactivos que generan efectos farmacológicos sinérgicos (Lattanzio *et al* 2009).

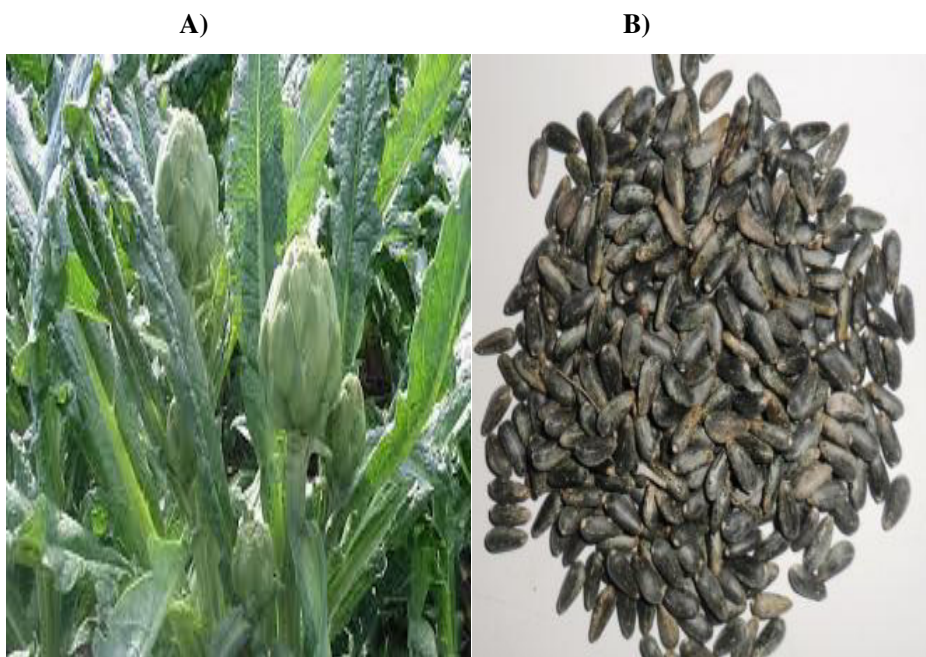


Figura 3. A) Planta de alcachofa, se observa la flor. B) Semillas de alcachofa, de donde se obtuvo el extracto activo.

Los extractos crudos vegetales como mezcla de compuestos activos y no activos pueden tener efecto en microorganismos, por lo que es posible determinar valores de concentración mínima inhibitoria (minimal inhibitory concentration, MIC) y considerándose que valores menores a 100 $\mu\text{g/mL}$ sugieren una buena actividad (Díaz Dellavalle *et al* 2011; Webster *et al* 2008).

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se obtuvieron extractos crudos de diferentes especies vegetales (Cabrera 2010; Díaz Dellavalle *et al* 2011) que controlaron *in vitro* diversos patógenos fúngicos. De los extractos evaluados, se seleccionó para este trabajo de Maestría el extracto de *C. scolymus* por tener buena actividad antifúngica frente a los tres patógenos evaluados *P. digitatum*, *F. oxysporum* y *A. solani*, ser un extracto no viscoso en tampones ensayados facilitando pasos posteriores de purificación y, lo principal, no estar reportado a la fecha la presencia de péptidos antimicrobianos para esta especie en las diversas base de datos de péptidos antimicrobianos (<http://phytamp.pfba-lab-tun.org/search.php> (Hammami *et al* 2009) y <http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial/simple.html> (Thomas *et al* 2010)).

2.8 Antecedentes de los péptidos evaluados AqAMP y Pses.

El péptido natural aislado de *Amaranthus quitensis* (Aq-AMP), es análogo al péptido Ac-AMP (VGECVRGRCPSPGMCCSQFGYCGKGPKYCGR) reportado por Broekaert (1992), presentando actividad previa frente a *P. digitatum*, *F. oxysporum* y *A. solani* (Díaz Dellavalle no publicado). Esta molécula presenta además cualidades a tener en cuenta en una posible aplicación biotecnológica como son la estabilidad explicada por la presencia de puentes disulfuros y la inocuidad frente a células de mamíferos y plantas (Broekaert *et al* 1992). En trabajo realizado en colaboración con el Instituto Pasteur de Montevideo, se logró expresar el péptido unido a la proteína de fusión Tiorredoxina (Trx). La Trx es una de las proteínas de fusión utilizadas en producción de PAMs recombinantes, dado que ayuda a solubilizar los PAMs (a través de generar un entorno donde se forman los puentes disulfuro) y al ser una proteína peso molecular de 11.8 kDa, el cual es relativamente bajo si se lo compara con otras proteínas de fusión (Li 2011). Aunque no se logró obtener el péptido puro de igual modo se ensayó la molécula quimérica existiendo antecedentes de uso en otras moléculas quiméricas, manteniendo su actividad (Oppezzo, Unidad Rroteínas Recombinantes IPM, Comunicación personal.; Wu *et al* 2011). En este trabajo al ser Trx-Aq-AMP una molécula quimérica de la cual no se dispone de información y fundamentalmente no se conocen las posibles interacciones o sinergias con la Tiorredoxina, se estudió su estabilidad e inocuidad.

Pses es un fragmento sintético de 20 aminoácidos derivado de los péptidos catiónicos de sésamo (*Sesamum indicum*) AMP-SiW y AMP-SiB (Costa *et al* 2007), desarrollado por el Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, FIOCRUZ, Brasil. Este había mostrado actividad antifúngica *in vitro* frente a diversos patógenos entre ellos *P. digitatum*, *F. oxysporum* y *A. solani* (Larrañaga *et al* 2012).

La Melitina se eligió como control al ser un PAM activo frente a hongos, bacterias y además de ser hemolítico (Muñoz *et al* 2006).

2.9 Péptidos antimicrobianos en protección vegetal.

Aunque existe variada bibliografía en cuanto a la utilización de PAMs en protección vegetal frente a hongos fitopatógenos, la mayoría de los casos se trata de estudios *in vitro*, obviando diversos factores ambientales que pueden influir en el control del patógeno.

Un factor nada menor a tener en cuenta, es la capacidad y el costo de producción de PAMs. La síntesis química de PAMs aunque ha bajado su costo, sigue siendo prohibitiva para el uso de estas moléculas *in vivo*. La producción heteróloga de PAMs en bacterias y levaduras es cada vez más efectiva y económica (Bommarius *et al* 2010; Capparelli *et al* 2006; Kovalskaya y Hammond 2009; Li *et al* 2005; Wu *et al* 2011). Se ha usado una levadura como portadora de PAMs en control biológico en postcosecha de manzana y tomates (Janisiewicz *et al* 2008; Jones y Prusky 2002), también se ha planteado el uso de plantas transgénicas para usar directamente como cultivos o para producir PAMs en grandes cantidades (granjas moleculares, “molecular farming”) para la purificación y uso en distintas etapas de la producción vegetal (Lico *et al* 2012; Morassutti *et al* 2002; Swathi Anuradha *et al* 2008).

Dependiendo de las características del patógeno a evaluar y de las características propias del cultivo, el momento y el lugar de aplicación del agente de control varían, así como la vía de aplicación.

Se han realizado ensayos de co-inoculación del patógeno y de los péptidos antimicrobianos sobre tejidos vegetales susceptibles. En este tipo de ensayos se ponen simultáneamente el agente de control y el microorganismo patógeno simulando las condiciones que existen *in vivo*. Los más utilizados han sido hojas o discos de hojas de plantas de papa y tomate (Ali y Reddy 2000; Wu *et al* 2011), en frutos de cítricos y tomate (Jones y Prusky 2002; López-García 2003; Muñoz *et al* 2007) o tubérculos de papa (Ali y Reddy 2000). En general, se ha demostrado una disminución en el progreso de la enfermedad, lo que se correlaciona con los resultados *in vitro*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

El objetivo general de esta Tesis de Maestría en Biotecnología fue la purificación, caracterización y evaluación del uso de péptidos antimicrobianos de origen vegetal como alternativa y/o complemento a fungicidas y bactericidas de origen químico.

3.2 Objetivos específicos:

Objetivo Específico 1: Aislar y purificar un péptido de *Cynara scolymus* y evaluar su posible actividad antimicrobiana.

Objetivo Específico 2: Puesta a punto de un método de evaluación de la actividad antifúngica y antibacteriana, estabilidad e inocuidad del péptido recombinante Trx-Aq-AMP. y del péptido sintético Pses.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia experimental para el cumplimiento del primer objetivo.

4.1.1. Obtención del extracto proteico crudo

Las semillas de *C. scolymus* fueron colectadas durante el mes de marzo del año 2008, en la estación experimental Wilson Ferreira Aldunate, INIA Las Brujas (Canelones), gentileza de Richard Asfield y Juan José Villamil. Se desinfectaron en 200 ppm (partes por millón) de NaOCl durante 5 minutos, fueron secadas en estufa a 40 °C, se congelaron a -20 °C y/o en nitrógeno líquido. Una vez congeladas se procesaron en un molinillo hasta obtener una harina homogénea.

100 g de harina se mezclaron con una solución de NaCl 0.6 M y HCl 0.1 % (1:5, p/v), a 4 °C durante 2 horas (Pelegrini *et al* 2006). El extracto crudo (EC) se centrifugó a 7000 g, 4 °C durante 20 minutos, se descartó el pellet y el sobrenadante fue sometido a dos pasos de precipitación con acetona; el primero con 1 volumen de acetona (2 horas a 4 °C) para eliminar las proteínas de mayor peso molecular y otros compuestos, posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 15000 g (4 °C); el segundo con 6 volúmenes de acetona durante toda la noche a 4 °C donde precipita el resto de las proteínas y péptidos, posteriormente se centrifugó a 15000 g (4 °C), 15 minutos, hasta clarificar (Lipkin *et al* 2005; Scopes 1994). Los pellet así obtenidos fueron definidos como pellet 1V y pellet 6V respectivamente.

Los pellets se resuspendieron en agua ultrapura y se esterilizó por filtración con membrana Durapore 0.22 µm (Millipore, SP., Brasil), se dializó para desalar con membranas Spectra/Por de corte de 2 kDa (Spectrum Labs, CA., EEUU) en agua destilada y se liofilizó (Labconco freeze dry system/freezone 4.5, MO, EEUU). Los liofilizados se conservaron a temperatura ambiente hasta la realización de los ensayos de actividad antimicrobiana, cuantificación proteica y análisis en geles de poliacrilamida. Las fracciones resuspendidas fueron almacenadas a -20 °C. El

procedimiento se realizó numerosas veces en función del material necesario para los diferentes ensayos.

El % rendimiento (% R) de todos los extractos secos se calculó como:

$\% R = (W1 * 100) / W2$, siendo W1 la masa del extracto/fracción después del proceso de purificación y W2 la masa del paso anterior de la purificación.

4.1.2. Bioensayo

La actividad antifúngica en las fracciones obtenidas fue determinada mediante ensayo de difusión en disco (Bauer *et al* 1966; Roberts y Selitrennikoff 1988) y/o un método cuantitativo microespectrofotométrico automatizado en microplacas (Broekaert *et al* 1990). En ambos ensayos se utilizó como patógeno a evaluar *F. oxysporum*.

Para el ensayo de difusión en disco, 2×10^3 esporas del inóculo suspendidas en 100 μ L de agua estéril se dispersaron de manera uniforme sobre la superficie de placas de 9 cm de diámetro Agar Papa dextroxa (Potato Dextrose Agar, PDA). A continuación, se colocaron en la placa discos de papel Whatman de 0.5 cm de diámetro, y se cargaron con 40 μ L de extracto/fracción, empleándose agua estéril como control. Se incubaron las placas a 24 °C durante 48 horas. La actividad fue evaluada visualmente mediante halo de inhibición (presencia/ausencia).

En el caso del ensayo en microplaca, se monitoreó el crecimiento del hongo mediante medidas de turbidez a una longitud de onda 595 nm (Multiscan FC - ThermoScientific). En cada uno de los pocillos de las microplacas se colocaron 50 μ L de Caldo Papa Dextrosa (PDB, Potato Dextrose Broth) (HiMedia, Mumbai, India) con 2×10^4 esp/mL del hongo a evaluar y 50 μ L de fracción. Se agitaron y luego se dejaron en reposo durante 30 minutos a 24 °C; luego de este tiempo se leyó la absorbancia (Abs0). Pasadas las 48 horas de incubación, se leyó nuevamente la absorbancia (Abs48). La absorbancia corregida (AbsC) se obtuvo por la diferencia entre las dos medidas (AbsC= Abs48 - Abs0). Se utilizó agua en lugar de la fracción como blanco, donde los hongos crecieron normalmente. La absorbancia del blanco se nombró como AbsB.

En ambos ensayos, se usó como control positivo un fungicida comercial, Captan (N-triclorometiltio-4-Ciclohexano; Merpan 83WP, Magan), a una concentración de 0.2 mg/mL de principio activo. Todos los ensayos de actividad antifúngica fueron realizados por triplicado. El porcentaje de inhibición (% I) de crecimiento se determinó como:

$$\% I = 100 \times [(AbsC - AbsB) / AbsB]$$

4.1.3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas y/o péptidos presentes en los extractos se realizó mediante, peso seco del liofilizado; el método del ácido bicinconínico (BCA), usando el kit BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, EE.UU) (Smith *et al* 1985) ; y/o Absorbancia 280 nm (Scopes 1994).

4.1.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida tricina (TRICINE-SDS-PAGE)

Para estimar la pureza y el peso molecular de las fracciones activas, se realizó un gel Tricina-SDS-PAGE que ofrece separación de alta resolución de proteínas de bajo peso molecular y péptidos. Se usaron geles de apilamiento 4 %, y resolutivos de 10 % o 16 %, como descrito por Schägger (2006). Las muestras de extractos proteicos o fracciones purificadas en solución se mezclaron con tampón de muestra 4X (concentración final. 1X), se incubaron durante 5 minutos a 95 °C y se cargó 20 µL por pocillo. Se usaron los marcadores de peso molecular Low Range SDS-PAGE Molecular Weight Standards, y/o Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (Biorad Laboratories, CA, EE.UU). Los geles se corrieron a un voltaje inicial de 30 V hasta que las muestras entraron en el gel de resolución. Posteriormente, se subió el voltaje a 125 V hasta el final de la corrida. La tinción de proteínas se llevó a cabo mediante tinción Coomassie o tinción con nitrato de plata según la concentración estimada de proteína (Abs. 280 nm) de la muestra. Luego de finalizada la electroforesis, las proteínas se fijaron en el gel mediante incubación en solución fijadora (50 % metanol, 10 % ácido acético) durante 1 hora. Para la tinción con Coomassie se colocó el gel en solución de tinción de Coomassie R-250 (0.5 % de Coomassie R-250, 10 % de ácido. acético)

durante 1 hora, seguido de solución para decolorar (10 % ácido acético) hasta que se pudieron visualizar las bandas. Para la tinción con nitrato de plata, el gel después de la solución de fijado se llevó a agua durante 1 hora, seguido de solución de tiosulfato de sodio 0.005 %, 1 hora (sensibilizador), solución de nitrato de plata 0.1 % (teñido), enjuague de segundos con agua y se llevó a 0.036 % formaldehído, 2 % carbonato de sodio (solución de revelado), el revelado se detuvo con 50 mM de EDTA (Schagger 2006).

4.1.5. Purificación por cromatografía en HPLC

La fracción que presentó actividad antimicrobiana y contiene proteína/péptidos de bajo peso molecular fué purificadas mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Äkta purifier 10 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Las técnicas de cromatografías utilizadas fueron: cromatografía de intercambio catiónico, en el cual los péptidos cargados se unen a la matriz, y cromatografía de fase reversa (RP-HPLC) donde las moléculas interactúan mediante su parte hidrofóbica con la matriz.

Se resuspendió dicha fracción en buffer de equilibrio fosfato 50 mM, pH 7. Una vez equilibrado, 500 µL del resuspendido (1 mg/mL) se aplicaron a una columna cromatográfica de intercambio catiónico MONO S HR 5/5 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y se eluyeron las proteínas retenidas con un gradiente lineal del buffer de elución fosfato de sodio 50 mM, NaCl 1M pH 7. Esta cromatografía se realizó a una velocidad de flujo de 1 mL/min, el gradiente varió de 0 a 300 mM de NaCl. Se colectaron fracciones de 5 mL, se dializaron para desalar con membranas Spectra/Por de corte de 2 kDa (Spectrum Labs, CA., EEUU) en agua destilada. Posteriormente se liofilizó el dializado y se reservaron alícuotas para ensayos de actividad antimicrobiana, así como para la cuantificación proteica y análisis por electroforesis.

Una vez que se identificó la fracción activa, ésta se disolvió en 0.1 % ácido trifluoroacético (TFA), y se aplicó a la columna µRPC C2/C18 ST 4.6/100 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Se eluyeron las proteínas retenidas con un gradiente lineal de 80 % acetonitrilo (ACN), 0.1 % TFA (0 - 60 %). Se colectaron las fracciones, se

liofilizaron y resuspendieron en agua estéril. Se reservaron alícuotas para ensayos de actividad antimicrobiana, así como para la cuantificación proteica, geles de poliacrilamida.

4. 1.6. Espectrometría de masas

Estos estudios fueron realizados por el servicio de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Instituto Pasteur Montevideo. La matriz empleada en este estudio, fue ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid) en 60 % ACN/0.1%TFA, aplicado en un instrumento 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) en modo reflector positivo, externamente calibrado con una mezcla de péptidos estándares (Applied Biosystems).

Se realizó una digestión enzimática y análisis de huella peptídica. El mapeo peptídico se utiliza rutinariamente para determinar la identidad de las proteínas. La huella peptídica de un determinado péptido o de una proteína es un conjunto de pequeños péptidos generados mediante la digestión con una proteasa específica. Esta lista de masas peptídicas experimentales es comparada con una lista de masas peptídicas teóricas calculadas para todas las secuencias peptídicas entradas en la base de datos, por ejemplo MASCOT (Henzel *et al* 1993; Hoffmann y Stroobant 2007).

El mapeo se realizó mediante el tratamiento del gel con tripsina (Sequencing-grade Promega) durante toda la noche a 37 °C. Los péptidos fueron extraídos del gel usando 60 % acetonitrilo en 0.2 % TFA, concentrado por secado al vacío y desalado usando microcolumnas de fase reversa C18 (OMIX Pippete tips, Varian). Los péptidos se eluyen con 3 μ L de la solución matriz CHCA en 60 % de acetonitrilo, 0.2 % TFA directamente sobre la placa de MALDI e introducida directamente en el espectrómetro de masas.

El espectro de masa de la digestión fue adquirido en un 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) en modo reflector, externamente calibrado con una mezcla de péptidos estándares (Applied Biosystems). Se fragmentaron péptidos seleccionados mediante disociación inducida por colisiones (MS/MS)

Las proteínas se identificaron por comparación con secuencias depositadas en bases de datos de proteínas utilizando el motor de búsqueda Mascot (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>) (Perkins *et al* 1999). Los parámetros utilizados para la búsqueda fueron los siguientes: Base de datos: NCBI nr (20120916); enzima tripsina; tolerancia masa isotópica, 0.05 Da; tolerancia fragmento masa, 0.25 Da; la oxidación de metionina, así como las modificaciones posibles (cisteínas oxidadas o reducidas) y la omisión de un corte triptico fueron permitidos.

4.1.7. Secuenciación N- terminal de la molécula aislada.

Con el fin de secuenciar el N-terminal por degradación de Edman, se realizó una corrida electroforética como se describió anteriormente, posteriormente el gel se transfirió a membrana de 0.2 µm de polifluoruro de vinilideno (polyvinylidene difluoride, PVDF). Se tiñó con Azul Coomassie, excluyendo de las soluciones el ácido acético, se dejó secar toda la noche a temperatura ambiente. La banda responsable de la actividad se cortó y se envió a secuenciar al servicio Tufts Medical School (MA, EEUU). Ahí se llevó a cabo la degradación de Edman automatizada en un sistema de secuenciación de proteínas Applied Biosystems 494 HTS.

4.1.8. Búsqueda de secuencias similares a la molécula identificada

La comparación se realizó con el algoritmo BLAST (Altschul *et al* 1990), opción blastp con los parámetros predeterminados.

4.2. Estrategia experimental para el cumplimiento del segundo objetivo.

4.2.1. Péptidos recombinante y sintéticos

El péptido de *Amaranthus quitensis* recombinante unido a tiorredoxina, (Trx-Aq-AMP), fue desarrollado en conjunto con el Instituto Pasteur de Montevideo, quien también nos proporcionó la Tiorredoxina. El péptido sintético Pses (WRQRYRYVHGYMGPKGYTR) fue aportado por el Laboratório de Bioquímica de

Proteínas e Peptídeos, FIOCRUZ, Brasil. y el péptido sintético Melitina (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ), originalmente aislado del veneno de abeja, fue elaborado por Sigma (MO, EEUU). Para cada etapa se ensayó diferentes péptidos según disponibilidad y/o justificación.

4.2.2. Determinación de la mínima concentración inhibitoria y la mínima concentración fungicida/bactericida

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC, del inglés minimal inhibitory concentration) y concentraciones mínimas fungicidas (MFC, minimal fungicide concentration) y concentraciones mínimas bactericidas (MBC, minimal bactericide concentration) mediante el ensayo de microdilución previamente descrito (Broekaert *et al* 1990) con modificaciones. Se ensayaron los péptidos a las concentraciones 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 y 0 μM en concentración final de 2×10^4 esporas/mL en 50 % de PDB, a 24 °C. Se evaluó la tiorredoxina (Trx), con fin de descartar actividad en el recombinante. Las bacterias se evaluaron a concentración final 2×10^4 ufc en 10 % de tripticasa, 37 °C. La inhibición se midió por turbidimetría a 595 nm en lector de placas Multiscan FC (Thermoscientific, Shanghai, China) a las 48 horas para hongos y 24 horas para las bacterias.

Los patógenos vegetales fueron aportados por el Laboratorio de Fitopatología de INIA Las Brujas y por el Laboratorio de Fitopatología INIA SG. Se evaluaron los hongos fitopatógenos *P. digitatum*, *P. italicum*, *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* y *A. solani*, además las bacterias fitopatógenas *Clavibacter sp.* (aislado de tomate) y *Pseudomonas sp* (aislado de pera).

Las cepas clínicas fueron aportadas por el Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina (Dr. Gustavo Varela). La cepas evaluadas fueron *Escherichia coli* entero patógena (EPEC) gram negativa, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) gram positiva, *Candida albicans* (hongo levaduriforme).

Los hongos patogénicos fueron crecidos en Agar Papa Dextrosa (PDA, Potato Dextrose Agar) (HiMedia, Mumbai, India) a 24 °C, se hicieron crecer por 7 días en placas PDA,

las esporas se colectaron con 0.1 % Tween 20 en agua estéril. Se filtró por gasa y centrifugó a 7000 g durante 20 minutos y cuantificó por cámara de Neubauer y se llevó el stock de esporas a 2×10^6 esp/mL.

Las bacterias fitopatógenas *Pseudomonas sp* y *Clavibacter sp.* se hicieron crecer en agar tripticasa 10% durante 24 horas. En el caso de las bacterias patógenas de humanos, *E. Coli*, *S. Aereus* y el hongo *Candida albicans*, se hicieron crecer a 37 °C en medio Muller Hinton agar (BD, Sparks, EEUU) durante 24 horas. Las colonias se disolvieron en tampón fosfato salino (phosphate saline buffer, PBS) y se ajustaron a Mc Farland 0.5 (Wiegand *et al* 2008)

4.2.3. Pruebas de estabilidad

Todas las pruebas de estabilidad se realizaron con *F. oxysporum* f.sp.*lycopersici* evaluándose la actividad por el método de microdilución descrito anteriormente. Para los ensayos de estabilidad frente a distintas condiciones de pH, temperatura, presencia de iones y proteasas (Cammue *et al* 1992; Terras *et al* 1992b) los péptidos se evaluaron a concentraciones de MIC. Los péptidos sin tratamiento fueron tomados como 100 % de actividad. Si se mantiene totalmente la actividad se identificó (++), correspondiente a un Abs del orden del control sin tratamiento, si la actividad se mantuvo parcialmente con respecto al control sin tratamiento se identificó como (+), y si se perdió totalmente, se nominó como (-), correspondiente a una Abs del orden del blanco.

4.2.3.1 pH

Para determinar la estabilidad frente al distintos pH, los péptidos Pses y Trx-Aq-AMP2 se incubaron durante 1 h a 37 °C, en el rango de pH entre 3, 5, 7, 9 y 11 y llevándolos nuevamente a pH 7 para ensayarlo. Para someterlos al pH deseado se utilizaron los siguientes tampones a concentración 100 mM: pH 3 Glicina/HCl, pH 5 Acetato/Acético, pH 7 Fosfato monobásico/Fosfato dibásico, pH 9 Tris/HCl, pH 11 Fosfato monobásico/Fosfato dibásico.

4.2.3.2 Temperatura

El péptido disuelto en PBS se llevó a 0, 60, 80 y 100 °C durante 1 hora. Se enfrió a 4 °C y centrifugó a 15000 g por 10 minutos para remover precipitados.

4.2.3.3 Proteasas

Se evaluó la pérdida de actividad después de tratar los Péptidos con 1 mg/mL de Pronasa E, proteinasa K y tripsina. Los péptidos se incubaron a 37 °C para pronasa E y proteinasa K, y a 25 °C para la tripsina. Para detener la reacción, se llevó a 95 °C durante 5 minutos e inmediatamente a 4 °C.

4.2.3.4 En presencia de sales

Se suplementó el medio (PDB) con NaCl y CaCl₂ a 1, 5 y 50 mM.

4.2.4 *Hemólisis*

Se evaluó la absorción de hemoglobina liberada (Cornut *et al* 1994). Tres mililitros de eritrocitos de oveja lo más fresca posible fueron lavados tres veces con PBS pH 7. Los eritrocitos lavados se diluyeron hasta un 10% v/v en el mismo tampón. Las muestras de péptido 50 µL, diluido en PBS, se añadieron a 50 µL de la suspensión celular en tubos de microcentrífuga. Tras mezclar suavemente, el tubo se incubó a 37°C durante 1 hora y luego se centrifugó a 2000 g por 5 minutos. El sobrenadante se colocó en una placa de 96 pocillos y se determinó la absorbancia a 450 nm (Absorbancia muestra = AM). Se utilizó Triton 0,2% X-100 como control de 100% de hemólisis (Absorbancia Triton = AT), mientras que muestras con PBS como 0% de hemólisis (Absorbancia blanco = AB).

El porcentaje de hemólisis se determinó como:

$$\% H = 100 \times [(AM-AB) / (AT-AB)]$$

4.2.5 Ensayo de decaimiento de frutas

El experimento se realizó con frutas frescas (menos de dos días de cosechada) de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) variedad Valencia. Los frutos se desinfectaron en solución 200 ppm de NaOCl por 5 minutos, se enjuagaron durante 5 minutos en agua y se dejaron secar al aire. Se realizaron heridas de aproximadamente 3 mm de profundidad con un punzón estéril en cuatro sitios alrededor del ecuador. Se realizaron 4 heridas por fruto, 60 heridas, un total de 15 frutos por tratamiento. Posteriormente se inoculó con 5 µL de una mezcla de 10^5 esporas/mL de *P. digitatum* y péptidos a diferentes concentraciones en agua, se utilizó esporas sin péptidos como control de infección, y 1000 ppm de principio activo del fungicida comercial Imazalil (Fungaflor 75 PS, Janssen Pharmaceutica) que es un agroquímico usualmente utilizado en el tratamiento postcosecha por la cadena citrícola (F. Rivas comunicación personal). Los frutos se mantuvieron a 20 °C y 90 % de humedad relativa durante los 7 días posteriores a la inoculación (Figura 4). Los síntomas se fueron evaluados en días posteriores a la inoculación asignando una puntuación diferente según el número de heridas infectadas por réplica. El análisis estadístico de las heridas infectadas (HI) se realizó a través del estudio de la característica tasa ovulatoria (HI; Binaria) indicativo del inicio de la pubertad y capacidad potencial de producción de corderos. La HI con sus valores reales (0 y 1), se analizó con una distribución Multinomial (ordenada) y función de vínculo Logit acumulado. Se modeló la probabilidad de tener una mayor HI. Para el análisis de la HI (Binaria), se utilizó una distribución binomial y función de vínculo Logit, modelando la probabilidad de tener actividad ovárica (HI Binaria = 1). Ambos análisis se realizaron mediante el procedimiento GENMOD del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, Version 9.2, 2008). Se calculó el promedio por tratamiento, y realizando el test estadístico paramétrico LSMEANS Statement para evaluar diferencias entre las medias.

A)

B)

C)



Figura 4. A) A lo largo del ecuador se realizan 4 heridas con un punzón estéril. B) Se inoculan 5 μL de solución de conidios del hongo con el tratamiento correspondiente. C) Los frutos se colocan en cámara a 20 °C y 90 % humedad relativa, durante los 7 días siguientes a la inoculación, determinándose la aparición y número de los síntomas.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados del primer objetivo.

5.1.1 Obtención de un extracto enriquecido de péptidos de bajo peso molecular de *Cynara scolymus*.

La estrategia utilizada para dicha fracción se esquematiza en la Figura 5. Dicha estrategia fue diseñada teniendo en cuenta las características que poseen la mayoría de los PAMs de origen vegetal (peso molecular bajo, carga positiva, anfipaticidad), como primera aproximación a la búsqueda del componente bioactivo. Según el procedimiento utilizado es de esperar que la fracción enriquecida en proteínas y péptidos de baja molecular sea la fracción denominada pellet 6V.

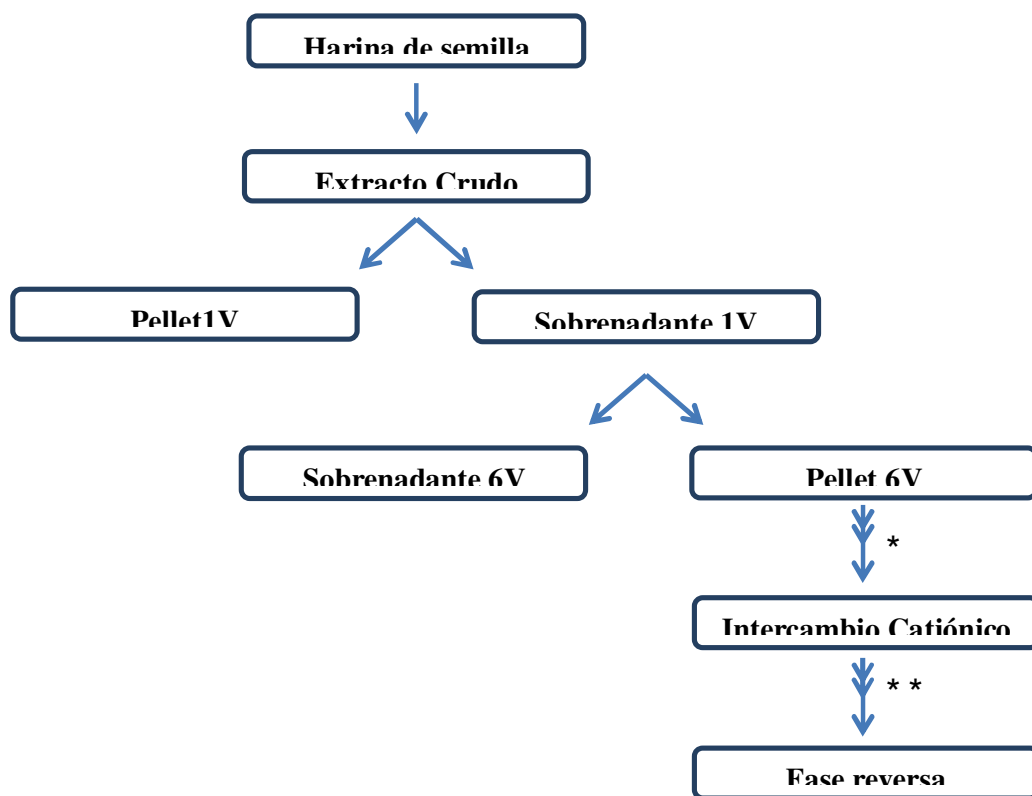


Figura 5. Estrategia de obtención de la fracción enriquecida en PAMs.

(*) Antes del intercambio el pellet 6V fue desalado y liofilizado para concentrar.

(**) Antes del la fase reversa, la fracción activa de IC, fue desalada y liofilizada para concentrar.

La tabla 3 muestra el porcentaje de recuperación (w/w), en este caso estimándose a partir de 10 gramos de harina. Se recuperaron 1,15 g de extracto crudo (EC). De este extracto sólo 7,7 mg (0,67 %) corresponde a la fracción enriquecida en proteínas pequeñas y péptidos (pellet 6V). En otras semillas se ha encontrado que aproximadamente el 0,5 % de proteína total son péptidos antimicrobianos (Terras *et al* 1995; Wang y Ng 2004).

Tabla 3: Masa total (Mt) recuperada en cada una de las fracciones obtenidas. (% R).

Extracto	Mt (mg)	porcentaje de recuperación % R
EC	1146	11.46
Pellet 1V	960	83.77
Pellet 6V	7.7	0.67

5.1.2 Ensayos de actividad antimicrobiana.

Al EC y los pellet 1V y 6V, resuspendidos como se describe en metodología se les evaluó la presencia o no de actividad antifúngica. En el ensayo de difusión en disco detectamos una clara actividad en las fracciones correspondientes al pellet 6V (D figura 6-A) y al control positivo del ensayo (E figura 6-A).

A)

B)

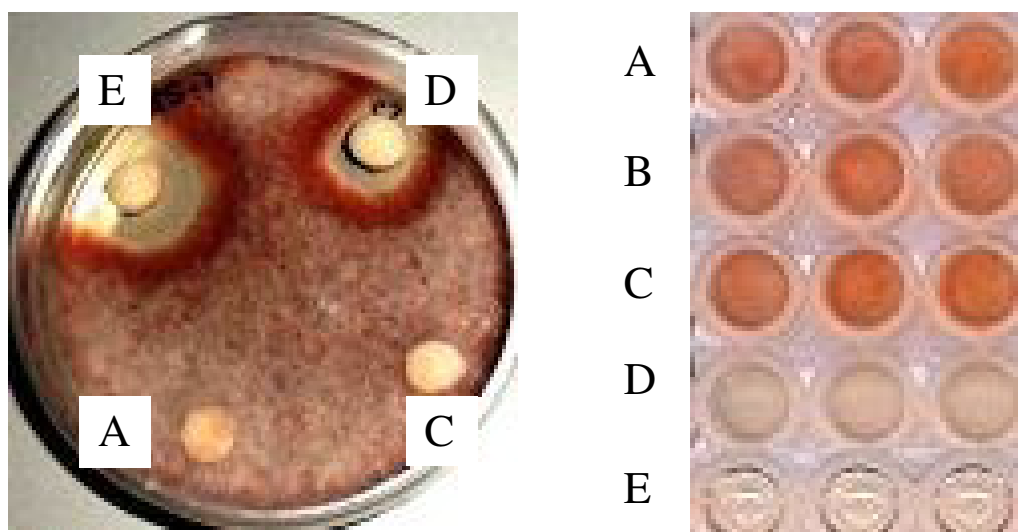


Figura 6. Ensayo de actividad antimicrobiana. (A) Imagen representativa del resultado obtenido en el ensayo de difusión en disco. (B) Imagen representativa del ensayo de microdilución en placa. Las muestras ensayadas fueron. A: Agua estéril, B: Extracto crudo (EC), C: pellet 1V, D: pellet 6V, E: Captan., todas ellas ensayadas a una concentración de proteínas de 0.5 mg/ml.

El ensayo de microdilución en placa nos permitió cuantificar en grado de inhibición de las fracciones obtenidas (Figura 6B y tabla 4). Al igual que en el ensayo de difusión en disco, detectamos una clara actividad en la fracción correspondiente al pellet 6V (%I = 73.5) y en el control positivo. Por otro lado pudimos detectar una leve actividad en la fracción EC (%I = 30.2), lo cual es esperable ya que contiene las proteínas o péptidos purificados en la fracción pellet 6V.

Tabla 4: Evaluación de la actividad antifúngica en *F. oxysporum*.

Extracto	Concentración proteica (mg/ml)	% I	Desvío estándar
EC	0.5	30.2	0.023
P1V	0.5	0.3	0.002
P6V	0.5	73.5	0.038

.1.3 Evaluación por electroforesis de las fracciones obtenidas.

Para observar las diferentes masas moleculares de las proteínas o péptidos presentes en las diferentes fracciones, así como verificar el enriquecimiento respecto en péptidos de bajo peso molecular a lo largo de las precipitaciones se realizó una corrida electroforética SDS PAGE Tricina al 10 % (Figura 7). Cuando se cargaron 10 µg y 2.5 µg de las fracciones (determinados por método BCA), se observa en el gel que se cumple lo esperado. Los péptidos representan un porcentaje menor del extracto crudo (EC). En el primer paso de precipitación con 1V de acetona (pellet 1V), se observan pocos péptidos, esto correlaciona con el hecho de que no detectamos actividad inhibitoria en las condiciones evaluadas. En el extracto correspondiente a la precipitación con 6V de acetona (pellet 6V) se nota un enriquecimiento de péptidos de bajo peso molecular, coherente con la observación de mayor actividad inhibitoria (Tabla 4). También cabe mencionar que la determinación de proteínas por BCA puede tener interferencias que podrían sobreestimar la concentración inicial del EC pero de igual forma en el pellet 6V es clara la mayor actividad que presenta esta fracción indicando que la precipitación en acetona es un buen método para concentrar la fracción activa.

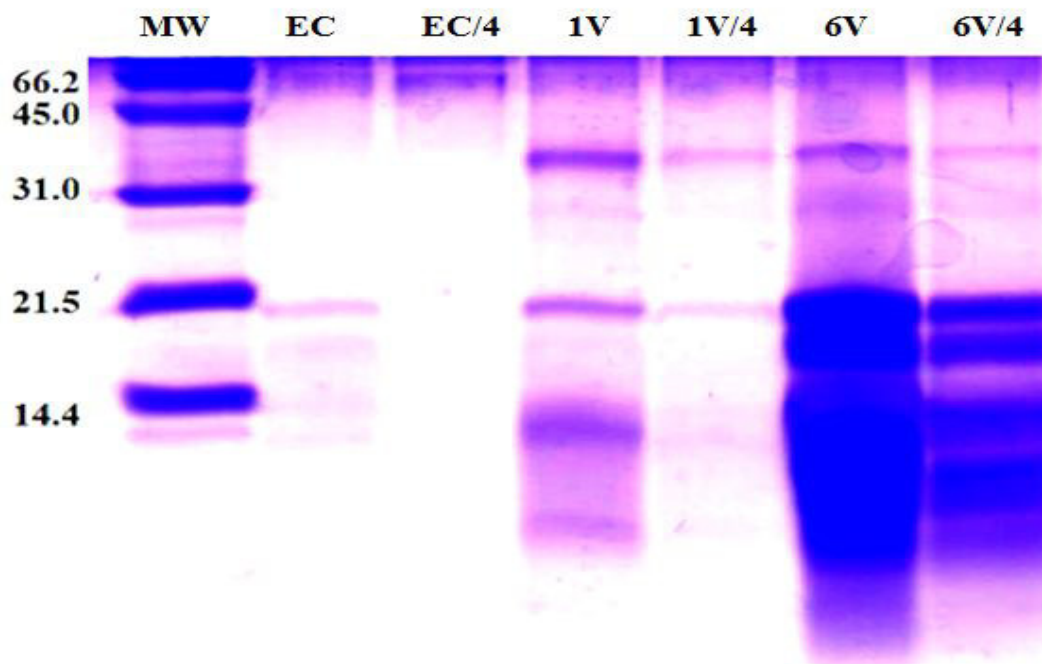


Figura 7. Gel de SDS PAGE tricina al 10 % de los distintos pasos de purificación, Carril 1: Molecular weight low range (MWLR), Carril 2: 10 µg de extracto crudo (EC), Carril 3: 2,5 µg de extracto crudo (EC/4), Carril 4: 10 µg pellet un volumen de acetona (1V), Carril 5: 2,5 µg pellet un volumen de acetona (1V/4), Carril 6: 10 µg pellet seis volúmenes de acetona (6V), Carril 7: 2,5 µg pellet seis volúmenes de acetona (6V/4),

5.1.4 Purificación de los péptidos activos

Para proseguir con la purificación, una vez identificado la fracción activa, se utilizaron distintas técnicas cromatográficas en HPLC de acuerdo a las características esperadas de las moléculas buscadas. Dado que es esperable que los PAMs sean catiónicos (carga neta positiva), se realizó una cromatografía de intercambio catiónico en columna Mono S HR 5/5 cuyo grupo cargado $-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$ interacciona con las cargas positivas de los PAMs y luego son liberados al aumentar la concentración de NaCl. Las fracciones de cromatografía de intercambio catiónico Fig. 8, fueron colectadas y evaluadas en lo que respecta a su actividad antimicrobiana como se describió en la figura 5B. La fracción 1 (IC1) presentó 100 % de inhibición cuando fue ensayada a una concentración de 0,25 mg/mL. Las demás fracciones no presentaron actividad inhibitoria.

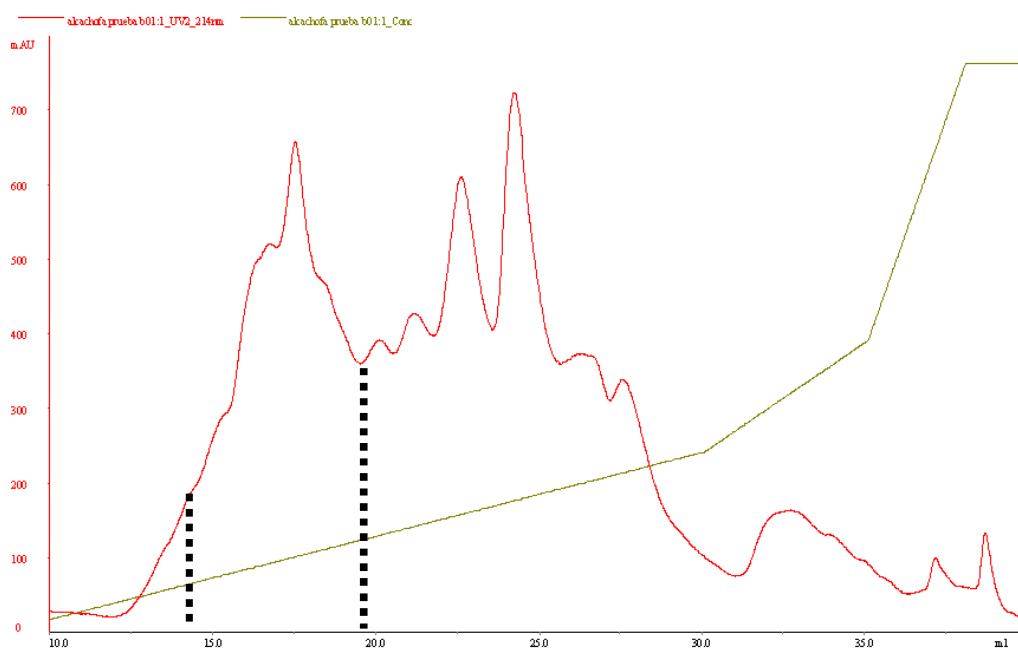


Figura 8. Cromatografía de intercambio catiónico en columna Mono S HR 5/5. El área entre las líneas punteadas indica la fracción activa (IC1) frente a *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Luego siguiendo con la purificación, la fracción IC1 con actividad antimicrobiana fue sometida a cromatografía en fase reversa en una columna RP C2C18 (Figura 9). Este tipo de columnas es usualmente usado en la purificación de péptidos antimicrobianos dado su anfipaticidad. Los grupos hidrofóbicos de los PAMs interaccionan con la matriz de cadenas de carbono (C2C18) y luego al aumentar paulatinamente la concentración de acetonitrilo en la fase móvil son liberados. De las fracciones obtenidas, liofilizadas y resuspendidas en agua, se logró observar actividad antifúngica en las fracción 5 (F5) y la fracción 8 (F8). A una concentración de 22.5 ug/ml, se observó un porcentaje de inhibición de 100% y 45% para las fracciones F5 y F8, respectivamente (figura 10A). La fracción F5, además resultó fungicida a la concentración evaluada, es decir que inhibió completamente el desarrollo de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en placa de PDA (figura 10B).

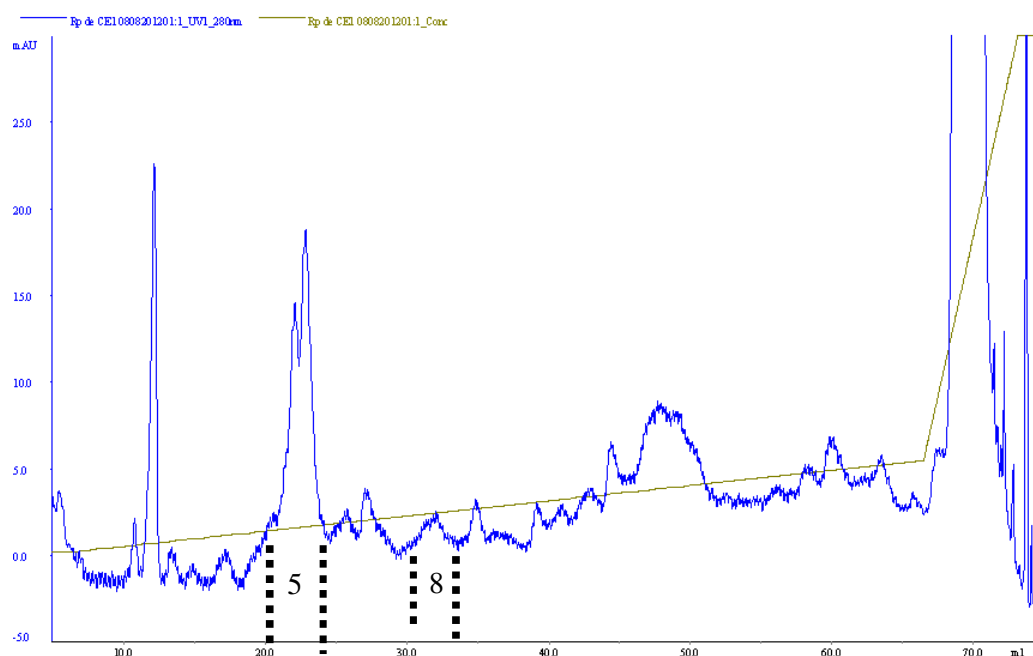


Figura 9. Cromatografía de fase reversa en columna C2C18. Las fracción 5 (F5), presentó 100 %I frente a *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. La fracción 8 (F8) mostró un 45 % I.

A)

B)

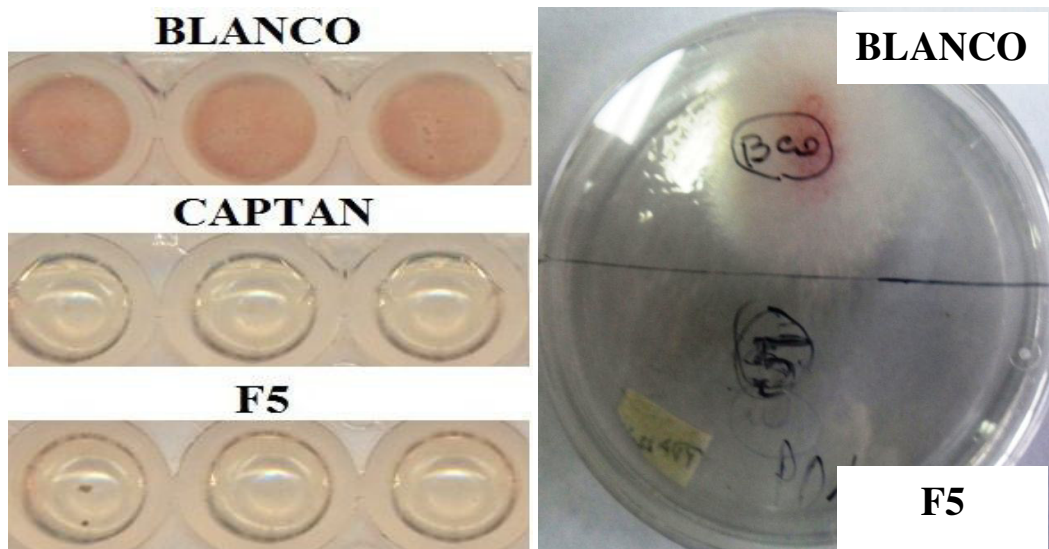


Figura 10. Bioensayo de las fracciones resultantes de la cromatografía de fase reversa C2C18 frente a *F. oxysporum*. La fracción 5 presenta 100% de inhibición y además resultó fungicida.

Posteriormente se realizó una corrida electroforética SDS-Tricina (Schagger 2006), dado que este tipo de electroforesis permite una mejor separación de péptidos pequeños. En la tinción con azul de Coomassie, se observó una molécula mayoritaria de aproximadamente 6 kDa (Figura 11a), lo que indica que se trata de una molécula peptídica que se encuentra aparentemente cercana a la homogeneidad. Para verificar la pureza de la fracción activa, se realizó un SDS PAGE Tricina 16% con tinción con nitrato de plata que es cien veces más sensible que la tinción con Azul Coomassie (Schagger 2006). Se evaluaron además las fracciones previas y posteriores al pico activo (F4 y F6). Aún aumentando la sensibilidad se observó únicamente una sola banda en la fracción activa. (Figura 11b).

A)

B)

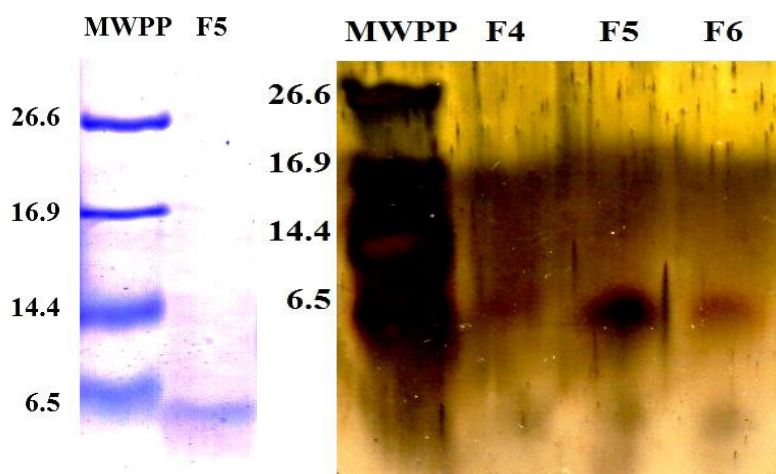


Figura 11. Geles de SDS PAGE Tricina 16 % de las fracciones de la corrida cromatográfica en fase reversa. a) tinción con Commassie de la fracción 5 (F5). b) tinción con plata de la fracción activa F5 y las fracciones pre y post pico de cromatografía.

5.1.5 Identificación de la molécula activa purificada

Una vez comprobada la pureza y actividad, se realizó con fin de confirmar los resultados de la electroforesis e intentar la secuenciación, estudios de espectrometría de masas.

La espectrometría de masas MALDI-TOF es una de las técnicas más empleada para la detección y caracterización de proteínas de masas moleculares comprendidas entre 400 y 350000 Da, dada su alta resolución, gran sensibilidad y exactitud en los datos obtenidos. La matriz empleada en este estudio, fue ácido α -ciano-4-hidroxycinámico (CHCA, α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid), siendo una de las matrices más empleada en el análisis de péptidos (Hoffmann y Stroobant 2007). La matriz es irradiada con pulsos intensos y cortos de láser, la irradiación con el láser induce un rápido calentamiento de la matriz provocando la desorción e ionización de los péptidos. Al ser MALDI un método de ionización suave, los péptidos son ionizados sin que ocurra su fragmentación. Los péptidos adquieren una carga positiva o negativa por adición o eliminación de protones, dando lugar a los iones pseudomoleculares que corresponden a la masa molecular del péptido más (o menos en el caso de iones negativos) la masa de uno o varios protones. Un típico espectro MALDI en modo positivo, incluye principalmente la especie molecular monocargada $(M+H)^+$ (Hoffmann y Stroobant

2007). Una vez que los péptidos se encuentran ionizados, estos son acelerados en un campo eléctrico, y conducidos a un analizador de masas (en este caso un analizador de tiempo de vuelo, TOF). Los péptidos se separan en base a su relación masa/carga (m/z), alcanzando el detector a distintos tiempos. Obteniendo un espectro de masas que refleja la abundancia de los iones frente a su valor m/z , permitiendo determinar el peso molecular del ión más abundante.

En la figura 12 se puede observar el espectro de masas MALDI-TOF de la fracción peptídica activa. Se obtuvo una señal de mayor intensidad con valor de m/z de 5748,55, similar a la masa observada en el gel de electroforesis SDS PAGE tricina.

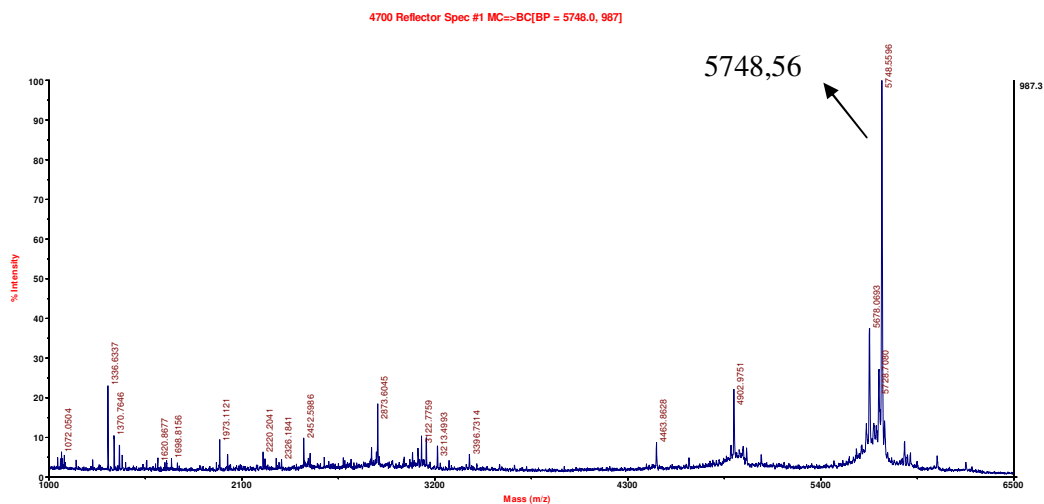


Figura 12 Espectro MALDI-TOF de la fracción activa. Se observa una señal mayoritaria con valor de m/z 5748,56.

Por lo tanto podemos observar que la muestra se encuentra enriquecida el péptido purificado a partir de semillas de *C. scolymus* y podría ser la molécula responsable de la actividad antifúngica. Debido a que la señal principal que se obtiene a partir de un espectro MALDI-TOF corresponde al ión molecular monocargado $(M+H)^+$, siendo M el peso del ión molecular intacto, el peso molecular de 5748 Da, corresponde al peso molecular del péptido de interés que definiremos Cs-PAM. Existen otras señales minoritarias que pueden asignarse al ión dicargado (2873,60), fragmentaciones propias del método, u otras moléculas.

Posteriormente, se intentó obtener la secuencia peptídica por digestión trípica y MS (Figura 13). Los péptidos trípticos se analizaron en un espectrómetro de masa MALDI TOF/TOF. Los valores de m/z obtenidos se compararon con los valores teóricos obtenidos por digestiones proteolíticas virtuales de secuencias disponibles en los bancos de datos del NCBI usando el programa MASCOT (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>). Los fragmentos mayores (de m/z : 1013.4931, 1249.6365, 1325.6396, 1338.6876, 1510.7175, 1568.8212, 1620.9274, 2445.0852, 2501.1724, 2525.1533, 2757.2910) fueron seleccionados para MS/MS. (Anexo1).

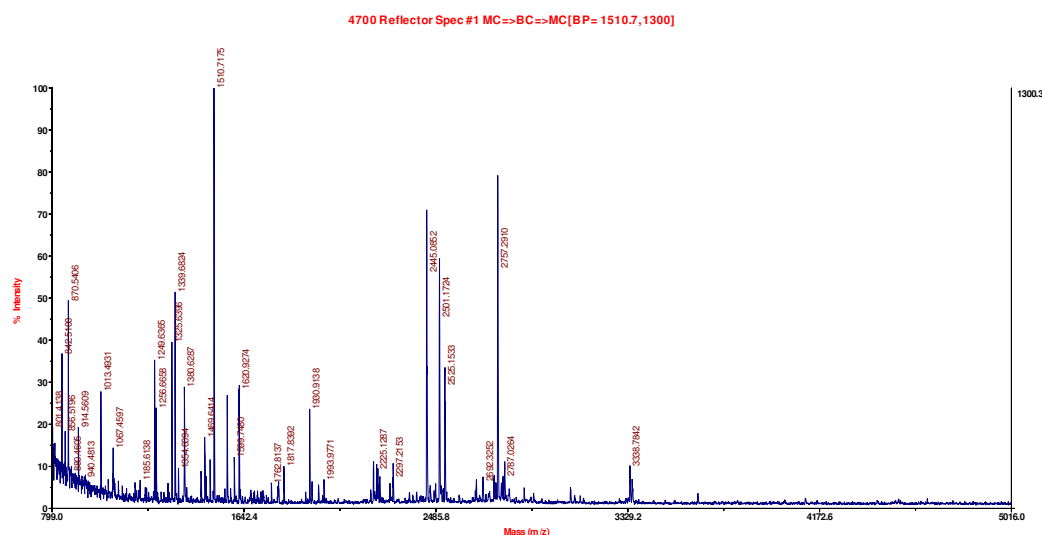


Figura. 13. Espectro de masas de la fracción activa CsAMP reducido, alquilado y digerido con tripsina.

En esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa el fragmento **SLEAQQHLEAGR** (12 aminoácidos) asignada a la proteína embrionaria de *Daucus carota* (zanahoria) proteína EMB-1 quedando muchas señales de m/z sin poder identificar. La EMB-1 es una molécula de 92 aminoácidos que tiene un peso molecular teórico de 9911 Da, su punto isoeléctrico es 6.74 y no presenta actividad antimicrobiana reportada mientras que el péptido de la muestra es de 5748 Da y presumiblemente básico de acuerdo al proceso de purificación. Esto nos indicaría o bien, que el fragmento está presente en la molécula antimicrobiana y comparten esos 12 aminoácidos; o que se trata de diferentes moléculas y están ambas presentes.

Al no poder identificarlo por el mapeo peptídico se realizó una búsqueda de homología de secuencia mediante el algoritmo Blastp (Anexo 2) con el fragmento identificado. Si

bien los resultados muestran que se alinea a varias moléculas, todas al igual que EMB-1 son mayores y ninguna presenta actividad antimicrobiana. La similitud de las moléculas se puede deber mas a que se trata de un fragmento demasiado pequeño por lo que la probabilidad de encontrar fragmentos de una secuencia similar es mayor. El resultado del alineamiento, nos hace suponer que efectivamente el fragmento encontrado no pertenece a la molécula que explica la actividad antifúngica de F5, dado que no se alinea con moléculas del tipo esperado (PAMs).

Dado los resultados obtenidos se buscó otra alternativa para identificar y obtener la secuencia. Se realizó la secuenciación del extremo N-terminal mediante la degradación de Edman (Anexo 3). Por este método se obtuvieron nueve aminoácidos del extremo N-terminal, **ELCEKASKT**.

Se realizó nuevamente un Blastp (Anexo 4) y el fragmento identificado, resultó idéntico a los nueve primeros aminoácidos del N-terminal del péptido antimicrobiano de *Dalhia merckii* (Dm-AMP1) aislado de semilla, perteneciente a la familia de las defensinas (Osborn *et al* 1995). *D.merckii* pertenece a la familia Asteraceae (Osborn *et al* 1995) al igual que como se menciona en la introducción *C. scolymus* (Lattanzio *et al* 2009), además la molécula Dm-AMP de 50 aminoácidos (Figura 13), su punto isoeléctrico teórico es pI: 7,80, y su masa molecular es 5521.25 Da (Osborn *et al* 1995), similar al de la molécula encontrada (dado el proceso de purificación). Esto nos permitiría inferir que la molécula que explica la actividad de F5, es un PAM al que llamaremos *Cynara scolymus* Antimicrobial Peptide (Cs-AMP).

ELCEKASKTWSGNCGNTGHCDNQCKSWEGAAHGACHVRNGKHMCFYFNC

Figura 14. Secuencia aminoacídica de Dm-AMP 1, obtenida de Osborn 1995.

Una vez obtenida la secuencia homóloga, se realizó una digestión teórica con tripsina en el programa MASCOT (Tabla 5), y se volvieron a buscar fragmentos en el espectro de masa (Figura 15).

Tabla 5. Digestión tríplica teórica del péptido Dm-AMP 1 obtenida mediante el programa MASCOT.

Masa	Posición	#MC	Secuencia
3186.2894	9-38	1	TWSGNCGNTGHCDNQCKSWEGAAHGACHVR
2110.8488	6-25	1	ASKTWSGNCGNTGHCDNQCK
1824.6847	9-25	0	TWSGNCGNTGHCDNQCK
1679.7819	26-41	1	SWEGAAHGACHVRNGK
1466.5472	39-50	1	NGKHMCFYFNC
1380.6225	26-38	0	SWEGAAHGACHVR
1167.3879	42-50	0	HMCFCYFNC
907.4553	1-8	1	ELCEKASK
621.2912	1-5	0	ELCEK

#MC = numero de omisión de corte por tripsina.

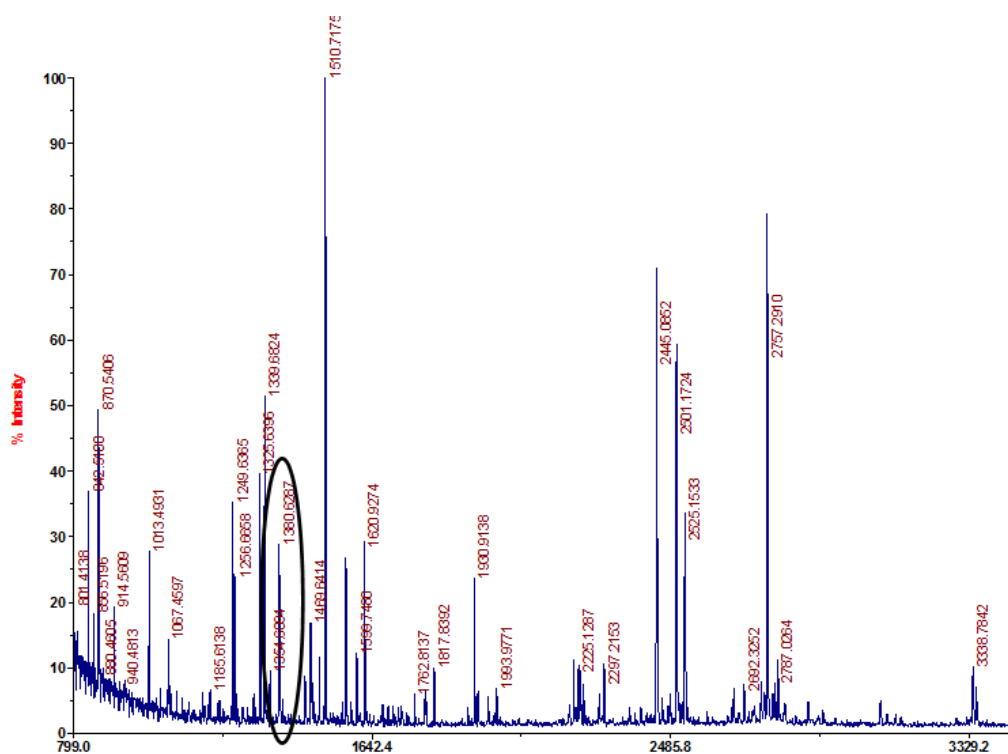


Figura 15. Acercamiento de Figura 13. Se resalta el fragmento de m/z 1380, que coincide con el valor teórico de un fragmento triptico de Dm- AMP.

Al comparar la digestión teórica de Dm-AMP1 con el espectro obtenido al digerir la muestra con tripsina, se observa que coincide un fragmento de m/z 1380, correspondiente a la secuencia **SWEGAAHGACHVR**, no se encuentran los restantes

fragmentos de la digestión teórica. Se confirmaría lo obtenido por la secuenciación del N-terminal y se trataría de una defensina con similitud a la molécula de Dm-AMP (Figura 16). El hecho de presentar pesos moleculares diferentes (Dm-AMP 5521 Da, y Cs-AMP 5748 Da) nos hace descartar de que sean moléculas idénticas, por lo tanto Cs-AMP sería un péptido antimicrobiano no reportado aún.

ELCEKASKTWSGNCGNTGHCDNQCKSWEGAAHGACHVRNGKHMCFYFNC

Figura 16. Secuencia aminoacídica de Dm-AMP 1, obtenida de Osborn 1995. Se destaca en negrita en la Figura los fragmentos identificados, el N-terminal obtenido por degradación de EDMAN y el fragmento observado por digestión trípica en espectrometría de masas.

Como se mencionó en la introducción, las defensinas vegetales, presentan al menos ocho cisteínas conservadas que forman cuatro puentes disulfuro los cuales estabilizan la molécula, dándole estabilidad frente a diversas condiciones ambientales. Estas características las hace atractivas para su uso en las condiciones exigentes del entorno.

Se han expresado este tipo de péptidos en diversos sistemas de expresión a escala de laboratorio (Bommarius *et al* 2010; Kovalskaya y Hammond 2009; Wu *et al* 2011), es necesario el ajuste de técnicas que permitan la expresión en escala aplicada. Este proceso debe ser acompañado de la evaluación continua y formulación de un producto que aproveche las características de actividad y estabilidad permitiendo la aplicación biotecnológica de este tipo de moléculas.

5.2 Resultados del segundo objetivo

5.2.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de AqTrxAMP y Ps

Con fin de poner a punto técnicas que permitan evaluar PAMs, se evaluó la actividad antimicrobiana de los péptidos (poner) frente a diversos patógenos de interés tanto agrícola como clínico, calculándose los parámetros MIC, MFC y MBC.

Como se detalla en la Tabla 6, ambos péptidos confirmaron la actividad, además resultaron letales frente a los patógenos fúngicos de interés agropecuario. Es de destacar que la presencia de actividad en Trx-Aq-AMP nos hace suponer un correcto plegamiento y formación de los puentes disulfuro, importantes para la actividad

(Bouyoussfi *et al* 1997; Broekaert *et al* 1992; Kovalskaya y Hammond 2009; Wu *et al* 2011) en la mayoría de péptidos vegetales. El péptido recombinante fue activo contra *Cándida* sp. aunque no fungicida. Por otro lado Pses no fue activo frente a *Candida albicans*. Ninguno de los PAMs fue activo frente a bacterias a las concentraciones evaluadas, excepto Melitina como esperado de acuerdo a la bibliografía. La Melitina resultó activa frente a todos los patógenos evaluados, de acuerdo a lo esperado. Es destacar que se confirmó que la Tiorredoxina no presentó actividad aún ensayándola a 128 μ M.

Tabla 6. Actividad antimicrobiana de los péptidos Trx-Aq-AMP , Pses y Melitina, frente a patógenos de interés agronómico y clínicos.

	<i>F. oxysporum f.sp. lycopersici</i>		<i>P. digitatum</i>		<i>A. solani</i>	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
Péptido	(μ M)	(μ M)	(μ M)	(μ M)	(μ M)	(μ M)
Trx-Aq	4	8	4	8	4	8
Pses	4	4	2	4	4	8
Melitina	<2	ND	<2	ND	<2	ND
Trx	>128	ND	>128	ND	ND	ND

	<i>P. italicum</i>		<i>Xanthomonas sp</i>		<i>Pseudomonas sp</i>	
	MIC	MFC	MIC	MBC	MIC	MBC
Péptido	(μ M)	(μ M)	(μ M)	(μ M)	(μ M)	(μ M)
Trx-Aq	4	8	>16	ND	>16	ND
Pses	2	4	>128	ND	>128	ND
Melitina	<2	ND	2	ND	2	2

	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C.albicans</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC
Péptido	(μ M)	(μ M)	(μ M)	(μ M)	(μ M)	(μ M)
Trx-Aq	>16	ND	>16	ND	4	ND
Pses	>128	ND	>128	ND	>128	ND

ND = no determinado; NF = No Fungicida

Los valores de MIC y MFC resultaron atractivos para continuar trabajos de escalamiento con estos péptidos dado que por bibliografía se ha establecido como relevante valores de MIC menores a 20 μ M (Marcos *et al* 2008)

5.2.2 Estabilidad

Se evaluó la estabilidad de la actividad de los PAMs Trx-Aq-AMP y Pses contra *F. oxysporum f.sp. lycopersici*, en diversas condiciones de pH (Tabla 7), temperatura

(Tabla 8), presencia de iones KCl y CaCl₂ (Tabla 9) y en presencia de las proteasas como Tripsina, Pronase E, Proteinasa K (Tabla 10). Para ello se eligió evaluarlo a la concentración MIC determinada anteriormente. Siendo este el 100 % de actividad (++), cuando disminuyó la actividad se evaluó (+), mientras que al perderse totalmente la actividad se evaluó (-).

En líneas generales como era de esperar el péptido recombinante de origen natural fue más estable que el sintético. Estas diferencias pueden explicarse en la estructura molecular de los PAMs. Mientras el Trx-Aq-AMP está estabilizado por puentes disulfuro y mantiene la actividad, el sintético lineal la pierde. Estos datos son concordantes con lo mencionado en la introducción.

Al exponer a los péptidos a pH extremos y luego de neutralizarlos, evaluarlos a pH del medio, la actividad se mantiene (Tabla 7). Esto puede ser importante en procesos fisiológicos donde cambia el pH de los frutos o en procesos industriales donde se varíe el pH.

Tabla 7. Estabilidad frente a distintos pH de Trx-Aq-AMP y Pses. Se compara la actividad relativa al control sin tratamiento.

	Trx-Aq-AMP	Pses
pH 3	++	++
pH 5	++	++
pH 7	++	++
pH 9	++	++
pH 11	++	++
control	++	++

Cuando se evaluó el efecto de la temperatura en los PAMs, el péptido de sésamo resultó termolábil mientras que el recombinante mantuvo la actividad tal cual el péptido natural (Tabla 8). Es de destacar que el péptido Trx-Aq-AMP, mantuvo la actividad incluso ensayándolo a 100 °C durante una hora. Este dato confirma lo reportado en el péptido natural, aunque en ese caso se evaluó durante 10 minutos (Broekaert *et al* 1992).

Tabla 8. Ensayo de estabilidad de Trx-Aq-AMP y Pses frente a distintas temperaturas. Se usaron los péptidos sin tratamiento como control. (+) mantiene inhibición, (-) pierde actividad.

	Trx-Aq-AMP	Pses
60 °C	++	-
80 °C	++	-
100 °C	++	-

Como se describió en la introducción la mayoría de los PAMs pierden actividad en presencia de cationes. En este estudio, si bien se trabaja solamente con dos sales , una de un ión monovalente, y otra de un divalente, se confirma la bibliografía previa, de que el efecto antagonista de sales se debe principalmente a los cationes, siendo los cationes divalentes antagonistas más potentes que los cationes monovalentes. Para el Trx-Aq-AMP igual que en el natural, la adición de CaCl_2 a 1 mM causó una reducción más fuerte de la actividad antifúngica que KCl a 50 mM (Tabla 9).

Tabla 9. Evaluación de los péptidos antimicrobianos a distintas concentraciones de sales inorgánicas: a) KCl; b) CaCl_2 .

A)	KCl	1 mM	5 mM	50 mM
	Trx-Aq-AMP	++	++	++
	Pses	++	++	++
B)	CaCl_2	1 mM	5 mM	50 mM
	Trx-Aq-AMP	+	-	-
	Pses	+	-	-

Ambos péptidos disminuyeron la actividad a concentraciones de KCl y CaCl_2 1mM frente al medio sin sales. Frente a CaCl_2 se perdió totalmente la actividad tanto a 5mM como a 50 mM.

El péptido de sésamo no fue resistente a proteasas. El péptido recombinante de amaranto mantuvo la actividad aún cuando fue digerido por una hora, aunque redujo la actividad al realizar el ensayo por 16 hs (Tabla 10).

Tabla 10. Estabilidad frente a proteasas.

	Pses	Trx-Aq-AMP
Prot. K 1h	-	++
Pronase 1h	-	++
Tripsina 1h	-	++
Prot. K 16 h	-	+
Pronase 16 h	-	+
Tripsina 16 h	-	+

Todos estos resultados son coherentes con lo esperado según las características propias de las moléculas y fueron realizados para emular situaciones extremas a las cuales podrían estar expuestos en condiciones de aplicación agronómica. El péptido recombinante al poseer los puentes disulfuro tiene una estructura terciaria que protege la molécula y la estabiliza, mientras tanto el Pses que no posee puentes disulfuro no presenta estabilidad.

5.2.3 Ensayo de actividad Hemolítica

Como un modo de monitorear la posible toxicidad de los péptidos antimicrobianos frente a células de animales, se evaluó la actividad hemolítica frente a glóbulos rojos extraídos de sangre de cordero. La melitina como era de esperar resultó hemolítica hasta una concentración de 2 μM (Cornut *et al* 1994) mientras el péptido Pses resulta tóxico hasta una concentración de 32 μM , de acuerdo a la evidencia previa que sugiere que las moléculas lineales, con varios residuos hidrofóbicos tienen más probabilidad de ser hemolíticos (Cornut *et al* 1994). Por otro lado el péptido recombinante unido a tiorredoxina no mostró toxicidad a concentraciones evaluadas que llegaron a 128 μM (Figura 17). El estudio de actividad hemolítica si bien no es una evaluación profunda de toxicidad, nos permite discriminar a grosso modo la posible toxicidad de los compuestos a evaluar, en este caso nos llevaría a descartar el Pses o al menos pensar de que manera modificarlo para que pierda la actividad hemolítica.

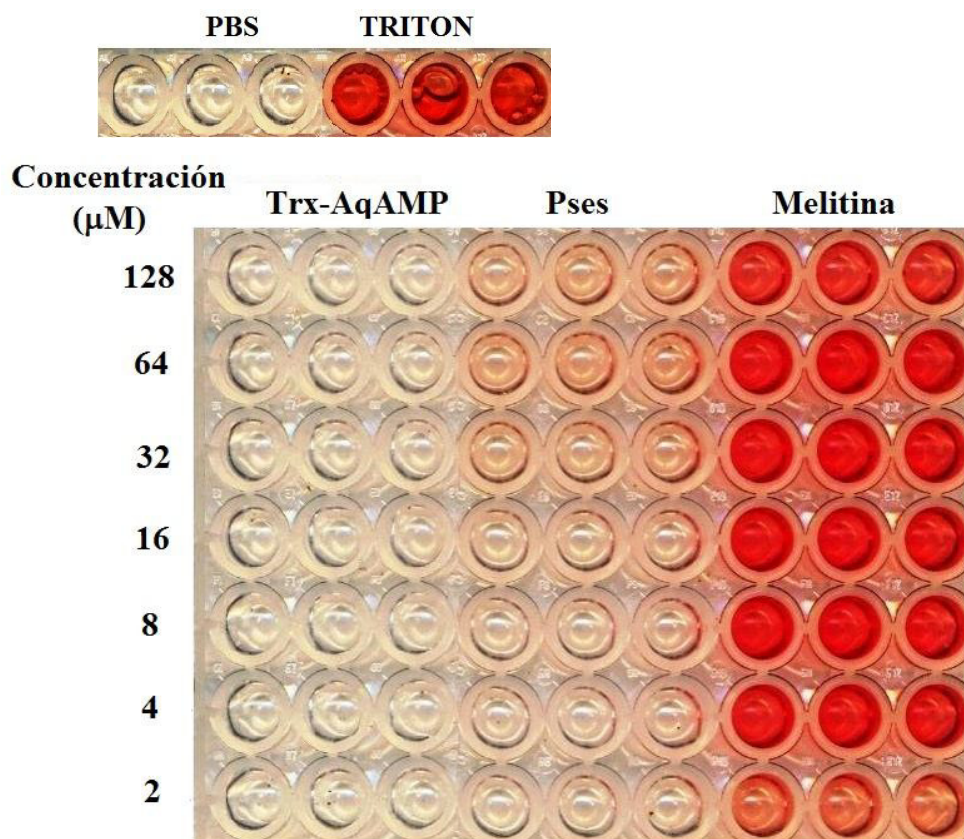


Fig 17. Ensayo de hemólisis para los péptidos Trx-Aq-AMP, Pses y Melitina. Se usaron PBS y Triton 0,1 % como controles.

5.2.4 Ensayo de decaimiento en fruta

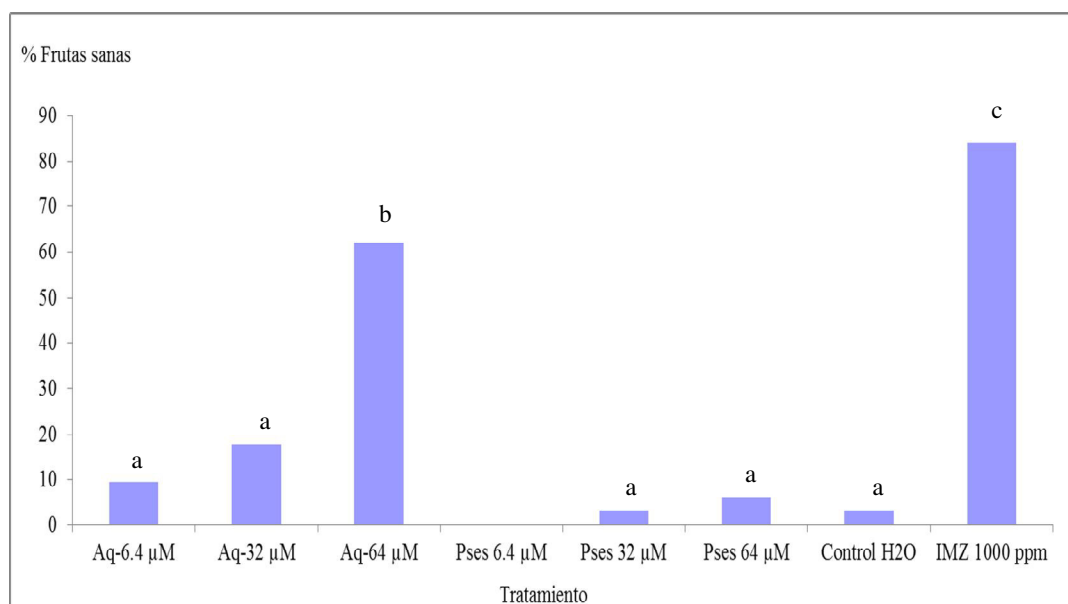
Con fin de evaluar la actividad en un sistema vegetal que simule las condiciones reales de postcosecha en la industria cítrica, se evaluaron los péptidos a distintas concentraciones usando como controles el agua y el fungicida comercial Imazalil (IMZ) (Figura 17). El Trx-Aq-AMP demostró ser activo a la concentración 64 μM siendo estadísticamente diferente a las otras medias (Tabla 10) mostrando una protección de 62% de las heridas infectadas con *P. digitatum*. Los restantes tratamientos de Trx-Aq-AMP y los de Pses no mostraron ser activos.

Tabla 11. Evaluación *in vivo* de la actividad de péptidos (TrxAq; Pses) tomando como referencia el fungicida de uso comercial Imazalil (IMZ). Las medias de los tratamientos fueron analizados mediante la estadística LSMEANS.

	Estimador		Error estándar	Grado libertad	Chi cuadrado	Pr > ChiC
	Media	L'Beta				
TrxAq 6,4 μ M	0,0951a	-22,525	0,4357	1	26,73	<,0001
TrxAq 32 μ M	0,1770a	-15,366	0,3391	1	20,53	<,0001
TrxAq 64 μ M	0,6206b	0,4922	0,2699	1	3,33	0,0682
Pses 6,4 μ M	0,0000	-264,165	67881,74	1	0,00	0,9997
Pses 32 μ M	0,0313a	-34,330	0,7232	1	22,54	<,0001
Pses 64 μ M	0,0630a	-26,995	0,5225	1	26,69	<,0001
Agua	0,0313a	-34,330	0,7232	1	22,54	<,0001
IMZ 1000 ppm	0,8394c	16,536	0,3513	1	22,16	<,0001

Las medias que presentan igual letra no difieren estadísticamente a nivel de 5%.

A)



B)

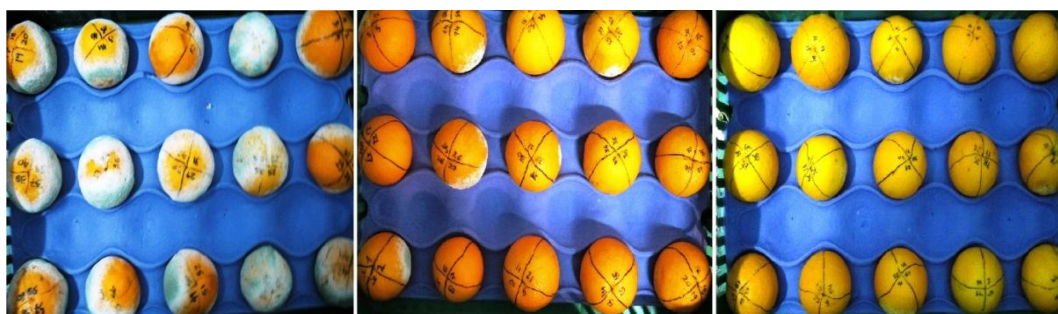


Fig 18 A) Ensayo de decaimiento en fruta, el Trx-AqPAM protege al 64 % de las heridas infectadas con *P. digitatum*. B) Ensayo al día 7, de izquierda a derecha control con agua, Trx-Aq-AMP 64 μ M, Imazalil 1000 ppm. Las medias con igual letra (a, b, c) no difieren estadísticamente a nivel de 5 % de significancia.

Si bien la dosis a la que es activo es mayor a la calculada *in vitro*, resultados similares se observaron con distintos tipos de moléculas en otros estudios de post cosecha, lipopéptidos en el control de *Botritis cynerea* en pepino (Makovitzki *et al* 2007), PAMs sintéticos y fungicidas químicos en el control de *P. digitatum* y *P. italicum* en citrus (López-García 2003).

En estudios previos de control de *P. digitatum* en cítricos con péptidos antimicrobianos (López-García 2003; Muñoz *et al* 2007), lograron controlar aproximadamente el 25% de las heridas infectadas; es de destacar que al igual que el Pses se trataban de péptidos lineales de síntesis, por lo que son más susceptibles a las condiciones del entorno. Una alternativa que se plantea en el trabajo de Muñoz *et al.*, 2007, es el uso de PAMs de forma preventiva preincubando el patógeno con el péptido por 16 horas previo a la inoculación. De esta forma logra controlar cerca del 50 % de las infecciones, pero esto es una fuerte restricción para lo que ocurre en la realidad donde es posible observar diferentes estados de desarrollo del crecimiento del hongo (esporas y micelio) debiendo estar en presencia del péptido. Las condiciones de evaluación realizadas en este estudio claramente se diferencian tratando de ajustarse a un uso comercial del péptido según ocurre en plantas de empaque. Vale decir que los autores mencionados en caso de emplear el péptido como un fungicida comercial (sin pre-incubación) obtienen un porcentaje de fruta sana muy inferior. Los valores de fruta sana obtenidos en nuestro ensayo a la máxima concentración evaluada muestran resultados 2,48 veces superior, siendo las condiciones de aplicación muy cercano a un tratamiento comercial.

Se observa una relación entre la estabilidad *in vitro* y la actividad *in vivo*, siendo que el péptido estable *in vitro* controló mejor que *in vivo*. La presencia de puentes disulfuro estabiliza la molécula y posiblemente la protege de la degradación por proteasas. Esto último puede ser una guía en cuanto a que moléculas elegir para futuros ensayos y/o producción a mayor escala. Pensando en una aplicación de este tipo de moléculas es necesario tener presente los baños a los cuales son sometidas la fruta previa a su almacenamiento en cámaras frigoríficas. Durante los diversos pasos el fruto se somete a distintas condiciones de pH, temperatura, además de enfrentarse a proteasas de los microorganismos. Es fundamental que las nuevas moléculas de control puedan sortear estos desafíos.

6 CONCLUSIONES

Se destaca a continuación los principales obtenidos durante el presente estudio de maestría que permitió una aproximación a las principales características que debe reunir una biomolécula peptídica para ser considerada como alternativa para el control de hongos filamentosos de poscosecha.

Se logró purificar a casi homogeneidad un nuevo péptido a partir de semillas de *C. scolymus* cuyo peso molecular de 5748 Da, presente en una fracción con actividad antimicrobiana. Dado que se todo indica que se trataría de un péptido de la familia de las defensinas es altamente probable que sea el responsable de la actividad antifúngica.

Se ajustaron técnicas que permiten la caracterización parcial de los nuevos compuestos a nivel de estabilidad y toxicidad, así como el ensayo de actividad *in vivo* en frutos de naranja.

Se comprobó la relación de estudios *in vitro* sobre estabilidad y la aplicación *in vivo*, siendo trascendental la existencia de puentes disulfuros en la estabilidad.

El péptido recombinante Trx-Aq-AMP a una concentración de 64 μ M demostró ser eficaz con significancia estadística el el control de *P. digitatum*.

La actividad fungicida *in vitro* e *in vivo*, la estabilidad del péptido recombinante Trx-Aq-AMP, así como la ausencia de hemólisis, hacen de esta molécula un candidato promisorio a ser considerado como alternativa y/o complemento de fungicidas químicos en el control de patógenos fúngicos en poscosecha.

7 PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos mediante esta Tesis de maestría se presentan las bases para futuros estudios en diversos campos bioquímico-moleculares en la búsqueda de PAM:

- Caracterización de actividad y estabilidad de CsAMP, así como la determinación de su modo de acción.
- Clonado y expresión de CsAMP/otros péptidos identificados en diversos sistemas como ser *E. coli*, *Pichia pastoris* o expresión en plantas. Ajuste de condiciones en los distintos sistemas y evaluación de la viabilidad económica.
- Evaluación de ensayo *in vivo* integrado a otros controles de sinergias con otros compuestos presentes en aplicaciones de poscosecha de cítricos y otros patosistemas.
- Evaluación biológica y económica de la producción y aplicación a mayor escala.

8 BIBLIOGRAFÍA

Aerts AM, Carmona-Gutierrez D, Lefevre S, Govaert G, François IE, Madeo F, Santos R, Cammue BP, Thevissen K (2009) The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. FEBS letters 583: 2513-2516

Aerts AM, François IE, Cammue BP, Thevissen K (2008) The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. Cellular and Molecular Life Sciences 65: 2069-2079

Agrios GN (1997) Plant Pathology (Fourth Edition), San Diego, EEUU

Ali S, Reddy SN (2000) Inhibition of Fungal and Bacterial Plant Pathogens by Synthetic Peptides *In Vitro* Growth Inhibition, Interaction Between Peptides and Inhibition of Disease Progression. Molecular Plant-Microbe Interactions 13: 847-859

Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D (1990) Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403-410

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology 45: 493-496

Bernal R, Banco O, Amaral J, Nuñez J, Alves P (2009) Control de Sarna y *Alternaria* en Cítricos. Actividad de difusión - INIA: 1-23

Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, Lopez G, Garcia-Olmedo F, Molina A (2002) Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection. Plant Physiology 128: 951-961

Boman HG (2003) Antibacterial peptides basic facts and emerging concepts. Journal of Internal Medicine 254: 197-215

Bommarius B, Jenssen H, Elliott M, Kindrachuk J, Pasupuleti M, Gieren H, Jaeger KE, Hancock RE, Kalman D (2010) Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*. *Peptides* 31: 1957-1965

Bonino A, Gnesetti A, Pujadas M, Broggi A (2007) Infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad: análisis de la población pediátrica asistida en el Hospital Policial de Uruguay, 2004. *Archivos de Pediatría del Uruguay* 78: 41-47

Bouyoussfi ME, Laus G, Verhetden P (1997) Location of the three disulfide bonds in an antimicrobial peptide from *Amaranthus caudatus* using mass spectrometry. *Journal of peptide research* 49: 336-340

Bowdish DM, Davidson DJ, Hancock RE (2005) A Re-evaluation of the Role of Host Defence Peptides in Mammalian Immunity. *Current Protein and Peptide Science* 6: 35-51

Broekaert WF, Cammue BP, De Bolle MF, Thevissen K, De Samblanx G, Osborn RP (1997) Antimicrobial peptides from plant. *Critical Review in Plant Science* 16: 297-323

Broekaert WF, Marien W, Terras FR, De Belle MF, Proost P, Van Damme J, Dillenil L, Claeys M, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BP (1992) Antimicrobial Peptides from *Amaranthus caudatus* Seeds with Sequence Homology to the Cysteine Glycine-Rich Domain of Chitin-Binding Proteins. *Biochemistry* 31: 4308-4314

Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology* 108: 1353-1358

Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Vanderleyden J (1990) An automated quantitative assay for fungal growth-inhibition. *FEMS Microbiological Letters* 69: 55-59

Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews. Microbiology* 3: 238-250

Broussalis AM, Ulf Göransson U, Coussioa JD, Ferraro G, Martino V, Claeson P (2001) First cyclotide from Hybanthus (*Violaceae*). *Phytochemistry* 58: 47–51

Bundy R, Walker AF, Middleton RW, Wallis C, Simpson HC (2008) Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: a randomized, double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine*, 15: 668-675

Cabrera A (2010) Estudio de la actividad antifúngica de extractos vegetales. Tesis de Grado. Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Udelar.

Cabrera D, Soria J, Nuñez S, Leoni C, Feippe A, Maeso D, Zoppolo R (2007) El cultivo del peral en Uruguay. Pautas tecnológicas. *Fruticultura Profesional* 168: 33 - 40.

Cammue BP, De Bolle MF, Terras FR, Proost P, Van Damme J, Rees SB, Vanderleyden J, Broekaert WF (1992) Isolation and Characterization of a Novel Class of Plant Antimicrobial Peptides from *Mirabilis jalapa* L. Seeds. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 2228-2233

Cammue BP, Thevissen K, Hendriks M, Eggermont K, Goderis IJ, Proost P, Van Damme J, Osborn RW, Guerbet F, Kader JC, Broekaert WF (1995) A Potent Antimicrobial Protein from Onion Seeds Showing Sequence Homology to Plant Lipid Transfer Proteins. *Plant Physiology* 109: 445-455

Capparelli R, Palumbo D, Iannaccone M, Ventimiglia I, Di Salle E, Capuano F, Salvatore P, Amoroso MG (2006) Cloning and expression of two plant proteins: similar antimicrobial activity of native and recombinant form. *Biotechnology Letters* 28: 943-949

Castro MS, Fontes W (2005) Plant Defense and Antimicrobial Peptides. *Protein and Peptide Letters* 12: 11-16

Cornut I, Biittner K, Dasseux JL, Dufourcq J (1994) Application to the de novo design of ideally amphipathic Leu, Lys peptides with hemolytic activity higher than that of melittin. *FEBS Letters* 349: 29-33

Costa FT, Neto SM, Bloch C, Jr., Franco OL (2007) Susceptibility of human pathogenic bacteria to antimicrobial peptides from sesame kernels. *Current Microbiology* 55: 162-166

Daly NL, Rosengren KJ, Craik DJ (2009) Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 918-930

De Lucca AJ, Cleveland TE, Wedge DE (2005) Plant-derived antifungal proteins and peptides. *Canadian Journal of Microbiology* 51: 1001-1014

De Lucca AJ, Walsh TJ (1999) Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1-11

Díaz Dellavalle P, Cabrera A, Alem D, Larrañaga P, Ferreira F, Dalla Rizza M (2011) Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria spp.* *Chilean Journal of Agricultural Research* 71: 231-239

DIEA (2011) Encuesta Citrícola “Primavera 2010”. (Serie Encuestas N° 299). Estadística agropecuarias. (DIEA). pp 1-28

Dubreil L, Gaborit T, Bouchet B, Gallant DJ, Broekaert WF, Quillien L, Marion D (1998) Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein (ns-LTP1e1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Science* 138: 121-135

Eppe P, Apel K, Bohlmann H (1997) Overexpression of an Endogenous Thionin Enhances Resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell* 9: 509-520

Fanelli V, Cariddi C, Finetti-Sialer M (2007) Selective detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using dot blot hybridization and real-time PCR. Plant Pathology 56: 683–691

Fernández De Caleyá R, Gonzalez Pascua L B, García Olmedo F, Carbonero P (1972) Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins *in vitro*. Applied Microbiology 23: 998-1000

Franco OL, Murad AM, Leite JR, Mendes PA, Prates MV, Bloch C, Jr. (2006) Identification of a cowpea gamma-thionin with bactericidal activity. The FEBS journal 273: 3489-3497

Ganz T (2003a) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nature Reviews Immunology 3: 710-720

Ganz T (2003b) The Role of Antimicrobial Peptides in Innate Immunity. Integrative and Comparative Biology 43: 300–304

García Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodríguez Palenzuela P (1998) Plant Defense Peptides. Biopolymers 47: 479-491

Gartemann KH, Kirchner O, Engemann J, Gräfen I, Eichenlaub R, A Burger A (2003) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. Journal of Biotechnology 106: 79-191

Giudici M, Antonio Poveda J, Molina ML, de la Canal L, Gonzalez-Ros JM, Pfuller K, Pfuller U, Villalain J (2006) Antifungal effects and mechanism of action of viscotoxin A3. FEBS Journal 273: 72-83

Goswami RS, Kistler HC (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Molecular Plant Pathology 5: 515-525

Gustafson K, Sowder R, Henderson L, Parsons I, Kashman Y, Cardellina J, McMahon J, Buckheit R, Pannell L, Boyd M (1994) Circulins A and B: Novel HIV-inhibitory macrocyclic peptides from the tropical tree *Chassalia parvifolia*. Journal of the American Chemical Society. 116: 9337-9338

Hammami R, Ben Hamida J, Vergoten G, Fliss I (2009) PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. Nucleic Acids Research 37: D963-968

Hancock RE, Chapple DS (1999) Peptide Antibiotics. Antimicrobial agents and chemotherapy 43: 1317–1323

Hancock RE, Sahl HG (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nature Biotechnology 24: 1551-1557

Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases (mass spectrometry/in situ digestion/two-dimensional electrophoresis). Biochemistry 90: 5011-5015

Hoffmann E, Stroobant V (2007) Mass spectrometry : principles and applications

Hoshikawa K, Ishihara G, Takahashi H, Nakamura I (2012) Enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*) in transgenic potato plants expressing thionin genes isolated from *Brassicaceae* species. Plant Biotechnology 29: 87-93

Janisiewicz WJ, Pereira IB, Almeida MS, Roberts DP, Wisniewski M, Kurtenbach E (2008) Improved biocontrol of fruit decay fungi with *Pichia pastoris* recombinant strains expressing Psd1 antifungal peptide. Postharvest Biology and Technology 47: 218-225

Jha S, Chattoo BB (2009) Transgene Stacking and Coordinated Expression of Plant Defensins Confer Fungal Resistance in Rice. Rice 2: 143-154

Jones RW, Prusky D (2002) Expression of an antifungal peptide in *Saccharomyces*: a new approach for biological control of the postharvest disease caused by *Colletotrichum coccodes*. *Phytopathology* 92: 33-37

Kader JC (1996) Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 627-654

Koo JC, Lee SY, Chun HJ, Cheong YH, Choi JS, Kawabata S, Miyagi M, Tsunasawa S, Ha KS, Bae DW, Han CD, Lee BL, Cho MJ (1998) Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1382: 80-90

Kovalskaya N, Hammond RW (2009) Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snak-in-1 and defensin recombinant proteins. *Protein expression and purification* 63: 12-17

Lado J, Luque E, Silva G (2010) Manejo de la poscosecha en cítricos: desafíos para la innovación en un mercado dinámico. *Revista INIA* 22: 32-34

Larrañaga P, Díaz-Dellavalle P, Cabrera A, Alem D, Leoni C, Almeida-Souza AL, Giovanni-De-Simone S, Dalla-Rizza M (2012) Activity of Naturally Derived Antimicrobial Peptides against Filamentous Fungi Relevant for Agriculture. *Sustainable Agriculture Research*

Lattanzio V, Kroon PA, Linsalata V, Cardinali A (2009) Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods* 1: 131-144

Lay FT, Anderson MA (2005) Defensins – Components of the Innate Immune System in Plants. *Current Protein and Peptide Science* 6: 5-101

Lay FT, Brugliera F, Anderson MA (2003) Isolation and Properties of Floral Defensins from Ornamental Tobacco and Petunia. *Plant Physiology* 131: 1283-1293

- Li L, Wang JX, Zhao XF, Kang CJ, Liu N, Xiang JH, Li FH, Sueda S, Kondo H (2005) High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris*. Protein expression and purification 39: 144-151
- Li Y (2011) Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. Protein expression and purification 80: 260-267
- Lico C, Santi L, Twyman RM, Pezzotti M, Avesani L (2012) The use of plants for the production of therapeutic human peptides. Plant cell reports 31: 439-451
- Lipkin A, Anisimova V, Nikonorova A, Babakov A, Krause E, Bienert M, Grishin E, Egorov T (2005) An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. Phytochemistry 66: 2426-2431
- López-García B (2003) Comparison of the activity of antifungal hexapeptides and the fungicides thiabendazole and imazalil against postharvest fungal pathogens. International journal of food microbiology 89: 163-170
- Maeso D, Walasek W (2012) Evaluación de métodos para desinfectar semillas de tomate contra cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). Agrociencia 16: 134-142
- Makovitzki A, Viterbo A, Brotman Y, Chet I, Shai Y (2007) Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens *in vitro* and *in planta* with ultrashort cationic lipopeptides. Applied and environmental microbiology 73: 6629-6636
- Marcos JF, Muñoz A, Perez Paya E, Misra S, Lopez-Garcia B (2008) Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. Annual review of phytopathology 46: 273-301
- Matsuzaki K (2009) Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1788: 1687-1692

- Mazzilli S, Pérez C, Ernst O (2007) Fusariosis de la espiga en trigo: características de la enfermedad y posibilidades de uso de modelos de predicción para optimizar el control químico. *Agrociencia* 11 11-21
- Molina A, Segura A, Garcia Olmedo F (1993) Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Journal* 316: 119-122
- Morassutti C, Francesca De Amicisa F, Skerlavaj B, Zanetti M, Marchettia S (2002) Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS letters* 519: 141-146
- Moss MO (2002) Mycotoxin review *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologist* 16: 116-119
- Muñoz A, Lopez-Garcia B, Marcos JF (2006) Studies on the mode of action of the antifungal hexapeptide PAF26. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 3847-3855
- Muñoz A, López García B, Marcos JF (2007) Comparative Study of Antimicrobial Peptides To Control Citrus Postharvest Decay Caused by *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 8170–8176
- Natalini E, Rossi MP, Barionovi D, Scortichini M (2006) Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates associated with bud necrosis and leaf spot of pear in a single orchard. *Journal of Plant Pathology* 88: 219-223
- Nicolas P (2009) Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *The FEBS journal* 276: 6483-6496
- Nielsen LA, Nielsen JE, Madrid SM, Mikkelsen JD (1997) Characterization of a New Antifungal Chitin-Binding Peptide from Sugar Beet Leaves. *Plant Physiology*. 113: 83-91

Nijnik A, Hancock RE (2009) Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerging health threats journal* 2: e1

Oerke EC (2006) Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* 144: 31-43

Osborn RP, De Samblanx GW, Thevissen K, Goderis IJ, Torrekens S, Van Leuven F, Attenborough S, Rees SB, Broekaert WF (1995) Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS letters* 368 257-262

Pelegrini PB, Noronha EF, Muniz MAR, Vasconcelos IM, Chiarello MD, Oliveira JTA, Franco OL (2006) An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1764: 1141-1146

Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M (1999) Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization* 77: 754-766

Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3351-3567

Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA (2010) Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs? *Plos Pathogens* 6: 1-4

Ribeiro SF, Agizzio AP, Machado OL, Neves-Ferreira AG, Oliveira MA, Fernandes KV, Carvalho AO, Perales J, Gomes VM (2007) A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: Partial characterization and antifungal activity. *Scientia Horticulturae* 111: 399-405

Roberts WK, Selitrennikoff CP (1988) Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity. *Journal of General Microbiology* 134: 169-176

Sarika J, Iquebal MA, Rai A (2012) Biotic stress resistance in agriculture through antimicrobial peptides. *Peptides* 36: 322-330

Scopes R (1994) *Protein Purification, Principles and Practice*. Springer-Verlag, New York

Schagger H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* 1: 16-22

Selitrechnikoff CP (2001) Antifungal Proteins. *Applied and environmental microbiology* 67: 2883-2894

Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by K-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et biophysica acta* 1642: 55-70

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Frovenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150: 76-85

Song X, Zhou Z, Wang J, Fang Wua F, Gong W (2004) Purification, characterization and preliminary crystallographic studies of a novel plant defensin from *Pachyrrhizus erosus* seeds. *Acta Crystallographica* 60: 1121±1124

Steffen H, Rieg S, Wiedemann I, Kalbacher H, Deeg M, Sahl HG, Peschel A, Gotz F, Garbe C, Schitteck B (2006) Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 2608-2620

Swathi Anuradha T, Divya K, Jami SK, Kirti PB (2008) Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. *Plant cell reports* 27: 1777-1786

Taylor RH, Acland DP, Attenborough S, Cammue BPA, Evans IJ, Osborn RP, Ray JA, Rees SB, Broekaert WF (1997) A Novel Family of Small Cysteine-rich Antimicrobial

Peptides from Seed of *Impatiens balsamina* Is Derived from a Single Precursor Protein. The Journal of Biological Chemistry 272: 24480–24487

Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RP, Kester A, Rees S, Torrekem S, Van Leuven F, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. The Plant Cell. 7: 573-588

Terras FR, Goderis IJ, Van Leuven F, Vanderleyden J, Cammue BP, Broekaert WF (1992a) In Vitro Antifungal Activity of a Radish (*Raphanus sativus* L.) Seed Protein Homologous to Nonspecific Lipid Transfer Proteins. Plant Physiology. 100: 1055-1058

Terras FR, Schoofs HM, De Bolle MF, Van Leuven F, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BP, Broekaert WF (1992b) Analysis of Two Novel Classes of Plant Antifungal Proteins from Radish (*Raphanus sativus* L.) Seeds. The Journal of biological chemistry 267: 15301-15309,

Thevissen K, Kristensen HH, Thomma BP, Cammue BP, Francois IE (2007) Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. Drug discovery today 12: 966-971

Thevissen K, Warnecke DC, Francois IE, Leipelt M, Heinz E, Ott C, Zähringer U, Thomma BPH, Ferket KKA, Cammue BPA (2004) Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. Journal of Biological Chemistry 279: 3900-3905

Thomas S, Karnik S, Barai RS, Jayaraman VK, Idicula-Thomas S (2010) CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. Nucleic acids research 38: D774-780

Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K (2002) Plant defensins. Planta 216: 193-202

Torres H (2002) Tizón temprano. In: CIP (ed) Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú, pp 53-56

Tossi A, Sandri L, Giangaspero A (2000) Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *European Journal of Biochemistry* 268: 5589 - 5600

Vamanu E, Vamanu A, Nita S, Colceriu S (2011) Antioxidant and Antimicrobial Activities of Ethanol Extracts of *Cynara Scolymus* (*Cynarae folium*, *Asteraceae* Family). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 10: 777-783

van Loon LC, Rep P, Pieterse CM (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*. 44: 135-162

van Loon LC, van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85–97

van Parijs J, Broekaert WF, Goldstein IJ, Peumans WJ (1991) Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* 183: 258-226

Varela G, Jasinski C, Gadea P, Tanzi MN, Mota MI, Arenas C, Pardo L, González S, González G, Sirok A, Schelotto F (2007) *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Revista Médica del Uruguay* 23: 153-163

Vero S, Garmendia G, Garat F, Alaniz S, de Aurrecoechea I, Wozniak A, E. S (2005) Alternativas al tratamiento en poscosecha citrus. XII Congreso Latinoamericano, XXVIII Congreso Argentino de Horticultura, III Jornadas Argentinas de Poscosecha General Roca

Wang H, Ng TB (2004) Antifungal peptides, a heat shock protein-like peptide, and a serine–threonine kinase-like protein from *Ceylon spinach* seeds. *Peptides* 25: 1209-1214

Webster D, Taschereau P, Belland R, Sand C, Rennie R (2008) Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 140-146

Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols* 3: 163-175

Wilson K, Walker J (1994) Principles and techniques of practical biochemistry. Cambridge University press, Cambridge

Wu Y, He Y, Ge X (2011) Functional characterization of the recombinant antimicrobial peptide Trx-Ace-AMP1 and its application on the control of tomato early blight disease. *Applied microbiology and biotechnology* 90: 1303-1310

Yeats TH, Rose JK (2008) The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein science : a publication of the Protein Society* 17: 191-198

Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular. *Nature* 415: 389-395

9 ANEXOS

9.1 Anexo1: Identificación de proteínas por mapeo peptídico.

9.2 Anexo2: Blastp de fragmento identificado en mapeo peptídica.

9.3 Anexo3: Secuenciación del N-terminal por degradación de Edman.

9.4 Anexo4: Blastp del fragmento identificado por degradación de Edman.

Nombre: **Diego Alem**

Fecha: **29-08-2012**

Objetivo del análisis:

Identificación de proteínas por mapeo peptídico.

Datos relevantes:

Peptide mass fingerprinting of protein selected spots was carried out by in-gel trypsin treatment (Sequencing-grade Promega) overnight at 37°C. Peptides were extracted from the gels using 60% acetonitrile in 0.2% TFA, concentrated by vacuum drying and desalted using C18 reverse phase micro- columns (OMIX Pippete tips, Varian). Peptide elution from micro-column was performed directly into the mass spectrometer sample plate with 3 µl of matrix solution(α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 60% aqueous acetonitrile containing 0.2% TFA)

Mass spectra of digestion mixtures were acquired in a 4800 MALDI-TOF/TOF instrument (Applied Biosystems) in reflector mode and were externally calibrated using a mixture of peptide standards (Applied Biosystems). Collision-induced dissociation MS/MS experiments of selected peptides were performed.

Proteins were identified by NCBI database searching with peptide m/z values using the MASCOT program and using the following search parameters: monoisotopic mass tolerance, 0.05 Da; fragment mass tolerance, 0.25 Da; methionine oxidation, as possible modifications and one missed tryptic cleavage allowed.

En suma general del análisis:

Utilizando datos de ms y ms/ms, se identificaron las siguientes proteínas:

Rotulo de la muestra	Proteína identificada por EM	Masa mol. teórica (kDa.)	Link al resultado (Nro. pág.)
Muestra 5	EMB-1 protein	9900	2

1379.6396
1380.6287
1453.6492
1469.6414
1471.6497
1475.7709
1493.6938
1510.7175 ions(175.1402, 181.1440, 186.1398, 198.1341, 213.1282, 240.1438, 243.1616, 260.1689, 296.1059, 297.1837, 312.1896, 314.1698, 329.2494, 354.1729, 371.2039, 411.2539, 425.0986, 438.2002, 445.2549, 457.2596, 482.2450, 499.2592, 514.2903, 556.2595, 610.2784, 630.4249, 666.3854, 682.3550, 684.3950, 699.4023, 724.3776, 795.0049, 812.7111, 852.4369, 885.3741, 1037.5320, 1069.6155, 1165.5435, 1182.5334, 1255.0187)
1568.8212 ions(175.0680, 200.2132, 226.1279, 229.1933, 245.2130, 252.1330, 254.2072, 258.0626, 282.0909, 297.2650, 356.2574, 363.1636, 365.1686, 389.2554, 443.2494, 602.3726, 654.3823, 659.3560, 787.4343, 858.5224, 915.5057, 986.5854, 1114.3974, 1213.4495, 1341.4042, 1407.5835)
1599.7480
1620.9274 ions(175.1104, 186.1092, 226.1064, 229.1436, 242.1311, 253.1646, 258.1090, 258.2098, 271.1908, 297.1329, 299.1594, 323.1353, 329.2017, 355.2245, 357.1558, 366.2585, 382.2614, 410.1758, 414.1414, 414.2885, 424.2143, 427.1840, 428.2141, 470.2596, 499.2314, 499.3383, 524.2073, 524.3636, 544.2969, 567.2576, 584.3288, 609.2244, 655.3344, 669.8218, 706.3654, 723.3769, 768.3998, 836.5145, 1037.6769, 1375.7927, 1448.0365, 1448.7891, 1463.5321, 1464.7183, 1466.4816, 1467.0475, 1467.4210, 1560.2627, 1561.1509, 1577.9498, 1580.0654, 1602.5336)
1762.8137
1794.8257
1817.8392
1930.9138
1941.9468
2297.2153
2445.0852 ions(157.1296, 167.1111, 175.1741, 192.1104, 195.1516, 205.7166, 213.9941, 230.0565, 258.1805, 259.6591, 266.1406, 275.2475, 309.1506, 394.2111, 411.0473, 411.2908, 466.2445, 796.3236, 867.3818, 1099.5305, 1328.6862, 1330.5540, 1346.7917, 1349.6578, 1378.7775, 1380.7511, 1395.6293, 1412.7443, 1689.8784, 1827.0245, 1998.0586, 2043.0157, 2271.9287, 2288.8853, 2316.7114, 2319.5820, 2443.9421)
2501.1724 ions(252.0966, 253.1656, 257.1463, 259.9279, 312.1894, 314.1938, 329.1855, 354.1003, 392.1173, 420.2148, 458.3588, 531.1899, 605.0027, 605.2919, 643.3954, 716.2310, 750.0488, 823.3423, 828.4499, 941.6509, 948.4338, 956.6239, 977.5129, 1013.5809, 1076.5963, 1104.5457, 1150.6948, 1190.5803, 1207.6852, 1398.6237, 1415.7129, 1432.7758, 1489.7205, 1543.8298, 1560.8748, 1746.8209, 1858.9822, 1932.0658, 2118.0476, 2174.3123)
2525.1533 ions(222.8366, 235.0731, 239.1171, 245.1684, 254.0839, 254.2205, 257.6306, 289.1812, 384.0226, 394.0740, 400.1985, 447.1872, 475.8728, 553.3458, 554.3133, 711.3303, 793.9022, 798.3954, 812.4964, 821.3968, 825.2840, 887.2649, 975.5092, 977.2963, 1072.5466, 1090.4600, 1147.5599, 1432.7495, 1437.7067, 1599.7484, 1682.8284, 1838.0006, 1996.0532, 1996.9440, 2097.0940, 2367.9390, 2480.6555)
2692.3252
2740.3459
2757.2910 ions(195.0792, 209.1062, 226.0775, 239.0516, 240.1384, 243.1106, 257.1220, 283.1514, 312.0717, 312.1990, 314.0738, 314.2075, 315.0846, 329.1997, 368.1287, 385.2234, 392.1620, 420.2010, 425.1099, 457.2924, 494.3110, 496.2232, 500.2247, 588.2809, 643.3864, 662.3069, 685.2895, 734.2695, 790.2538, 790.5506, 823.4336, 828.4802, 879.5104, 919.1548, 956.6212, 976.3192, 993.5209, 1013.3334, 1013.5730, 1104.3687, 1104.6001, 1133.5448, 1150.6644, 1190.6338, 1207.6725, 1398.7830, 1414.7485, 1415.6224, 1432.8020, 1543.8376, 1560.9313, 1728.8857, 1747.0493, 1785.0042, 1915.0718, 1931.0806, 2101.2153, 2117.1794, 2373.3335, 2431.2178, 2501.2522, 2738.3760, 2739.2607, 2752.5649)
2787.0264

Search Parameters

Type of search : Sequence Query
Enzyme : Trypsin
Variable modifications : [Oxidation \(M\)](#)
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da
Fragment Mass Tolerance : ± 0.3 Da
Max Missed Cleavages : 1
Instrument type : MALDI-TOF-TOF
Number of queries : 38

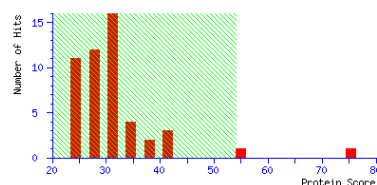
Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

(www.matrixscience.com)

Database : NCBItr 20120916 (20400525 sequences; 6998396483 residues)
Timestamp : 20 Sep 2012 at 17:05:29 GMT
Protein hits : [gi|119316](#) RecName: Full=EMB-1 protein
[gi|33151040](#) Em protein [Quercus robur]
[gi|32471316](#) ABC transporter permease [Rhodopirellula baltica SH 1]
[gi|194389414](#) unnamed protein product [Homo sapiens]
[gi|398863305](#) 4-oxalocrotonate tautomerase family enzyme [Pseudomonas sp. GM78]
[gi|254463873](#) dsba oxidoreductase [Rhodobacterales bacterium Y4I]
[gi|239615721](#) RNA binding effector protein Scp160 [Ajellomyces dermatitidis ER-3]
[gi|220918941](#) glycogen debranching protein [Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-1]
[gi|401410933](#) 3-dehydroquinase synthase, related [Neospora caninum Liverpool]
[gi|323327279](#) DEAD/DEAF box helicase domain-containing protein [Burkholderia sp. CCGE1001]
[gi|398401549](#) hypothetical protein TRIATDRAFT_260621 [Trichoderma atroviride IMI 206040]
[gi|255720589](#) hypothetical protein CTG_00010 [Candida tropicalis NYA-3404]
[gi|254380514](#) transposase IS4 protein [Streptomyces sp. Mgl]
[gi|342182759](#) unnamed protein product [Trypanosoma congolense IL3000]
[gi|402216900](#) ribonuclease H-like protein [Dacryopinax sp. DJM-731 SS1]
[gi|326532892](#) predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
[gi|224056236](#) predicted protein [Populus trichocarpa]
[gi|398384768](#) hypothetical protein PM104_02498 [Sphingobium sp. AP49]
[gi|395518964](#) PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: elongation factor 1-gamma-like [Sarcophilus harrisii]
[gi|289192770](#) CoB/CoM heterodisulfide reductase, subunit C [Methanocaldococcus sp. FS406-22]

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 54 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Link "peptide summary report":

http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20120920/FtGTCxcTt.dat

Link al protein view:

http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20120920%2FFtGTCxcTt.dat&hit=gi|119316&db_idx=1&px=1&ave_thresh=54&ignoreionsscorebelow=0&report=20&sigthresh=0.05&msresflags=1025&msresflags2=2&percolate=-1&percolate_rt=0&minpeplen=7

Institut Pasteur de Montevideo



Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Facultad de Ciencias

Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas

Conclusión:

- En esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa la proteína “Full=EMB-1 protein”.
- Quedaron muchas señales de m/z sin poder identificar.



Para uso interno, cortar antes de enviar!!!

Tipo de análisis	1	2 y 3	4	5	6	7	8
Nro de análisis							

Análisis tipo 1:

Medida puntual de masa por MALDI-TOF en una muestra pre-procesada.

Análisis tipo 2 y 3:

Identificación de una proteína por mapeo peptídico con tripsina y medida por MALDI-TOF, incluyendo los MS/MS

Análisis tipo 4:

Gel 2D 10x10cm + tinción con plata

Análisis tipo 5:

Gel 2D 20x20cm + tinción con plata

Análisis tipo 6:

Purificación usando 2D CleanUp kit

Análisis tipo 7:

Cuantificación usando 2D Quant kit

Análisis tipo 8:

HPLC analítico de péptidos/ proteínas (fase reversa)

9.2 Anexo2: Blastp de fragmento identificado en mapeo peptídica.

BLAST ®**Basic Local Alignment Search Tool**

[NCBI/ BLAST/ blastp suite/](#) **Formatting Results - ZZH4DYW7014**

[Formatting options](#)

[Download](#)

[Blast report description](#)

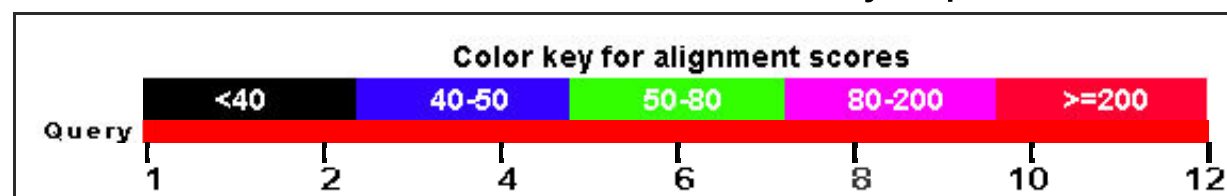
Protein Sequence (12 letters)

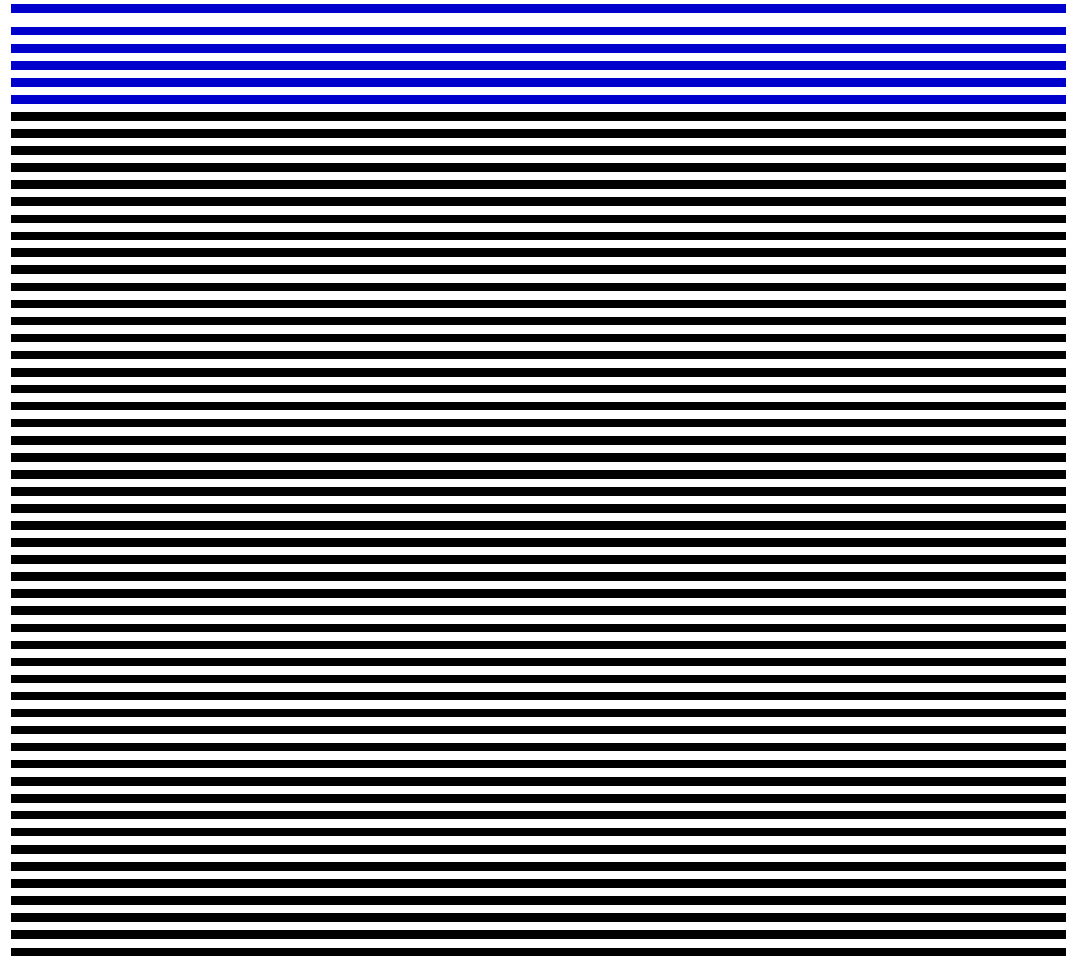
Query ID |cl|25274
Description None
Molecule type amino acid
Query Length 12

Database Name nr
Description All non-redundant GenBank CDS
translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding
environmental samples from WGS projects
Program BLASTP 2.2.28+

Graphic Summary

No putative conserved domains have been detected

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence



Descriptions

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
hypothetical protein CARUB_v10025705mg [Capsella rubella]	40.1	40.1	100%	0.005	100%	gi 482565224 EOA29414.1
hypothetical protein CARUB_v10016533mg [Capsella rubella]	40.1	40.1	100%	0.005	100%	gi 482547962 EOA12179.1
RecName: Full=EMB-1 protein >gi 18341 emb CAA35610.1 unnamed protein product [Daucus carota] >gi 505193 emb CAA42717.1 EMB-1 protein [Daucus carota] >gi 57506546 dbj BAD86647.1 EMB1 protein [Daucus carota]	40.1	40.1	100%	0.005	100%	gi 119316 P17639.1
uncharacterized protein LOC100500126 [Glycine max] >gi 255629381 gb ACU15035.1 unknown [Glycine max]	40.1	40.1	100%	0.005	100%	gi 351720728 NP_001237186.1
Em protein [Glycine max] >gi 1762955 gb AAB68027.1 late embryogenesis-abundant protein [Glycine max] >gi 2270988 gb AAB71224.1 Em protein [Glycine max]	40.1	40.1	100%	0.005	100%	gi 351723669 NP_001237287.1
PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.3-like [Cicer arietinum]	40.1	40.1	100%	0.005	100%	gi 502104215 XP_004492467.1
PREDICTED: EMB-1 protein-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	37.1	37.1	100%	0.045	92%	gi 470133553 XP_004302630.1
EM1 [Phoenix dactylifera]	37.1	37.1	100%	0.046	92%	gi 89275333 ABD66070.1
EMZ08 [Elaeis guineensis]	37.1	37.1	100%	0.048	92%	gi 89275331 ABD66069.1
PREDICTED: EMB-1 protein-like [Cucumis sativus] >gi 449517006 ref XP_004165537.1 PREDICTED: EMB-1 protein-like [Cucumis sativus]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 449461763 XP_004148611.1
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: em-like protein GEA6-like [Glycine max]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 356559144 XP_003547861.1

hypothetical protein SELMODRAFT_79811 [Selaginella moellendorffii] >gi 302799505 ref XP_002981511.1 hypothetical protein SELMODRAFT_114773 [Selaginella moellendorffii] >gi 300150677 gb EFJ17326.1 hypothetical protein SELMODRAFT_114773 [Selaginella moellendorffii] >gi 300168838 gb EFJ35441.1 hypothetical protein SELMODRAFT_79811 [Selaginella moellendorffii]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 302760295 XP_002963570.1
PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.1A-like [Setaria italica]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 514751534 XP_004962369.1
PREDICTED: em protein H5-like [Solanum lycopersicum]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 460390471 XP_004240855.1
PREDICTED: EMB-1 protein [Vitis vinifera] >gi 297736588 emb CBI25459.3 unnamed protein product [Vitis vinifera]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 225448479 XP_002274326.1
predicted protein [Populus trichocarpa] >gi 222864192 gb EEF01323.1 predicted protein [Populus trichocarpa]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 224109302 XP_002315152.1
Embryonic abundant protein, putative [Ricinus communis] >gi 223532264 gb EEF34067.1 Embryonic abundant protein, putative [Ricinus communis]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 255574804 XP_002528309.1
putative lea 1 [Arachis hypogaea]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 28194651 AAO33587.1
PREDICTED: EMB-1 protein-like [Vitis vinifera]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 225448477 XP_002273618.1
hypothetical protein VITISV_041257 [Vitis vinifera]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 147779324 CAN67857.1
LEA protein [Arachis hypogaea]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 66735602 AAY54009.1
late embryogenesis abundant protein group 1 protein [Arachis hypogaea]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 312599811 ADQ91831.1
PREDICTED: EMB-1 protein-like [Cicer arietinum]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 502147297 XP_004506729.1
late embryogenesis abundant protein group 1 protein [Arachis hypogaea]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 312599815 ADQ91833.1
Em protein [Robinia pseudoacacia]	37.1	37.1	100%	0.051	92%	gi 1754979 AAB39474.1
hypothetical protein PRUPE_ppa013838mg [Prunus persica]	37.1	37.1	100%	0.051	92%	gi 462401822 EMJ07379.1
Late embryogenesis abundant protein D-19						

[Medicago truncatula] >gi 77993668 gb ABB13462.1 Em6 [Medicago truncatula] >gi 355505778 gb AES86920.1 Late embryogenesis abundant protein D-19 [Medicago truncatula]	37.1	37.1	100%	0.051	92%	gi 357468877 XP_003604723.1
late embryogenesis abundant protein [Gossypium hirsutum] >gi 167330 gb AAA33057.1 embryogenesis abundant protein [Gossypium hirsutum] >gi 167353 gb AAB00728.1 water-stress protectant protein [Gossypium hirsutum] >gi 167355 gb AAA33064.1 late embryogenesis-abundant protein 2-D [Gossypium hirsutum]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 18499 CAA38374.1
water stress-related protein	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 444336 1906384B
late embryogenic abundant protein [Vigna radiata]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 3641278 AAC36329.1
EM protein [Vigna radiata]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 1141782 AAB07224.1
late embryogenic abundant protein [Arabidopsis thaliana] >gi 289201 gb AAA32825.1 late embryogenic abundant protein [Arabidopsis thaliana]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 289199 AAA62326.1
Em protein [Robinia pseudoacacia]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 1754977 AAB39473.1
PREDICTED: em-like protein GEA1-like [Glycine max]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 356568122 XP_003552262.1
unknown [Glycine max]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 255637579 ACU19115.1
Late seed maturation protein P8B6, putative [Ricinus communis] >gi 223529963 gb EEF31890.1 Late seed maturation protein P8B6, putative [Ricinus communis]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 255579322 XP_002530506.1
late embryogenesis abundant protein [Vigna radiata] >gi 148291150 emb CAN84534.1 late embryogenesis abundant protein [Vigna radiata] >gi 148291152 emb CAN84535.1 late embryogenesis abundant protein [Vigna radiata]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 146189786 CAM92311.1
Em-like protein [Daucus carota]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 57506544 BAD86646.1
hypothetical protein PRUPE_ppa020056mg [Prunus persica]	37.1	37.1	100%	0.054	92%	gi 462402210 EMJ07767.1
unnamed protein product [Vitis vinifera]	37.1	37.1	100%	0.056	92%	gi 297736589 CBI25460.3

PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.3-like [Vitis vinifera]	37.1	37.1	100%	0.056	92%	gi 225439384 XP_002263214.1
hypothetical protein SORBIDRAFT_09g016830 [Sorghum bicolor] >gi 112012415 gb ABH85404.1 late embryogenesis abundant protein [Sorghum bicolor] >gi 241944900 gb EES18045.1 hypothetical protein SORBIDRAFT_09g016830 [Sorghum bicolor]	37.1	37.1	100%	0.057	92%	gi 242087565 XP_002439615.1
predicted protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] >gi 297321942 gb EFH52363.1 predicted protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	37.1	37.1	100%	0.059	92%	gi 297816442 XP_002876104.1
Em-like protein GEA1 [Arabidopsis thaliana] >gi 1169515 sp Q07187.1 EM1_ARATH RecName: Full=Em-like protein GEA1; Short=EM1 >gi 298070 emb CAA77509.1 Em protein [Arabidopsis thaliana] >gi 298072 emb CAA77979.1 Em protein homologue [Arabidopsis thaliana] >gi 3068708 gb AAC14408.1 Em 1 protein [Arabidopsis thaliana] >gi 28393412 gb AAO42128.1 putative embryonic abundant protein AtEm 1 [Arabidopsis thaliana] >gi 28973119 gb AAO63884.1 putative embryonic abundant protein AtEm 1 [Arabidopsis thaliana] >gi 332645326 gb AEE78847.1 Em-like protein GEA1 [Arabidopsis thaliana]	37.1	37.1	100%	0.059	92%	gi 15231041 NP_190749.1
PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.4-like [Setaria italica] >gi 514751542 ref XP_004962371.1 PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.4-like [Setaria italica]	37.1	37.1	100%	0.059	92%	gi 514751538 XP_004962370.1
hypothetical protein CARUB_v10019332mg [Capsella rubella]	37.1	37.1	100%	0.063	92%	gi 482559139 EOA23330.1
RecName: Full=Late embryogenesis abundant protein B19.1A; Short=B19.1 >gi 19013 emb CAA44622.1 LEA B19.1 [Hordeum vulgare subsp. vulgare] >gi 370344316 gb AEX26871.1 late embryogenesis abundant protein [Hordeum vulgare]	36.3	36.3	100%	0.095	92%	gi 547817 Q05190.1

predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] >gi 472900832 gb EMS35667.1 hypothetical protein TRIUR3_27217 [Triticum urartu] >gi 475613697 gb EMT28843.1 hypothetical protein F775_26006 [Aegilops tauschii]	36.3	36.3	100%	0.095	92%	gi 326513238 BAK06859.1
RecName: Full=Late seed maturation protein P8B6 >gi 21122 emb CAA33479.1 unnamed protein product [Raphanus sativus] >gi 169692 gb AAA33868.1 late maturation protein [Raphanus sativus]	35.8	35.8	100%	0.12	92%	gi 134420 P11573.1
Em protein [Brassica napus]	35.8	35.8	100%	0.13	92%	gi 3183627 CAA05711.1
late embryogenesis-abundant protein [Brassica juncea]	35.8	35.8	100%	0.13	92%	gi 81022815 ABB55258.1
late embryogenesis-abundant protein [Brassica carinata]	35.8	35.8	100%	0.13	92%	gi 81022817 ABB55259.1
Em-like protein GEA6 [Arabidopsis thaliana] >gi 1169519 sp Q02973.1 EM6_ARATH RecName: Full=Em-like protein GEA6 >gi 4587991 gb AAD25932.1 AF085279_5 ATEM6 [Arabidopsis thaliana] >gi 13430490 gb AAK25867.1 AF360157_1 putative ABA-regulated protein ATEM6 [Arabidopsis thaliana] >gi 16295 emb CAA46821.1 late-embryogenesis abundant protein [Arabidopsis thaliana] >gi 298075 emb CAA77981.1 Em protein homologue [Arabidopsis thaliana] >gi 298077 emb CAA77982.1 Em protein homologue [Arabidopsis thaliana] >gi 21281004 gb AAM44933.1 putative ABA- regulated protein ATEM6 [Arabidopsis thaliana] >gi 330254698 gb AEC09792.1 Em-like protein GEA6 [Arabidopsis thaliana]	35.8	35.8	100%	0.13	92%	gi 15225645 NP_181546.1
early methionine-labelled 6 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] >gi 297327539 gb EFH57959.1 early methionine-labelled 6 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	35.8	35.8	100%	0.13	92%	gi 297827635 XP_002881700.1
Em protein [Arabidopsis thaliana] RecName: Full=Em protein H5	35.8	35.8	100%	0.13	92%	gi 556805 CAA77508.1

>gi 6138910 emb CAB59731.1 Em H5 protein [Triticum aestivum]	34.6	34.6	100%	0.35	83%	gi 1169518 P42755.1
late embryogenesis abundant protein group 1 protein [Arachis hypogaea]	34.6	34.6	91%	0.35	91%	gi 312599813 ADQ91832.1
Em protein [Vigna radiata]	34.6	34.6	83%	0.36	100%	gi 1141784 AAB07225.1
embryo specific protein5 [Zea mays] >gi 168467 gb AAA33458.1 late embryogenesis abundant protein [Zea mays] >gi 445606 prf 1909353A Emb5 gene	34.6	34.6	91%	0.38	91%	gi 162464017 NP_001105349.1
hypothetical protein TRIUR3_08907 [Triticum urartu]	34.6	34.6	100%	0.38	83%	gi 474411704 EMS66846.1
embryonic abundant protein 1 [Zea mays] >gi 413945089 gb AFW77738.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays]	34.6	34.6	91%	0.38	91%	gi 195623094 ACG33377.1
RecName: Full=Late embryogenesis abundant protein B19.3; Short=LEA B19.3 >gi 19015 emb CAA44623.1 LEA B19.3 [Hordeum vulgare subsp. vulgare] >gi 326500424 dbj BAK06301.1 predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	34.6	34.6	91%	0.40	91%	gi 547818 Q02400.1
RecName: Full=Late embryogenesis abundant protein B19.4 >gi 19017 emb CAA44624.1 LEA B19.4 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	34.6	34.6	91%	0.41	91%	gi 547819 Q05191.1
PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.4-like [Solanum lycopersicum]	34.1	34.1	100%	0.51	83%	gi 460401627 XP_004246319.1
Em protein [Quercus robur]	34.1	34.1	100%	0.52	83%	gi 33151040 AAP97398.1
lea protein 1 [Arachis hypogaea]	33.7	33.7	91%	0.67	91%	gi 71040659 AAZ20278.1
unnamed protein product [Vitis vinifera]	33.7	33.7	91%	0.73	91%	gi 296083178 CBI22814.3
Uncharacterized protein TCM_042480 [Theobroma cacao]	33.7	33.7	91%	0.74	91%	gi 508725844 EOY17741.1
embryonic abundant protein 1 [Zea mays] >gi 195607046 gb ACG25353.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays] >gi 195638704 gb ACG38820.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays] >gi 195658077 gb ACG48506.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays]						

>gi 195658137 gb ACG48536.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays]	33.3	33.3	100%	0.93	83%	gi 195605380 ACG24520.1
>gi 195658153 gb ACG48544.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays]						
>gi 195659191 gb ACG49063.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays]						
>gi 413945090 gb AFW77739.1 hypothetical protein ZEAMMB73_824230 [Zea mays]						
late embryogenesis abundant protein EMB564 [Zea mays] >gi 1169520 sp P46517.1 EMB5_MAIZE RecName: Full=Late embryogenesis abundant protein EMB564 >gi 22271 emb CAA39063.1 embryonic protein [Zea mays]	33.3	33.3	100%	0.93	83%	gi 162463828 NP_001105429.1
PREDICTED: em-like protein GEA1-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	33.3	33.3	100%	0.93	83%	gi 470133549 XP_004302628.1
RecName: Full=Em protein >gi 21733 emb CAA68322.1 unnamed protein product [Triticum aestivum]	33.3	33.3	100%	0.94	83%	gi 119313 P04568.1
>gi 4007838 emb CAA65308.1 Em protein [Triticum aestivum]						
Early-methionine-labelled polypeptide [Secale cereale] >gi 7594643 emb CAB88095.1 Early-methionine-labelled polypeptide [Secale cereale] >gi 7594649 emb CAB88088.1 Early-methionine-labelled polypeptide [Secale cereale]	33.3	33.3	100%	0.94	83%	gi 7594641 CAB88086.1
Early-methionine-labelled polypeptide [Secale cereale]	33.3	33.3	100%	0.94	83%	gi 7594645 CAB88096.1
hypothetical protein OsI_19553 [Oryza sativa Indica Group]	33.3	33.3	100%	0.95	83%	gi 125551921 EAY97630.1
Os05g0349800 [Oryza sativa Japonica Group] >gi 1169521 sp P46520.1 EMP1_ORYSJ RecName: Full=Embryonic abundant protein 1 >gi 20200 emb CAA44836.1 Emp1 [Oryza sativa Japonica Group] >gi 733119 gb AAA81015.1 similar to embryonic abundant protein emp1, PIR Accession Number S22483; similar to the product encoded by the wheat Em gene, Swiss-Prot Accession Number P22701 [Oryza sativa Japonica	33.3	33.3	100%	0.95	83%	gi 115463347 NP_001055273.1

Group] >gi|55168200|gb|AAV44066.1| LEA 1 [Oryza sativa Japonica Group]
 >gi|113578824|dbj|BAF17187.1| Os05g0349800 [Oryza sativa Japonica Group]
 >gi|215686566|dbj|BAG88819.1| unnamed protein product [Oryza sativa Japonica Group]
 >gi|222631224|gb|EEE63356.1| hypothetical protein OsJ_18167 [Oryza sativa Japonica Group]

Stress induced protein [Theobroma cacao]	32.9	32.9	100%	1.5	83%	gi 508715253 EOY07150.1
late embryogenesis-abundant protein 1a [Brassica napus]	32.5	32.5	91%	1.8	91%	gi 79150625 ABB52062.1
RecName: Full=10 kDa late embryogenesis abundant protein; AltName: Full=DS10 >gi 2828229 emb CAA42220.1 10 kDa Lea (Late embryogenesis abundant) protein [Helianthus annuus] >gi 3724199 emb CAA11834.1 ds10 [Helianthus annuus]	32.5	32.5	100%	1.8	83%	gi 3334471 P46514.2
Late embryogenesis abundant protein B19.1A [Theobroma cacao]	32.5	32.5	100%	1.8	83%	gi 508725845 EOY17742.1
hypothetical protein F775_26007 [Aegilops tauschii]	32.0	32.0	91%	2.8	82%	gi 475613698 EMT28844.1
PREDICTED: em-like protein GEA1-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	32.0	32.0	100%	2.8	83%	gi 470138757 XP_004305121.1
group 1 LEA protein [Physcomitrella patens]	31.6	31.6	100%	3.4	83%	gi 70608408 AAZ04476.1
PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.4-like [Brachypodium distachyon]	31.6	31.6	91%	3.9	82%	gi 357134071 XP_003568642.1
F0F1 ATP synthase subunit beta [Acidobacterium capsulatum ATCC 51196] >gi 506376468 ref WP_015896187.1 F0F1 ATP synthase subunit beta [Acidobacterium capsulatum] >gi 254808125 sp C1F3N6.1 ATPB_ACIC5 RecName: Full=ATP synthase subunit beta; AltName: Full=ATP synthase F1 sector subunit beta; AltName: Full=F-ATPase subunit beta >gi 225794312 gb ACO34402.1 ATP synthase F1, beta subunit [Acidobacterium capsulatum ATCC 51196]	30.8	30.8	91%	8.1	82%	gi 225872677 YP_002754134.1
RecName: Full=Em protein H2 >gi 312517 emb CAA51701.1 Em protein [Triticum						

aestivum] >gi 312519 emb CAA51700.1 Em protein [Triticum aestivum]	30.3	30.3	100%	9.0	75%	gi 1169516 Q08000.1
hypothetical protein PRUPE_ppa024075mg [Prunus persica]	30.3	30.3	91%	9.0	82%	gi 462416167 EMJ20904.1
Em-like protein [Picea glauca]	29.9	29.9	100%	12	75%	gi 1350538 AAB01568.1
RecName: Full=Em-like protein >gi 1161169 gb AAA85366.1 Em-like protein [Picea glauca] >gi 76782040 gb ABA54792.1 Em-like protein [Picea glauca]	29.9	29.9	100%	12	75%	gi 2494324 Q40864.1
>gi 76782072 gb ABA54808.1 Em-like protein [Picea mariana]						
Os01g0159600 [Oryza sativa Japonica Group] >gi 54290202 dbj BAD61090.1 unknown protein [Oryza sativa Japonica Group] >gi 113531617 dbj BAF04000.1 Os01g0159600 [Oryza sativa Japonica Group]						
>gi 215693788 dbj BAG88987.1 unnamed protein product [Oryza sativa Japonica Group] >gi 215768593 dbj BAH00822.1 unnamed protein product [Oryza sativa Japonica Group] >gi 218187560 gb EEC69987.1 hypothetical protein OsI_00498 [Oryza sativa Indica Group]	29.9	29.9	100%	12	75%	gi 115434656 NP_001042086.1
hypothetical protein OsJ_00464 [Oryza sativa Japonica Group]	29.9	29.9	100%	12	75%	gi 222617779 EEE53911.1
PREDICTED: late embryogenesis abundant protein EMB564-like [Setaria italica]	29.9	29.9	91%	12	82%	gi 514788918 XP_004971690.1
PREDICTED: embryonic abundant protein 1-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	29.9	29.9	100%	12	83%	gi 470146662 XP_004308941.1
PREDICTED: embryonic abundant protein 1-like [Brachypodium distachyon]	29.9	29.9	100%	12	75%	gi 357127392 XP_003565365.1
hypothetical protein SORBIDRAFT_03g005260 [Sorghum bicolor] >gi 241927134 gb EES00279.1 hypothetical protein SORBIDRAFT_03g005260 [Sorghum bicolor]	29.9	29.9	91%	12	82%	gi 242052027 XP_002455159.1
predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	29.9	29.9	91%	13	82%	gi 326499085 BAK06033.1
hypothetical protein F775_28400 [Aegilops]	29.9	29.9	91%	13	82%	gi 475601491 EMT24843.1

tauschii]

PREDICTED: em-like protein GEA1-like [Cucumis sativus]	29.9	29.9	100%	13	75%	gi 449517008 XP_004165538.1
PREDICTED: em-like protein GEA1-like [Cucumis sativus]	29.9	29.9	100%	13	75%	gi 449461809 XP_004148634.1
PREDICTED: em protein H2-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	29.9	29.9	100%	13	75%	gi 470138755 XP_004305120.1

Alignments

hypothetical protein CARUB_v10025705mg [Capsella rubella]

Sequence ID: [gi|482565224|gb|EOA29414.1](#) Length: 92 Number of Matches: 1

Range 1: 29 to 40

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
40.1 bits(87)	0.005()		12/12(100%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query  1  SLEAQQHLAEGR 12
        SLEAQQHLAEGR
Sbjct  29  SLEAQQHLAEGR 40

```

hypothetical protein CARUB_v10016533mg [Capsella rubella]

Sequence ID: [gi|482547962|gb|EOA12179.1](#) Length: 92 Number of Matches: 1

Range 1: 29 to 40

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
40.1 bits(87)	0.005()		12/12(100%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query  1  SLEAQQHLAEGR 12
        SLEAQQHLAEGR

```

Sbjct 29 SLEAQQHLAEGR 40

RecName: Full=EMB-1 protein

Sequence ID: **gi|119316|sp|P17639.1|EMB1_DAUCA** Length: 92 Number of Matches: 1

See 3 more title(s)

Range 1: 29 to 40

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
40.1 bits(87)	0.005()		12/12(100%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

Query 1 SLEAQQHLAEGR 12
SLEAQQHLAEGR
Sbjct 29 SLEAQQHLAEGR 40

uncharacterized protein LOC100500126 [Glycine max]

Sequence ID: **gi|351720728|ref|NP_001237186.1|** Length: 101 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 30 to 41

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
40.1 bits(87)	0.005()		12/12(100%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

Query 1 SLEAQQHLAEGR 12
SLEAQQHLAEGR
Sbjct 30 SLEAQQHLAEGR 41

Em protein [Glycine max]

Sequence ID: **gi|351723669|ref|NP_001237287.1|** Length: 105 Number of Matches: 1

See 2 more title(s)

Range 1: 30 to 41

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
40.1 bits(87)	0.005()		12/12(100%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query   1   SLEAQQHLAEGR   12
          SLEAQQHLAEGR
Sbjct   30  SLEAQQHLAEGR   41

```

PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.3-like [*Cicer arietinum*]

Sequence ID: [gi|502104215|ref|XP_004492467.1|](#) Length: 113 Number of Matches: 1

Range 1: 31 to 42

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
40.1 bits(87)	0.005()		12/12(100%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query   1   SLEAQQHLAEGR   12
          SLEAQQHLAEGR
Sbjct   31  SLEAQQHLAEGR   42

```

PREDICTED: EMB-1 protein-like [*Fragaria vesca* subsp. *vesca*]

Sequence ID: [gi|470133553|ref|XP_004302630.1|](#) Length: 80 Number of Matches: 1

Range 1: 36 to 47

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
37.1 bits(80)	0.045()		11/12(92%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query   1   SLEAQQHLAEGR   12
          SLEAQ+HLAEGR
Sbjct   36  SLEAQEHLAEGR   47

```

EM1 [*Phoenix dactylifera*]

Sequence ID: **gi|89275333|gb|ABD66070.1|** Length: 82 Number of Matches: 1

Range 1: 21 to 32

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
37.1 bits(80)	0.046()		11/12(92%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query  1  SLEAQQHLAEGR  12
        SLEAQ+HLAEGR
Sbjct  21  SLEAQEHLAEGR  32
  
```

EMZ08 [*Elaeis guineensis*]

Sequence ID: **gi|89275331|gb|ABD66069.1|** Length: 90 Number of Matches: 1

Range 1: 29 to 40

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
37.1 bits(80)	0.048()		11/12(92%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query  1  SLEAQQHLAEGR  12
        SLEAQ+HLAEGR
Sbjct  29  SLEAQEHLAEGR  40
  
```

PREDICTED: EMB-1 protein-like [*Cucumis sativus*]

Sequence ID: **gi|449461763|ref|XP_004148611.1|** Length: 91 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 29 to 40

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
37.1 bits(80)	0.049()		11/12(92%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query  1  SLEAQQHLAEGR  12
        SLEAQ+HLAEGR
Sbjct  29  SLEAQEHLAEGR  40
  
```


BLAST ®**Basic Local Alignment Search Tool**

[NCBI/ BLAST/ blastp suite/](#) **Formatting Results - ZZH4DYW7014**

[Formatting options](#)

[Download](#)

[Blast report description](#)

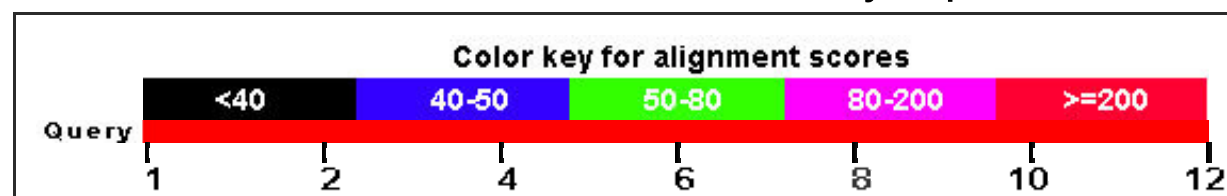
Protein Sequence (12 letters)

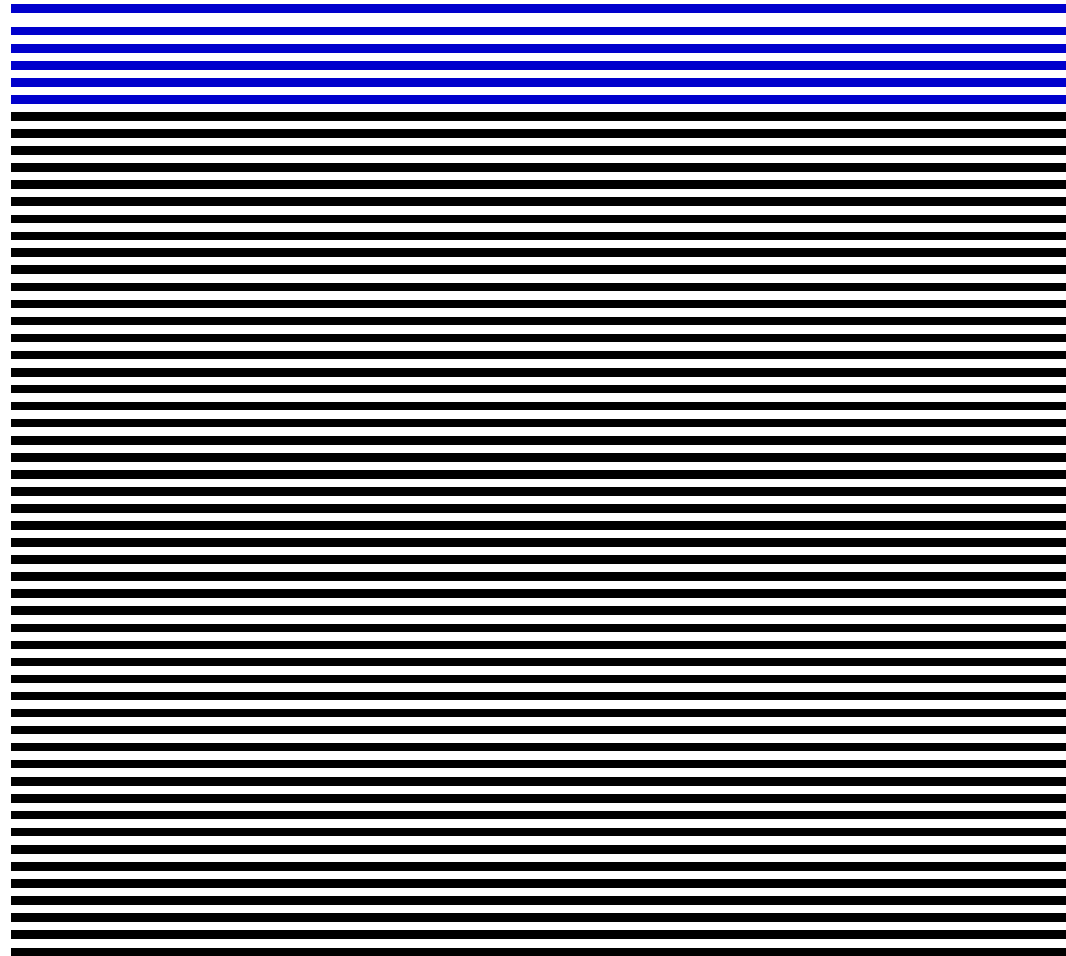
Query ID |cl|25274
Description None
Molecule type amino acid
Query Length 12

Database Name nr
Description All non-redundant GenBank CDS
translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding
environmental samples from WGS projects
Program BLASTP 2.2.28+

Graphic Summary

No putative conserved domains have been detected

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence



Descriptions

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
hypothetical protein CARUB_v10025705mg [Capsella rubella]	40.1	40.1	100%	0.005	100%	gi 482565224 EOA29414.1
hypothetical protein CARUB_v10016533mg [Capsella rubella]	40.1	40.1	100%	0.005	100%	gi 482547962 EOA12179.1
RecName: Full=EMB-1 protein >gi 18341 emb CAA35610.1 unnamed protein product [Daucus carota] >gi 505193 emb CAA42717.1 EMB-1 protein [Daucus carota] >gi 57506546 dbj BAD86647.1 EMB1 protein [Daucus carota]	40.1	40.1	100%	0.005	100%	gi 119316 P17639.1
uncharacterized protein LOC100500126 [Glycine max] >gi 255629381 gb ACU15035.1 unknown [Glycine max]	40.1	40.1	100%	0.005	100%	gi 351720728 NP_001237186.1
Em protein [Glycine max] >gi 1762955 gb AAB68027.1 late embryogenesis-abundant protein [Glycine max] >gi 2270988 gb AAB71224.1 Em protein [Glycine max]	40.1	40.1	100%	0.005	100%	gi 351723669 NP_001237287.1
PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.3-like [Cicer arietinum]	40.1	40.1	100%	0.005	100%	gi 502104215 XP_004492467.1
PREDICTED: EMB-1 protein-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	37.1	37.1	100%	0.045	92%	gi 470133553 XP_004302630.1
EM1 [Phoenix dactylifera]	37.1	37.1	100%	0.046	92%	gi 89275333 ABD66070.1
EMZ08 [Elaeis guineensis]	37.1	37.1	100%	0.048	92%	gi 89275331 ABD66069.1
PREDICTED: EMB-1 protein-like [Cucumis sativus] >gi 449517006 ref XP_004165537.1 PREDICTED: EMB-1 protein-like [Cucumis sativus]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 449461763 XP_004148611.1
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: em-like protein GEA6-like [Glycine max]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 356559144 XP_003547861.1

hypothetical protein SELMODRAFT_79811 [Selaginella moellendorffii] >gi 302799505 ref XP_002981511.1 hypothetical protein SELMODRAFT_114773 [Selaginella moellendorffii] >gi 300150677 gb EFJ17326.1 hypothetical protein SELMODRAFT_114773 [Selaginella moellendorffii] >gi 300168838 gb EFJ35441.1 hypothetical protein SELMODRAFT_79811 [Selaginella moellendorffii]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 302760295 XP_002963570.1
PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.1A-like [Setaria italica]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 514751534 XP_004962369.1
PREDICTED: em protein H5-like [Solanum lycopersicum]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 460390471 XP_004240855.1
PREDICTED: EMB-1 protein [Vitis vinifera] >gi 297736588 emb CBI25459.3 unnamed protein product [Vitis vinifera]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 225448479 XP_002274326.1
predicted protein [Populus trichocarpa] >gi 222864192 gb EEF01323.1 predicted protein [Populus trichocarpa]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 224109302 XP_002315152.1
Embryonic abundant protein, putative [Ricinus communis] >gi 223532264 gb EEF34067.1 Embryonic abundant protein, putative [Ricinus communis]	37.1	37.1	100%	0.049	92%	gi 255574804 XP_002528309.1
putative lea 1 [Arachis hypogaea]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 28194651 AAO33587.1
PREDICTED: EMB-1 protein-like [Vitis vinifera]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 225448477 XP_002273618.1
hypothetical protein VITISV_041257 [Vitis vinifera]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 147779324 CAN67857.1
LEA protein [Arachis hypogaea]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 66735602 AAY54009.1
late embryogenesis abundant protein group 1 protein [Arachis hypogaea]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 312599811 ADQ91831.1
PREDICTED: EMB-1 protein-like [Cicer arietinum]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 502147297 XP_004506729.1
late embryogenesis abundant protein group 1 protein [Arachis hypogaea]	37.1	37.1	100%	0.050	92%	gi 312599815 ADQ91833.1
Em protein [Robinia pseudoacacia]	37.1	37.1	100%	0.051	92%	gi 1754979 AAB39474.1
hypothetical protein PRUPE_ppa013838mg [Prunus persica]	37.1	37.1	100%	0.051	92%	gi 462401822 EMJ07379.1
Late embryogenesis abundant protein D-19						

[Medicago truncatula] >gi 77993668 gb ABB13462.1 Em6 [Medicago truncatula] >gi 355505778 gb AES86920.1 Late embryogenesis abundant protein D-19 [Medicago truncatula]	37.1	37.1	100%	0.051	92%	gi 357468877 XP_003604723.1
late embryogenesis abundant protein [Gossypium hirsutum] >gi 167330 gb AAA33057.1 embryogenesis abundant protein [Gossypium hirsutum] >gi 167353 gb AAB00728.1 water-stress protectant protein [Gossypium hirsutum] >gi 167355 gb AAA33064.1 late embryogenesis-abundant protein 2-D [Gossypium hirsutum]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 18499 CAA38374.1
water stress-related protein	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 444336 1906384B
late embryogenic abundant protein [Vigna radiata]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 3641278 AAC36329.1
EM protein [Vigna radiata]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 1141782 AAB07224.1
late embryogenic abundant protein [Arabidopsis thaliana] >gi 289201 gb AAA32825.1 late embryogenic abundant protein [Arabidopsis thaliana]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 289199 AAA62326.1
Em protein [Robinia pseudoacacia]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 1754977 AAB39473.1
PREDICTED: em-like protein GEA1-like [Glycine max]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 356568122 XP_003552262.1
unknown [Glycine max]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 255637579 ACU19115.1
Late seed maturation protein P8B6, putative [Ricinus communis] >gi 223529963 gb EEF31890.1 Late seed maturation protein P8B6, putative [Ricinus communis]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 255579322 XP_002530506.1
late embryogenesis abundant protein [Vigna radiata] >gi 148291150 emb CAN84534.1 late embryogenesis abundant protein [Vigna radiata] >gi 148291152 emb CAN84535.1 late embryogenesis abundant protein [Vigna radiata]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 146189786 CAM92311.1
Em-like protein [Daucus carota]	37.1	37.1	100%	0.053	92%	gi 57506544 BAD86646.1
hypothetical protein PRUPE_ppa020056mg [Prunus persica]	37.1	37.1	100%	0.054	92%	gi 462402210 EMJ07767.1
unnamed protein product [Vitis vinifera]	37.1	37.1	100%	0.056	92%	gi 297736589 CBI25460.3

PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.3-like [Vitis vinifera]	37.1	37.1	100%	0.056	92%	gi 225439384 XP_002263214.1
hypothetical protein SORBIDRAFT_09g016830 [Sorghum bicolor] >gi 112012415 gb ABH85404.1 late embryogenesis abundant protein [Sorghum bicolor] >gi 241944900 gb EES18045.1 hypothetical protein SORBIDRAFT_09g016830 [Sorghum bicolor]	37.1	37.1	100%	0.057	92%	gi 242087565 XP_002439615.1
predicted protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] >gi 297321942 gb EFH52363.1 predicted protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	37.1	37.1	100%	0.059	92%	gi 297816442 XP_002876104.1
Em-like protein GEA1 [Arabidopsis thaliana] >gi 1169515 sp Q07187.1 EM1_ARATH RecName: Full=Em-like protein GEA1; Short=EM1 >gi 298070 emb CAA77509.1 Em protein [Arabidopsis thaliana] >gi 298072 emb CAA77979.1 Em protein homologue [Arabidopsis thaliana] >gi 3068708 gb AAC14408.1 Em 1 protein [Arabidopsis thaliana] >gi 28393412 gb AAO42128.1 putative embryonic abundant protein AtEm 1 [Arabidopsis thaliana] >gi 28973119 gb AAO63884.1 putative embryonic abundant protein AtEm 1 [Arabidopsis thaliana] >gi 332645326 gb AEE78847.1 Em-like protein GEA1 [Arabidopsis thaliana]	37.1	37.1	100%	0.059	92%	gi 15231041 NP_190749.1
PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.4-like [Setaria italica] >gi 514751542 ref XP_004962371.1 PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.4-like [Setaria italica]	37.1	37.1	100%	0.059	92%	gi 514751538 XP_004962370.1
hypothetical protein CARUB_v10019332mg [Capsella rubella]	37.1	37.1	100%	0.063	92%	gi 482559139 EOA23330.1
RecName: Full=Late embryogenesis abundant protein B19.1A; Short=B19.1 >gi 19013 emb CAA44622.1 LEA B19.1 [Hordeum vulgare subsp. vulgare] >gi 370344316 gb AEX26871.1 late embryogenesis abundant protein [Hordeum vulgare]	36.3	36.3	100%	0.095	92%	gi 547817 Q05190.1

predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] >gi 472900832 gb EMS35667.1 hypothetical protein TRIUR3_27217 [Triticum urartu] >gi 475613697 gb EMT28843.1 hypothetical protein F775_26006 [Aegilops tauschii]	36.3	36.3	100%	0.095	92%	gi 326513238 BAK06859.1
RecName: Full=Late seed maturation protein P8B6 >gi 21122 emb CAA33479.1 unnamed protein product [Raphanus sativus] >gi 169692 gb AAA33868.1 late maturation protein [Raphanus sativus]	35.8	35.8	100%	0.12	92%	gi 134420 P11573.1
Em protein [Brassica napus]	35.8	35.8	100%	0.13	92%	gi 3183627 CAA05711.1
late embryogenesis-abundant protein [Brassica juncea]	35.8	35.8	100%	0.13	92%	gi 81022815 ABB55258.1
late embryogenesis-abundant protein [Brassica carinata]	35.8	35.8	100%	0.13	92%	gi 81022817 ABB55259.1
Em-like protein GEA6 [Arabidopsis thaliana] >gi 1169519 sp Q02973.1 EM6_ARATH RecName: Full=Em-like protein GEA6 >gi 4587991 gb AAD25932.1 AF085279_5 ATEM6 [Arabidopsis thaliana] >gi 13430490 gb AAK25867.1 AF360157_1 putative ABA-regulated protein ATEM6 [Arabidopsis thaliana] >gi 16295 emb CAA46821.1 late-embryogenesis abundant protein [Arabidopsis thaliana] >gi 298075 emb CAA77981.1 Em protein homologue [Arabidopsis thaliana] >gi 298077 emb CAA77982.1 Em protein homologue [Arabidopsis thaliana] >gi 21281004 gb AAM44933.1 putative ABA- regulated protein ATEM6 [Arabidopsis thaliana] >gi 330254698 gb AEC09792.1 Em-like protein GEA6 [Arabidopsis thaliana]	35.8	35.8	100%	0.13	92%	gi 15225645 NP_181546.1
early methionine-labelled 6 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] >gi 297327539 gb EFH57959.1 early methionine-labelled 6 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	35.8	35.8	100%	0.13	92%	gi 297827635 XP_002881700.1
Em protein [Arabidopsis thaliana] RecName: Full=Em protein H5	35.8	35.8	100%	0.13	92%	gi 556805 CAA77508.1

>gi 6138910 emb CAB59731.1 Em H5 protein [Triticum aestivum]	34.6	34.6	100%	0.35	83%	gi 1169518 P42755.1
late embryogenesis abundant protein group 1 protein [Arachis hypogaea]	34.6	34.6	91%	0.35	91%	gi 312599813 ADQ91832.1
Em protein [Vigna radiata]	34.6	34.6	83%	0.36	100%	gi 1141784 AAB07225.1
embryo specific protein5 [Zea mays] >gi 168467 gb AAA33458.1 late embryogenesis abundant protein [Zea mays] >gi 445606 prf 1909353A Emb5 gene	34.6	34.6	91%	0.38	91%	gi 162464017 NP_001105349.1
hypothetical protein TRIUR3_08907 [Triticum urartu]	34.6	34.6	100%	0.38	83%	gi 474411704 EMS66846.1
embryonic abundant protein 1 [Zea mays] >gi 413945089 gb AFW77738.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays]	34.6	34.6	91%	0.38	91%	gi 195623094 ACG33377.1
RecName: Full=Late embryogenesis abundant protein B19.3; Short=LEA B19.3 >gi 19015 emb CAA44623.1 LEA B19.3 [Hordeum vulgare subsp. vulgare] >gi 326500424 dbj BAK06301.1 predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	34.6	34.6	91%	0.40	91%	gi 547818 Q02400.1
RecName: Full=Late embryogenesis abundant protein B19.4 >gi 19017 emb CAA44624.1 LEA B19.4 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	34.6	34.6	91%	0.41	91%	gi 547819 Q05191.1
PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.4-like [Solanum lycopersicum]	34.1	34.1	100%	0.51	83%	gi 460401627 XP_004246319.1
Em protein [Quercus robur]	34.1	34.1	100%	0.52	83%	gi 33151040 AAP97398.1
lea protein 1 [Arachis hypogaea]	33.7	33.7	91%	0.67	91%	gi 71040659 AAZ20278.1
unnamed protein product [Vitis vinifera]	33.7	33.7	91%	0.73	91%	gi 296083178 CBI22814.3
Uncharacterized protein TCM_042480 [Theobroma cacao]	33.7	33.7	91%	0.74	91%	gi 508725844 EOY17741.1
embryonic abundant protein 1 [Zea mays] >gi 195607046 gb ACG25353.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays] >gi 195638704 gb ACG38820.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays] >gi 195658077 gb ACG48506.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays]						

>gi 195658137 gb ACG48536.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays]	33.3	33.3	100%	0.93	83%	gi 195605380 ACG24520.1
>gi 195658153 gb ACG48544.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays]						
>gi 195659191 gb ACG49063.1 embryonic abundant protein 1 [Zea mays]						
>gi 413945090 gb AFW77739.1 hypothetical protein ZEAMMB73_824230 [Zea mays]						
late embryogenesis abundant protein EMB564 [Zea mays] >gi 1169520 sp P46517.1 EMB5_MAIZE RecName: Full=Late embryogenesis abundant protein EMB564 >gi 22271 emb CAA39063.1 embryonic protein [Zea mays]	33.3	33.3	100%	0.93	83%	gi 162463828 NP_001105429.1
PREDICTED: em-like protein GEA1-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	33.3	33.3	100%	0.93	83%	gi 470133549 XP_004302628.1
RecName: Full=Em protein >gi 21733 emb CAA68322.1 unnamed protein product [Triticum aestivum]	33.3	33.3	100%	0.94	83%	gi 119313 P04568.1
>gi 4007838 emb CAA65308.1 Em protein [Triticum aestivum]						
Early-methionine-labelled polypeptide [Secale cereale] >gi 7594643 emb CAB88095.1 Early-methionine-labelled polypeptide [Secale cereale] >gi 7594649 emb CAB88088.1 Early-methionine-labelled polypeptide [Secale cereale]	33.3	33.3	100%	0.94	83%	gi 7594641 CAB88086.1
Early-methionine-labelled polypeptide [Secale cereale]	33.3	33.3	100%	0.94	83%	gi 7594645 CAB88096.1
hypothetical protein OsI_19553 [Oryza sativa Indica Group]	33.3	33.3	100%	0.95	83%	gi 125551921 EAY97630.1
Os05g0349800 [Oryza sativa Japonica Group] >gi 1169521 sp P46520.1 EMP1_ORYSJ RecName: Full=Embryonic abundant protein 1 >gi 20200 emb CAA44836.1 Emp1 [Oryza sativa Japonica Group] >gi 733119 gb AAA81015.1 similar to embryonic abundant protein emp1, PIR Accession Number S22483; similar to the product encoded by the wheat Em gene, Swiss-Prot Accession Number P22701 [Oryza sativa Japonica	33.3	33.3	100%	0.95	83%	gi 115463347 NP_001055273.1

Group] >gi|55168200|gb|AAV44066.1| LEA 1 [Oryza sativa Japonica Group]
 >gi|113578824|dbj|BAF17187.1| Os05g0349800 [Oryza sativa Japonica Group]
 >gi|215686566|dbj|BAG88819.1| unnamed protein product [Oryza sativa Japonica Group]
 >gi|222631224|gb|EEE63356.1| hypothetical protein OsJ_18167 [Oryza sativa Japonica Group]

Stress induced protein [Theobroma cacao]	32.9	32.9	100%	1.5	83%	gi 508715253 EOY07150.1
late embryogenesis-abundant protein 1a [Brassica napus]	32.5	32.5	91%	1.8	91%	gi 79150625 ABB52062.1
RecName: Full=10 kDa late embryogenesis abundant protein; AltName: Full=DS10 >gi 2828229 emb CAA42220.1 10 kDa Lea (Late embryogenesis abundant) protein [Helianthus annuus] >gi 3724199 emb CAA11834.1 ds10 [Helianthus annuus]	32.5	32.5	100%	1.8	83%	gi 3334471 P46514.2
Late embryogenesis abundant protein B19.1A [Theobroma cacao]	32.5	32.5	100%	1.8	83%	gi 508725845 EOY17742.1
hypothetical protein F775_26007 [Aegilops tauschii]	32.0	32.0	91%	2.8	82%	gi 475613698 EMT28844.1
PREDICTED: em-like protein GEA1-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	32.0	32.0	100%	2.8	83%	gi 470138757 XP_004305121.1
group 1 LEA protein [Physcomitrella patens]	31.6	31.6	100%	3.4	83%	gi 70608408 AAZ04476.1
PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.4-like [Brachypodium distachyon]	31.6	31.6	91%	3.9	82%	gi 357134071 XP_003568642.1
F0F1 ATP synthase subunit beta [Acidobacterium capsulatum ATCC 51196] >gi 506376468 ref WP_015896187.1 F0F1 ATP synthase subunit beta [Acidobacterium capsulatum] >gi 254808125 sp C1F3N6.1 ATPB_ACIC5 RecName: Full=ATP synthase subunit beta; AltName: Full=ATP synthase F1 sector subunit beta; AltName: Full=F-ATPase subunit beta >gi 225794312 gb ACO34402.1 ATP synthase F1, beta subunit [Acidobacterium capsulatum ATCC 51196]	30.8	30.8	91%	8.1	82%	gi 225872677 YP_002754134.1
RecName: Full=Em protein H2 >gi 312517 emb CAA51701.1 Em protein [Triticum						

aestivum] >gi 312519 emb CAA51700.1 Em protein [Triticum aestivum]	30.3	30.3	100%	9.0	75%	gi 1169516 Q08000.1
hypothetical protein PRUPE_ppa024075mg [Prunus persica]	30.3	30.3	91%	9.0	82%	gi 462416167 EMJ20904.1
Em-like protein [Picea glauca]	29.9	29.9	100%	12	75%	gi 1350538 AAB01568.1
RecName: Full=Em-like protein >gi 1161169 gb AAA85366.1 Em-like protein [Picea glauca] >gi 76782040 gb ABA54792.1 Em-like protein [Picea glauca]	29.9	29.9	100%	12	75%	gi 2494324 Q40864.1
>gi 76782072 gb ABA54808.1 Em-like protein [Picea mariana]						
Os01g0159600 [Oryza sativa Japonica Group] >gi 54290202 dbj BAD61090.1 unknown protein [Oryza sativa Japonica Group] >gi 113531617 dbj BAF04000.1 Os01g0159600 [Oryza sativa Japonica Group]						
>gi 215693788 dbj BAG88987.1 unnamed protein product [Oryza sativa Japonica Group] >gi 215768593 dbj BAH00822.1 unnamed protein product [Oryza sativa Japonica Group] >gi 218187560 gb EEC69987.1 hypothetical protein OsI_00498 [Oryza sativa Indica Group]	29.9	29.9	100%	12	75%	gi 115434656 NP_001042086.1
hypothetical protein OsJ_00464 [Oryza sativa Japonica Group]	29.9	29.9	100%	12	75%	gi 222617779 EEE53911.1
PREDICTED: late embryogenesis abundant protein EMB564-like [Setaria italica]	29.9	29.9	91%	12	82%	gi 514788918 XP_004971690.1
PREDICTED: embryonic abundant protein 1-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	29.9	29.9	100%	12	83%	gi 470146662 XP_004308941.1
PREDICTED: embryonic abundant protein 1-like [Brachypodium distachyon]	29.9	29.9	100%	12	75%	gi 357127392 XP_003565365.1
hypothetical protein SORBIDRAFT_03g005260 [Sorghum bicolor] >gi 241927134 gb EES00279.1 hypothetical protein SORBIDRAFT_03g005260 [Sorghum bicolor]	29.9	29.9	91%	12	82%	gi 242052027 XP_002455159.1
predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	29.9	29.9	91%	13	82%	gi 326499085 BAK06033.1
hypothetical protein F775_28400 [Aegilops]	29.9	29.9	91%	13	82%	gi 475601491 EMT24843.1

tauschii]

PREDICTED: em-like protein GEA1-like [Cucumis sativus]	29.9	29.9	100%	13	75%	gi 449517008 XP_004165538.1
PREDICTED: em-like protein GEA1-like [Cucumis sativus]	29.9	29.9	100%	13	75%	gi 449461809 XP_004148634.1
PREDICTED: em protein H2-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	29.9	29.9	100%	13	75%	gi 470138755 XP_004305120.1

Alignments

hypothetical protein CARUB_v10025705mg [Capsella rubella]

Sequence ID: [gi|482565224|gb|EOA29414.1](#) Length: 92 Number of Matches: 1

Range 1: 29 to 40

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
40.1 bits(87)	0.005()		12/12(100%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query   1   SLEAQQHLAEGR 12
          SLEAQQHLAEGR
Sbjct   29  SLEAQQHLAEGR 40

```

hypothetical protein CARUB_v10016533mg [Capsella rubella]

Sequence ID: [gi|482547962|gb|EOA12179.1](#) Length: 92 Number of Matches: 1

Range 1: 29 to 40

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
40.1 bits(87)	0.005()		12/12(100%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query   1   SLEAQQHLAEGR 12
          SLEAQQHLAEGR

```

Sbjct 29 SLEAQQHLAEGR 40

RecName: Full=EMB-1 protein

Sequence ID: **gi|119316|sp|P17639.1|EMB1_DAUCA** Length: 92 Number of Matches: 1

See 3 more title(s)

Range 1: 29 to 40

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
40.1 bits(87)	0.005()		12/12(100%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

Query 1 SLEAQQHLAEGR 12
 SLEAQQHLAEGR
 Sbjct 29 SLEAQQHLAEGR 40

uncharacterized protein LOC100500126 [Glycine max]

Sequence ID: **gi|351720728|ref|NP_001237186.1|** Length: 101 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 30 to 41

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
40.1 bits(87)	0.005()		12/12(100%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

Query 1 SLEAQQHLAEGR 12
 SLEAQQHLAEGR
 Sbjct 30 SLEAQQHLAEGR 41

Em protein [Glycine max]

Sequence ID: **gi|351723669|ref|NP_001237287.1|** Length: 105 Number of Matches: 1

See 2 more title(s)

Range 1: 30 to 41

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
40.1 bits(87)	0.005()		12/12(100%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query   1   SLEAQQHLAEGR   12
          SLEAQQHLAEGR
Sbjct   30  SLEAQQHLAEGR   41

```

PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.3-like [*Cicer arietinum*]Sequence ID: [gi|502104215|ref|XP_004492467.1|](#) Length: 113 Number of Matches: 1

Range 1: 31 to 42

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
40.1 bits(87)	0.005()		12/12(100%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query   1   SLEAQQHLAEGR   12
          SLEAQQHLAEGR
Sbjct   31  SLEAQQHLAEGR   42

```

PREDICTED: EMB-1 protein-like [*Fragaria vesca* subsp. *vesca*]Sequence ID: [gi|470133553|ref|XP_004302630.1|](#) Length: 80 Number of Matches: 1

Range 1: 36 to 47

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
37.1 bits(80)	0.045()		11/12(92%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query   1   SLEAQQHLAEGR   12
          SLEAQ+HLAEGR
Sbjct   36  SLEAQEHLAEGR   47

```

EM1 [*Phoenix dactylifera*]

Sequence ID: **gi|89275333|gb|ABD66070.1|** Length: 82 Number of Matches: 1

Range 1: 21 to 32

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
37.1 bits(80)	0.046()		11/12(92%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query   1   SLEAQQHLAEGR   12
          SLEAQ+HLAEGR
Sbjct   21  SLEAQEHLAEGR   32
  
```

EMZ08 [*Elaeis guineensis*]

Sequence ID: **gi|89275331|gb|ABD66069.1|** Length: 90 Number of Matches: 1

Range 1: 29 to 40

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
37.1 bits(80)	0.048()		11/12(92%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

Features:

```

Query   1   SLEAQQHLAEGR   12
          SLEAQ+HLAEGR
Sbjct   29  SLEAQEHLAEGR   40
  
```

PREDICTED: EMB-1 protein-like [*Cucumis sativus*]

Sequence ID: **gi|449461763|ref|XP_004148611.1|** Length: 91 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 29 to 40

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
37.1 bits(80)	0.049()		11/12(92%)	12/12(100%)	0/12(0%)	

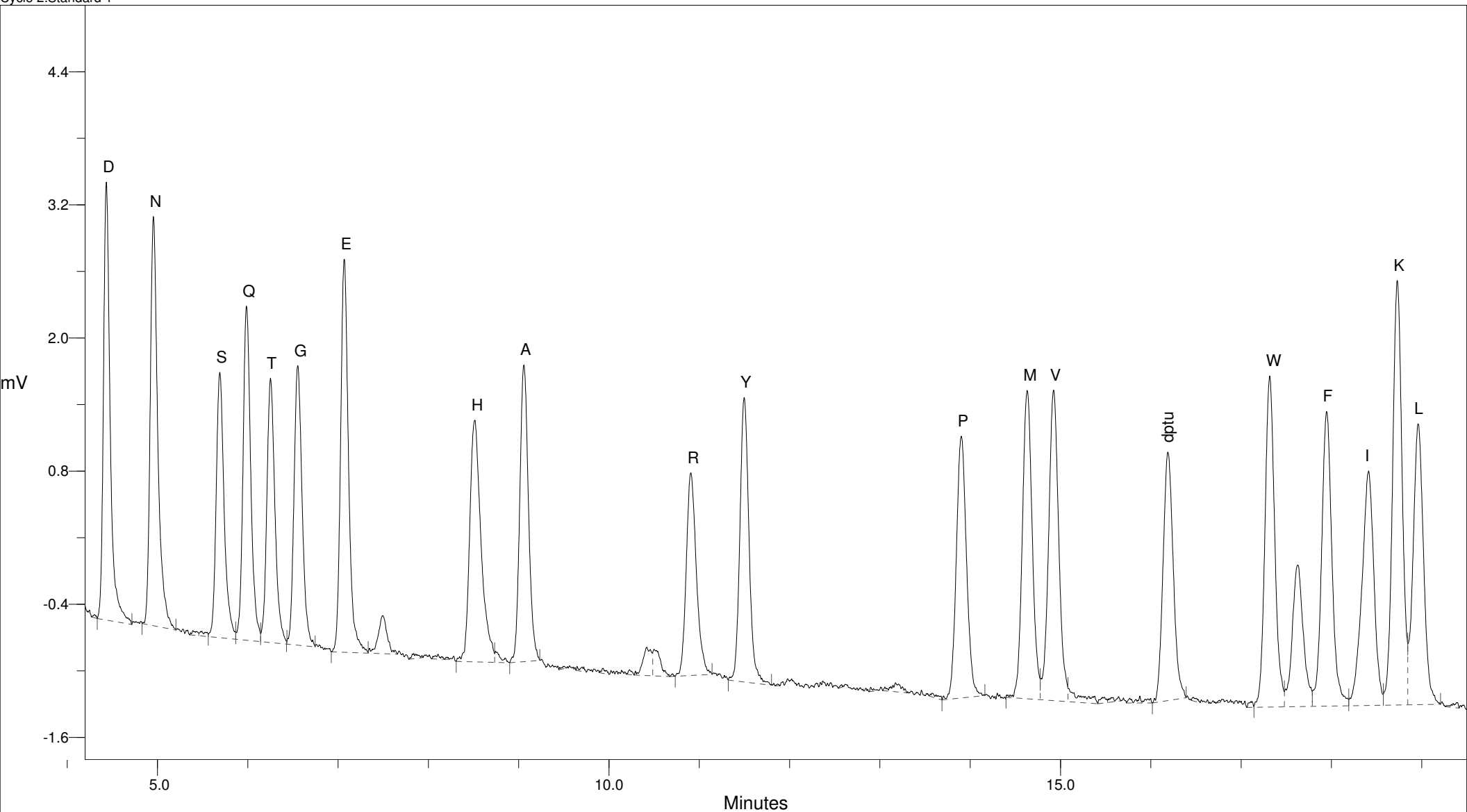
Features:

```

Query   1   SLEAQQHLAEGR   12
          SLEAQ+HLAEGR
Sbjct   29  SLEAQEHLAEGR   40
  
```

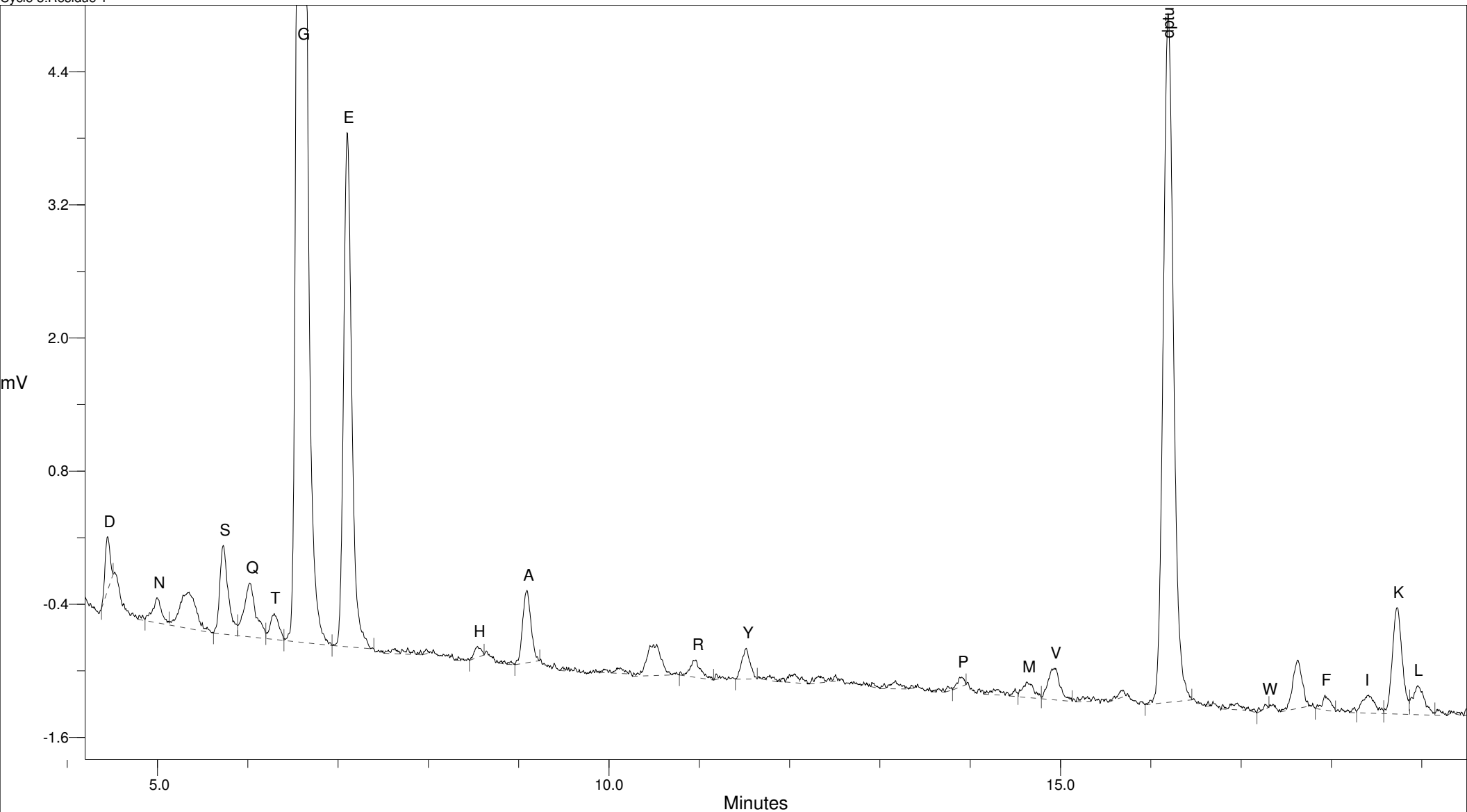

9.3 Anexo3: Secuenciación del N-terminal por degradación de Edman.

Cycle 2:Standard 1



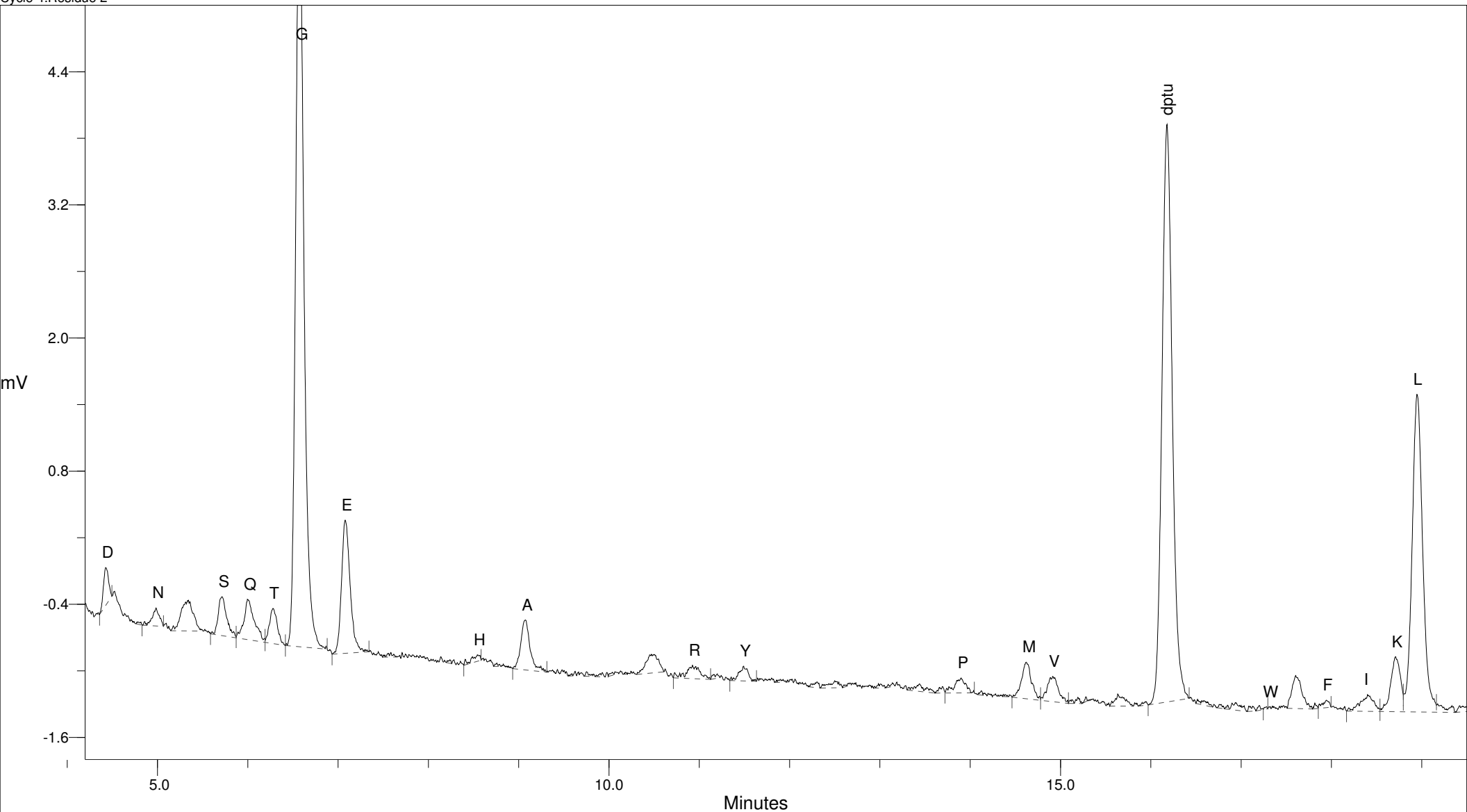
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.43	4.43	3.947	10.000	Y	11.50	11.50	2.566	10.000
N	4.95	4.95	3.689	10.000	P	13.90	13.90	2.361	10.000
S	5.69	5.69	2.395	10.000	M	14.63	14.63	2.782	10.000
Q	5.98	5.98	3.016	10.000	V	14.93	14.93	2.801	10.000
T	6.25	6.25	2.385	10.000	dptu	16.19	16.19	2.240	10.000
G	6.55	6.55	2.520	10.000	W	17.32	17.32	2.985	10.000
E	7.07	7.07	3.547	10.000	F	17.95	17.95	2.657	10.000
H	8.52	8.52	2.181	10.000	I	18.41	18.41	2.115	10.000
A	9.06	9.06	2.676	10.000	K	18.73	18.73	3.827	10.000
R	10.91	10.91	1.829	10.000	L	18.96	18.96	2.532	10.000

Cycle 3:Residue 1



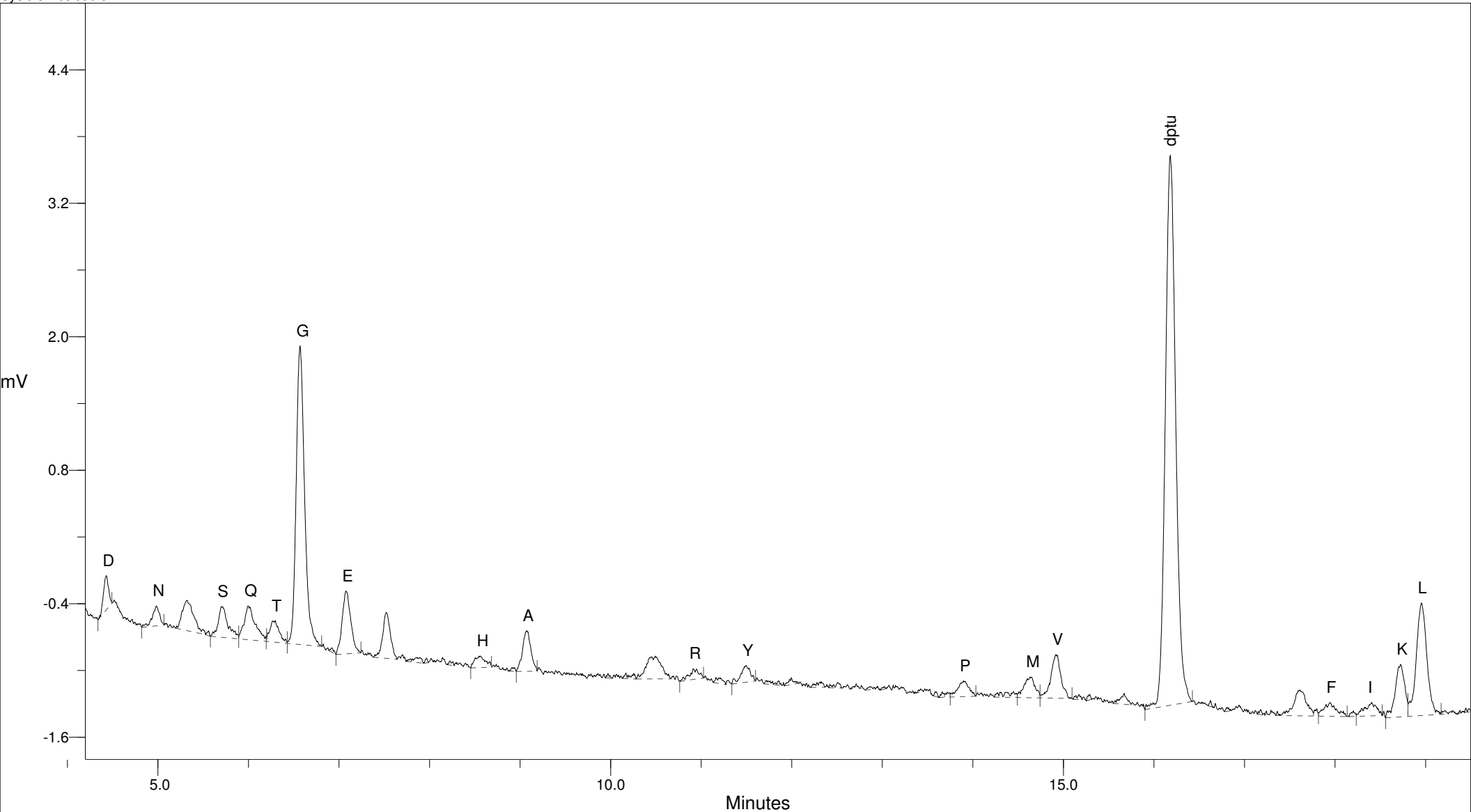
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.45	4.43	0.484	1.226	Y	11.52	11.50	0.278	1.085
N	5.00	4.95	0.225	0.609	P	13.90	13.90	0.085	0.358
S	5.73	5.69	0.799	3.335	M	14.62	14.63	0.140	0.503
Q	6.02	5.98	0.485	1.607	V	14.93	14.93	0.286	1.021
T	6.29	6.25	0.233	0.979	dptu	16.19	16.19	6.205	27.699
G	6.59	6.55	18.516	73.485	W	17.27	17.32	0.039	0.133
E	7.10	7.07	4.641	13.084	F	17.93	17.95	0.133	0.502
H	8.54	8.52	0.100	0.458	I	18.41	18.41	0.163	0.772
A	9.09	9.06	0.652	2.436	K	18.73	18.73	0.959	2.506
R	10.96	10.91	0.157	0.861	L	18.95	18.96	0.261	1.032

Cycle 4:Residue 2



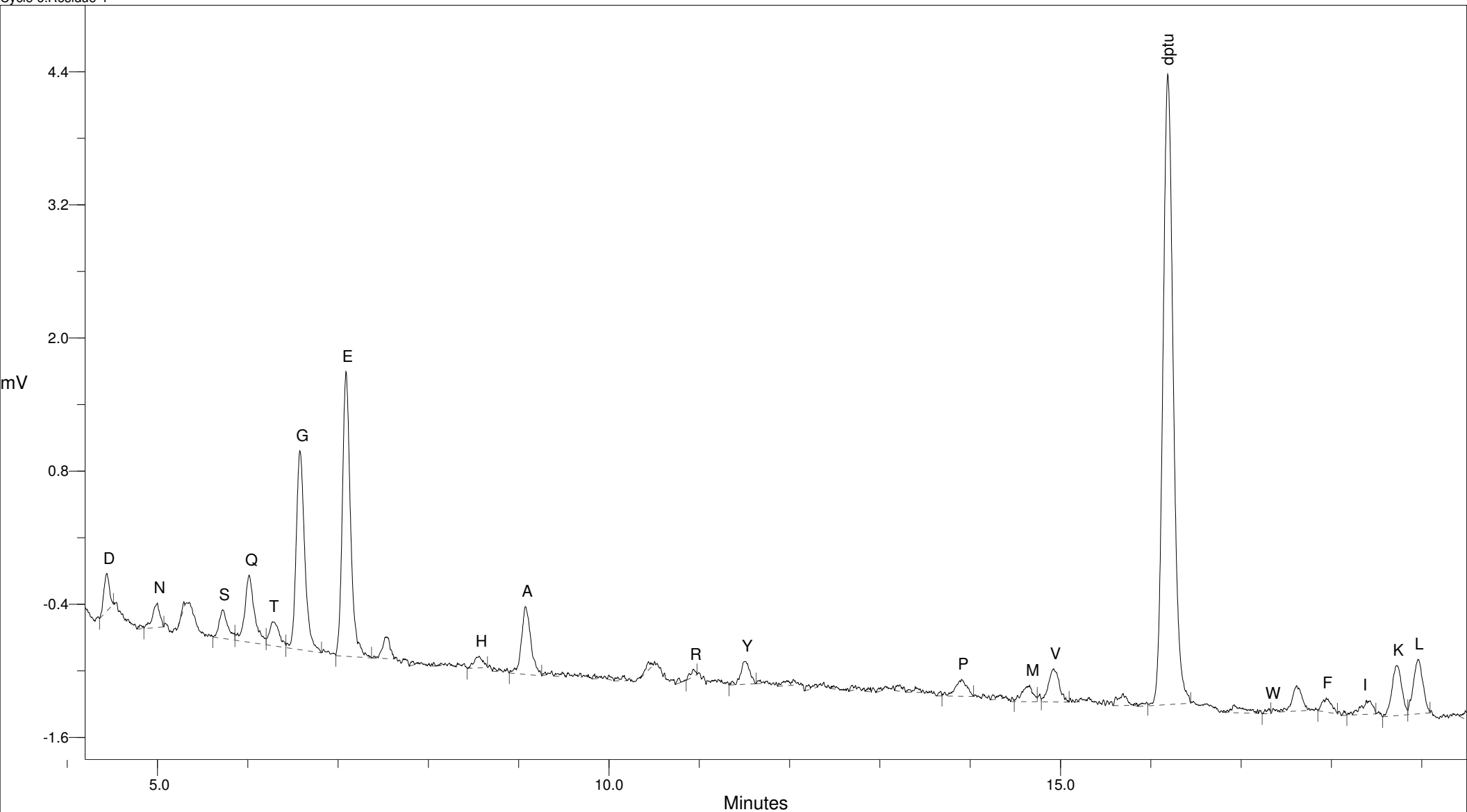
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.42	4.43	0.342	0.867	Y	11.49	11.50	0.134	0.524
N	4.98	4.95	0.163	0.442	P	13.90	13.90	0.135	0.574
S	5.72	5.69	0.350	1.463	M	14.62	14.63	0.330	1.186
Q	6.00	5.98	0.365	1.209	V	14.91	14.93	0.230	0.820
T	6.28	6.25	0.317	1.329	dptu	16.18	16.19	5.208	23.247
G	6.57	6.55	6.971	27.667	W	17.28	17.32	0.021	0.070
E	7.08	7.07	1.201	3.386	F	17.95	17.95	0.067	0.254
H	8.54	8.52	0.058	0.267	I	18.40	18.41	0.151	0.714
A	9.07	9.06	0.451	1.687	K	18.71	18.73	0.496	1.297
R	10.93	10.91	0.121	0.663	L	18.95	18.96	2.867	11.321

Cycle 5:Residue 3



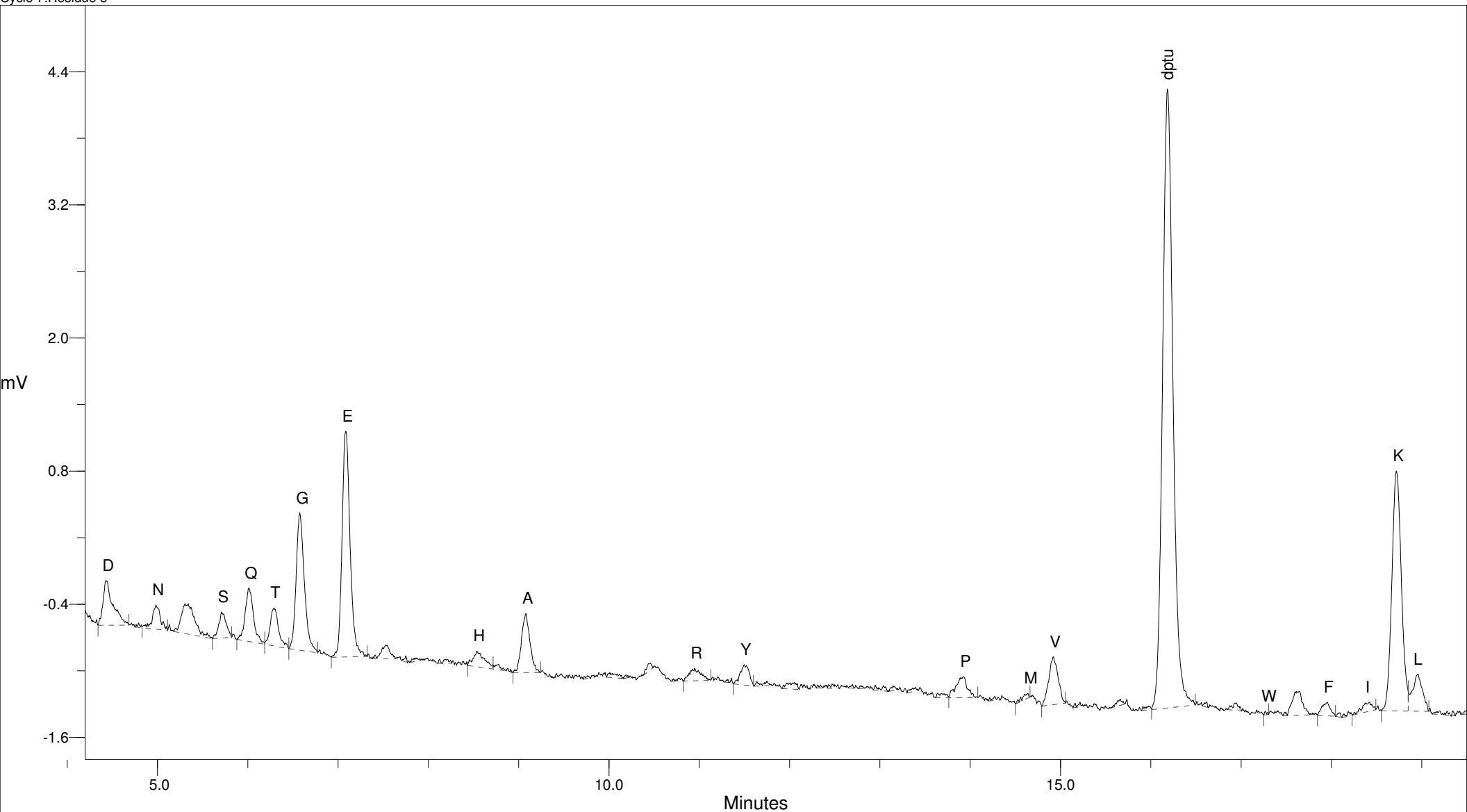
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.43	4.43	0.308	0.781	Y	11.50	11.50	0.150	0.585
N	4.98	4.95	0.178	0.483	P	13.90	13.90	0.141	0.596
S	5.70	5.69	0.276	1.153	M	14.63	14.63	0.187	0.672
Q	6.00	5.98	0.303	1.005	V	14.92	14.93	0.391	1.396
T	6.30	6.25	0.193	0.808	dptu	16.18	16.19	4.942	22.059
G	6.57	6.55	2.685	10.655	F	17.95	17.95	0.123	0.464
E	7.08	7.07	0.566	1.594	I	18.40	18.41	0.120	0.568
H	8.56	8.52	0.103	0.475	K	18.72	18.73	0.473	1.237
A	9.07	9.06	0.365	1.366	L	18.95	18.96	1.012	3.998
R	10.91	10.91	0.099	0.540					

Cycle 6:Residue 4



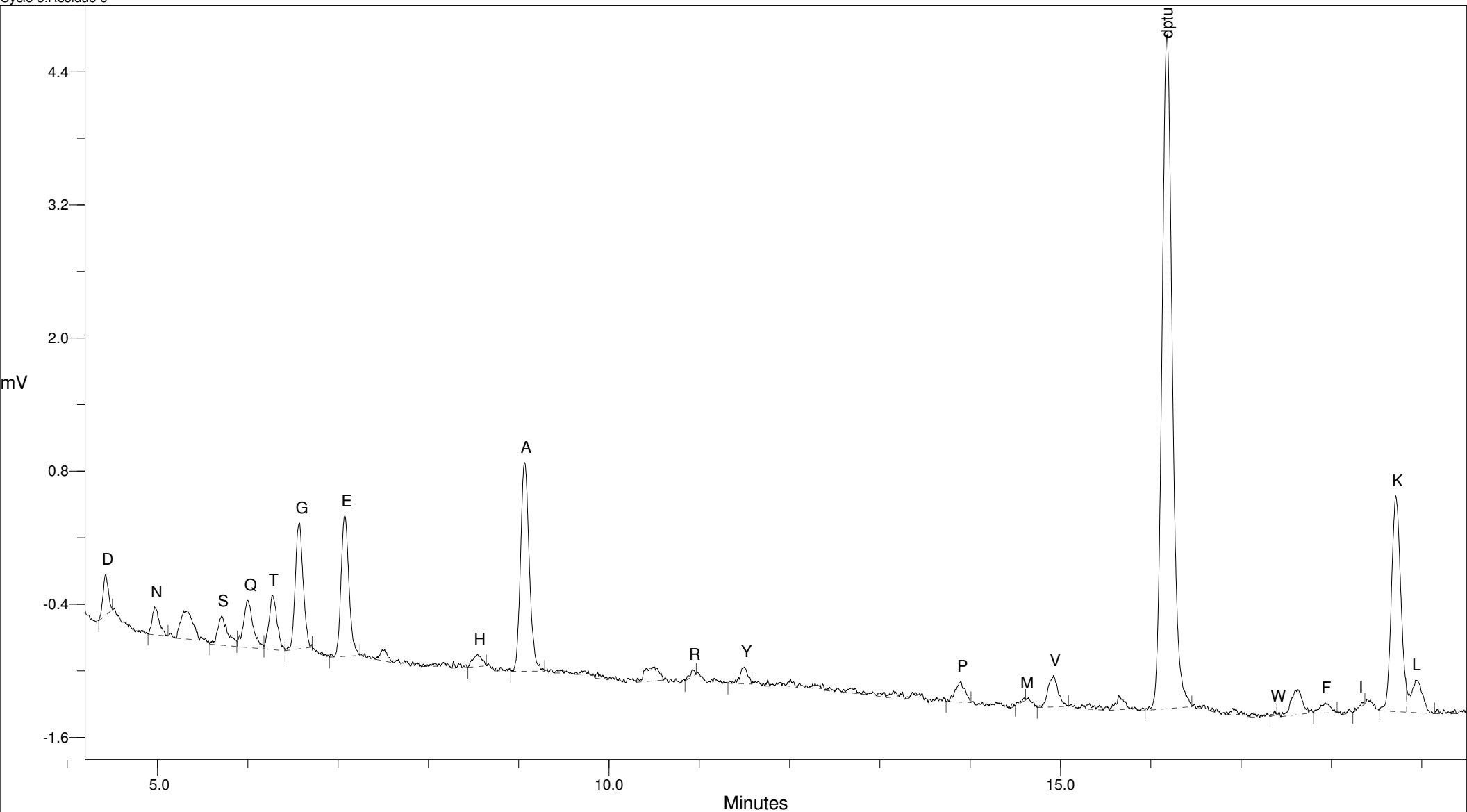
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.44	4.43	0.341	0.865	Y	11.51	11.50	0.205	0.799
N	5.00	4.95	0.221	0.599	P	13.90	13.90	0.152	0.645
S	5.72	5.69	0.257	1.075	M	14.66	14.63	0.147	0.528
Q	6.01	5.98	0.607	2.012	V	14.93	14.93	0.299	1.069
T	6.28	6.25	0.217	0.909	dptu	16.19	16.19	5.681	25.360
G	6.58	6.55	1.796	7.127	W	17.31	17.32	0.046	0.156
E	7.09	7.07	2.565	7.232	F	17.94	17.95	0.127	0.479
H	8.56	8.52	0.106	0.485	I	18.39	18.41	0.127	0.599
A	9.07	9.06	0.612	2.286	K	18.72	18.73	0.451	1.179
R	10.94	10.91	0.065	0.356	L	18.96	18.96	0.492	1.942

Cycle 7:Residue 5



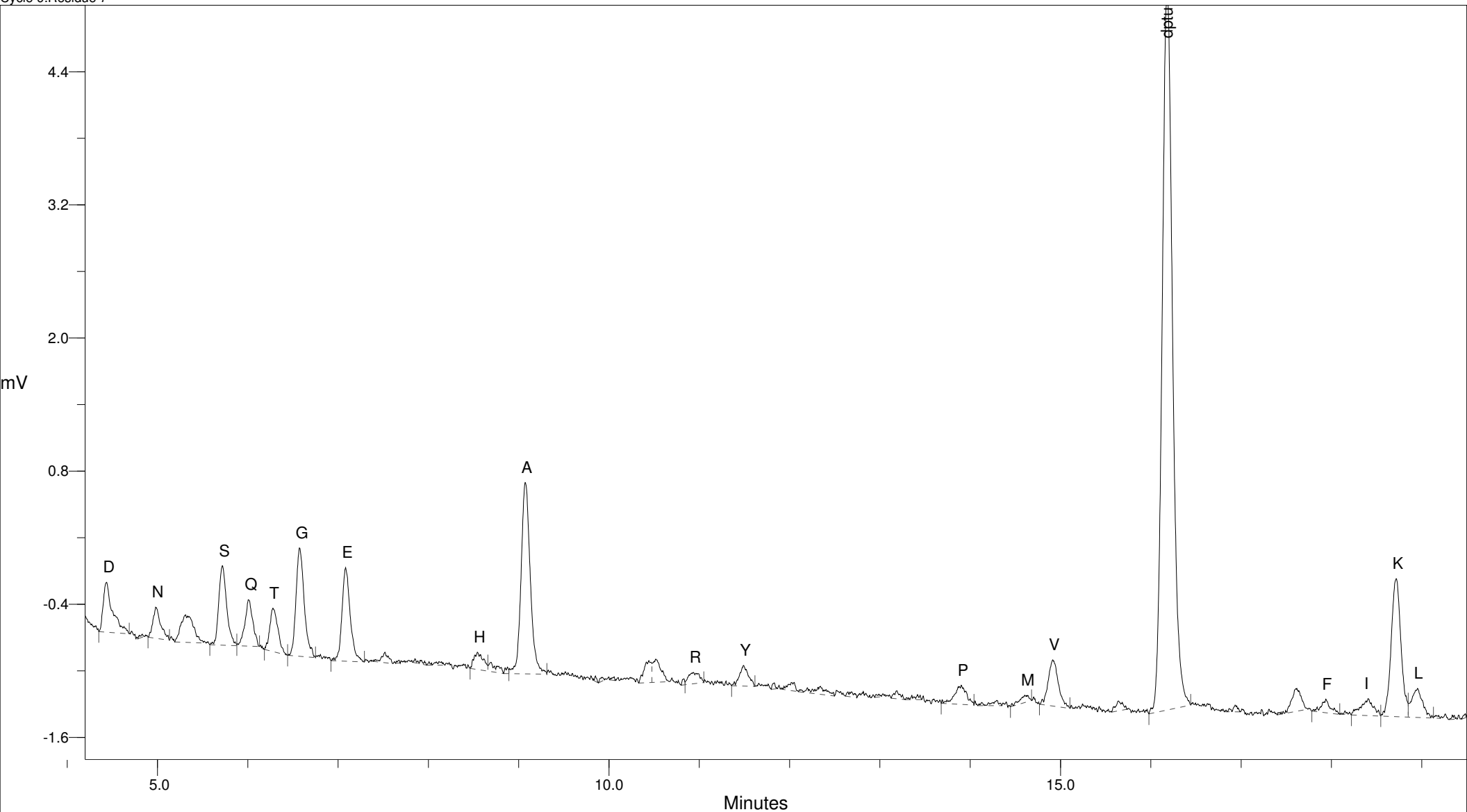
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.43	4.43	0.402	1.020	Y	11.50	11.50	0.185	0.719
N	4.98	4.95	0.217	0.589	P	13.93	13.90	0.190	0.803
S	5.71	5.69	0.234	0.976	M	14.64	14.63	0.043	0.154
Q	6.01	5.98	0.479	1.590	V	14.92	14.93	0.432	1.541
T	6.29	6.25	0.344	1.442	dptu	16.18	16.19	5.577	24.894
G	6.58	6.55	1.237	4.911	W	17.27	17.32	0.032	0.108
E	7.09	7.07	2.037	5.743	F	17.95	17.95	0.124	0.467
H	8.54	8.52	0.142	0.650	I	18.42	18.41	0.080	0.381
A	9.08	9.06	0.532	1.989	K	18.72	18.73	2.164	5.655
R	10.95	10.91	0.116	0.633	L	18.95	18.96	0.313	1.235

Cycle 8:Residue 6



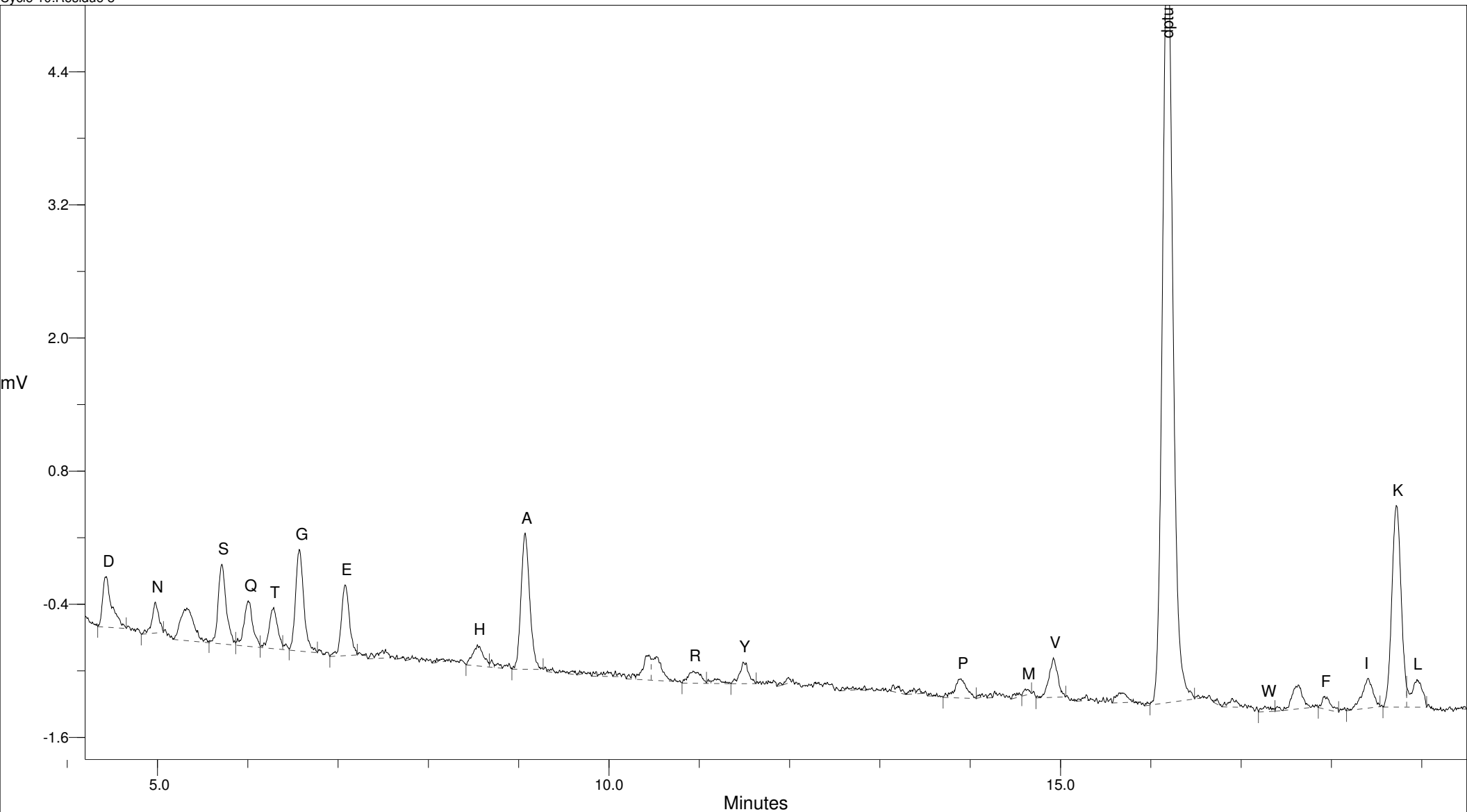
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.42	4.43	0.366	0.928	Y	11.50	11.50	0.156	0.607
N	4.97	4.95	0.252	0.684	P	13.90	13.90	0.186	0.788
S	5.71	5.69	0.263	1.097	M	14.60	14.63	0.028	0.100
Q	6.00	5.98	0.426	1.412	V	14.92	14.93	0.283	1.010
T	6.27	6.25	0.489	2.049	dptu	16.18	16.19	6.075	27.119
G	6.57	6.55	1.135	4.507	W	17.37	17.32	0.039	0.130
E	7.08	7.07	1.267	3.573	F	17.93	17.95	0.093	0.350
H	8.55	8.52	0.113	0.519	I	18.34	18.41	0.032	0.153
A	9.06	9.06	1.884	7.042	K	18.71	18.73	1.945	5.083
R	10.93	10.91	0.062	0.337	L	18.93	18.96	0.263	1.039

Cycle 9:Residue 7



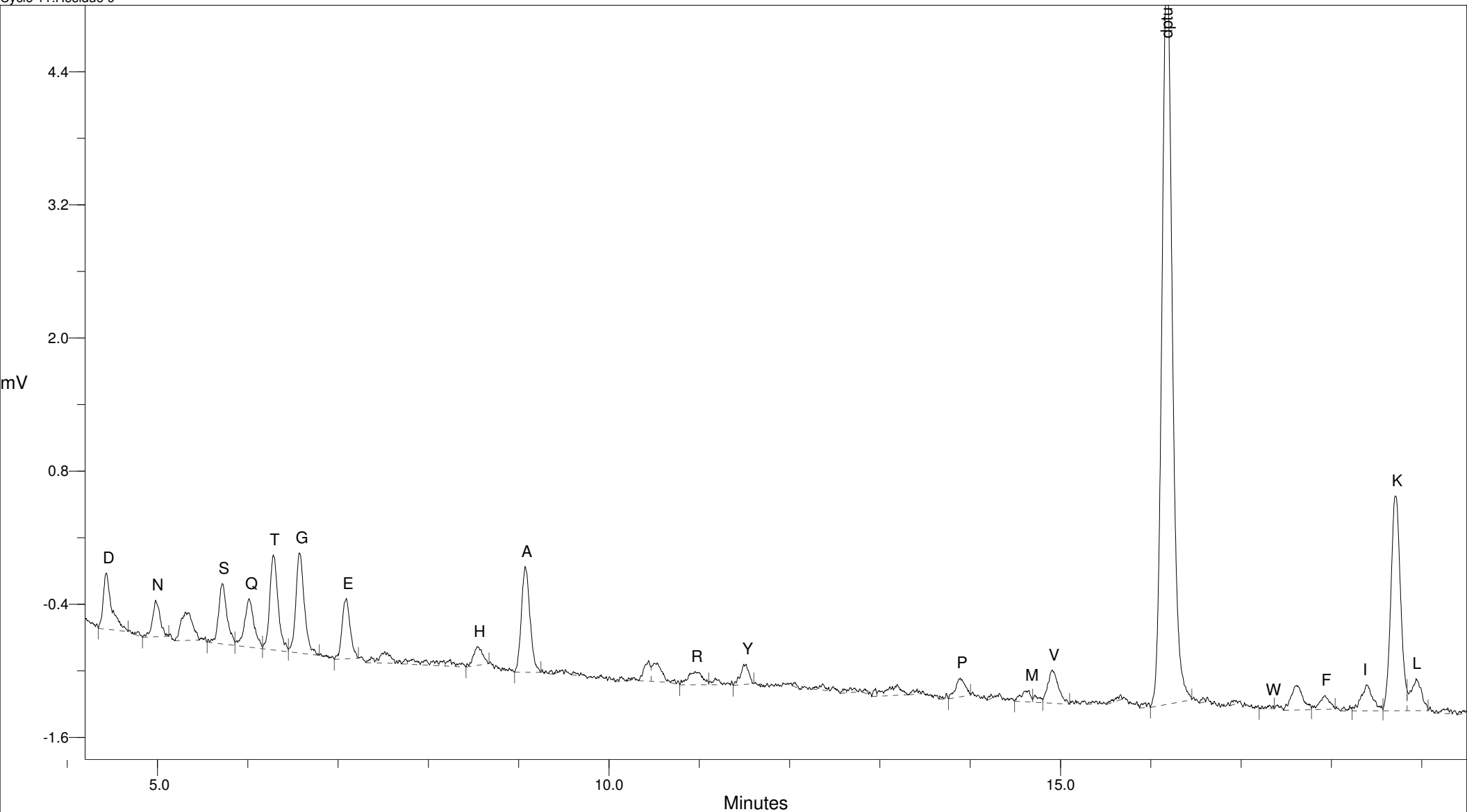
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.44	4.43	0.451	1.142	Y	11.49	11.50	0.187	0.727
N	4.98	4.95	0.282	0.764	P	13.90	13.90	0.174	0.738
S	5.72	5.69	0.718	2.997	M	14.60	14.63	0.067	0.241
Q	6.01	5.98	0.418	1.387	V	14.91	14.93	0.417	1.487
T	6.28	6.25	0.391	1.642	dptu	16.18	16.19	6.548	29.231
G	6.57	6.55	0.979	3.885	F	17.94	17.95	0.124	0.466
E	7.08	7.07	0.843	2.378	I	18.40	18.41	0.155	0.733
H	8.54	8.52	0.156	0.717	K	18.72	18.73	1.245	3.255
A	9.07	9.06	1.727	6.453	L	18.95	18.96	0.262	1.034
R	10.93	10.91	0.103	0.562					

Cycle 10:Residue 8



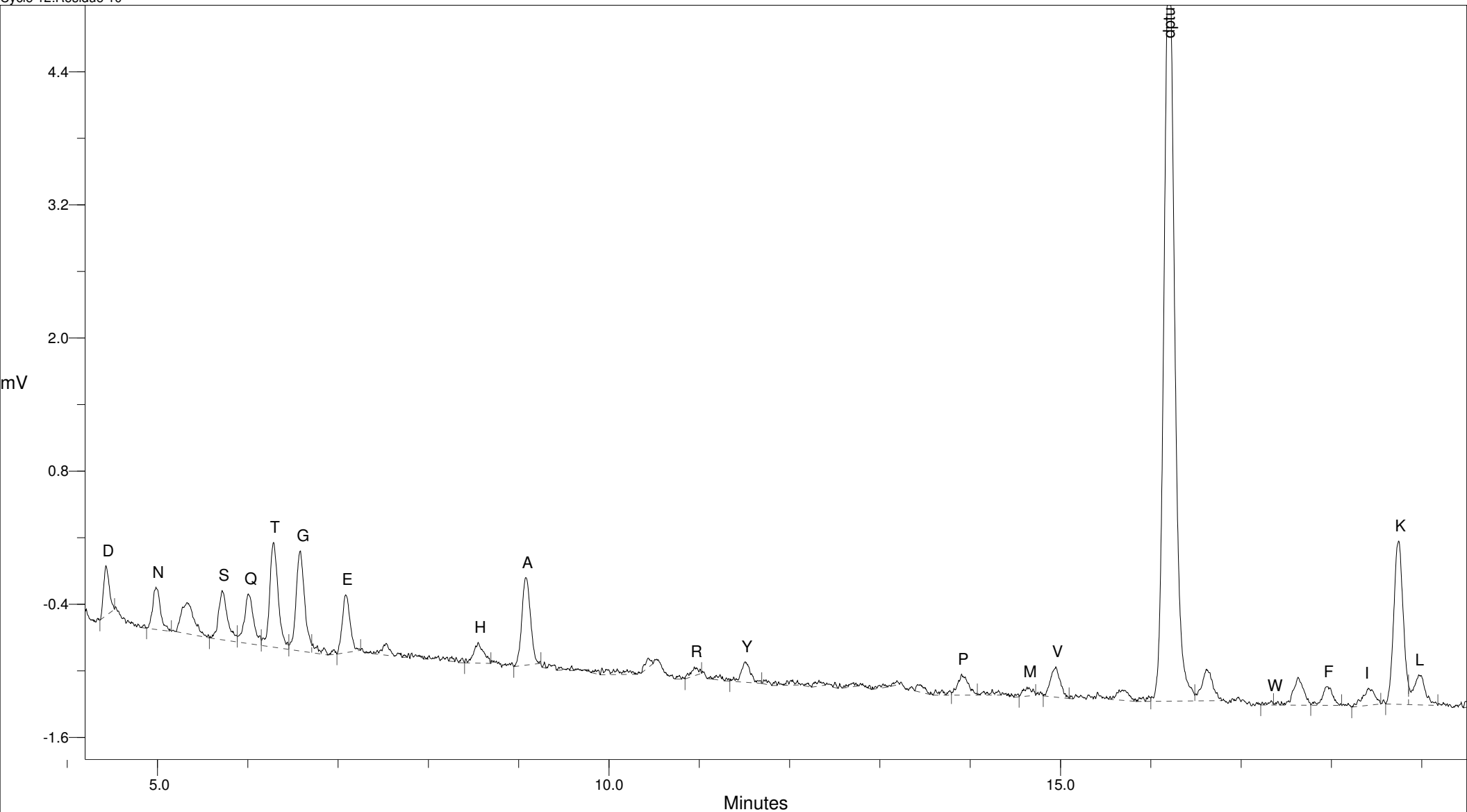
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.43	4.43	0.456	1.156	Y	11.48	11.50	0.196	0.763
N	4.97	4.95	0.280	0.758	P	13.90	13.90	0.173	0.733
S	5.71	5.69	0.718	2.998	M	14.61	14.63	0.057	0.205
Q	6.00	5.98	0.410	1.358	V	14.92	14.93	0.356	1.270
T	6.29	6.25	0.372	1.561	dptu	16.18	16.19	7.054	31.487
G	6.57	6.55	0.916	3.634	W	17.26	17.32	0.050	0.168
E	7.08	7.07	0.639	1.801	F	17.93	17.95	0.115	0.432
H	8.54	8.52	0.191	0.875	I	18.40	18.41	0.269	1.274
A	9.07	9.06	1.227	4.584	K	18.72	18.73	1.820	4.757
R	10.93	10.91	0.110	0.604	L	18.95	18.96	0.234	0.925

Cycle 11:Residue 9



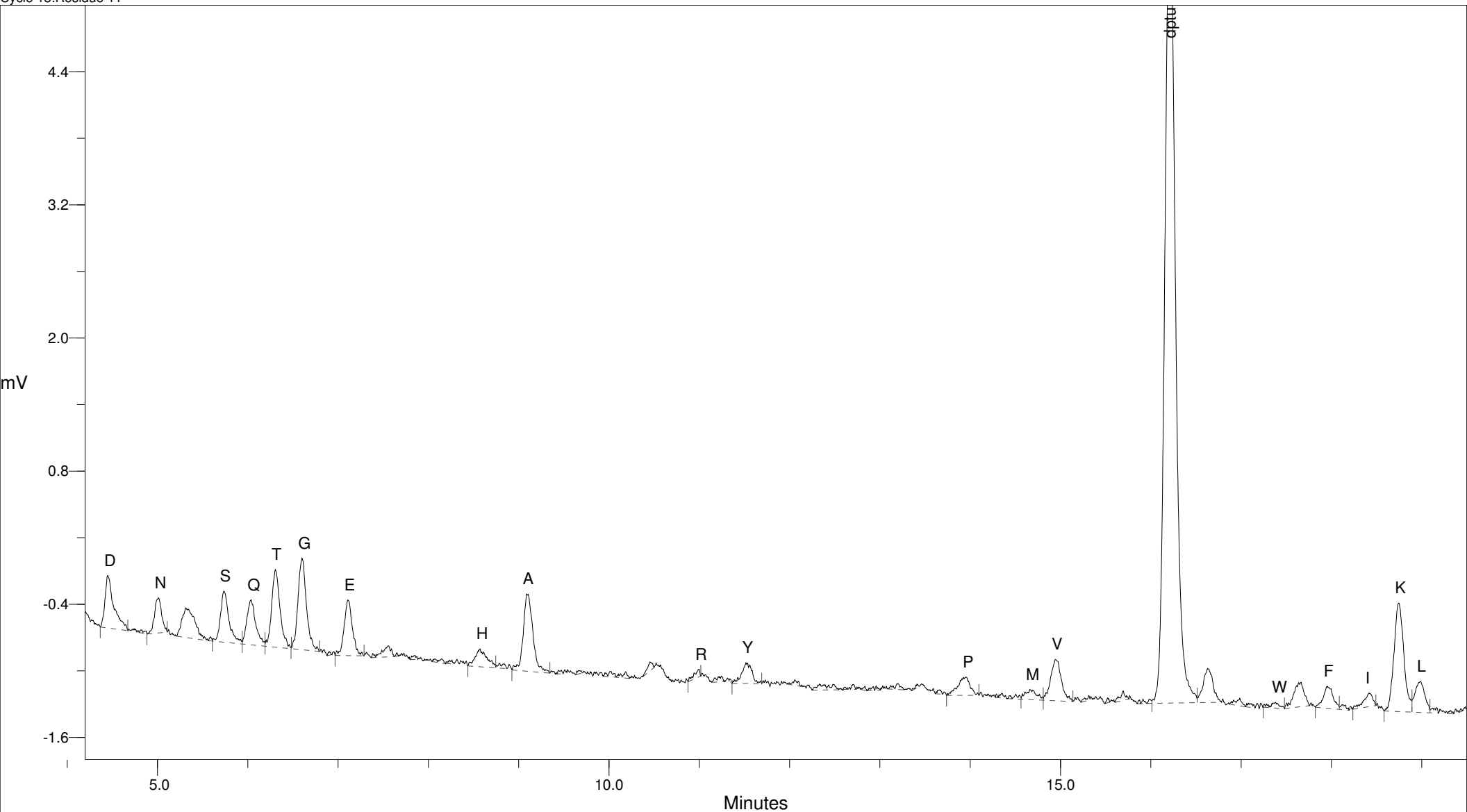
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.43	4.43	0.505	1.281	Y	11.52	11.50	0.182	0.710
N	4.98	4.95	0.329	0.891	P	13.89	13.90	0.169	0.714
S	5.72	5.69	0.545	2.274	M	14.65	14.63	0.104	0.375
Q	6.01	5.98	0.437	1.447	V	14.91	14.93	0.300	1.073
T	6.28	6.25	0.857	3.593	dptu	16.18	16.19	6.717	29.983
G	6.57	6.55	0.903	3.583	W	17.31	17.32	0.032	0.107
E	7.09	7.07	0.543	1.531	F	17.93	17.95	0.124	0.465
H	8.54	8.52	0.169	0.777	I	18.39	18.41	0.235	1.113
A	9.07	9.06	0.953	3.563	K	18.71	18.73	1.937	5.061
R	10.95	10.91	0.122	0.665	L	18.94	18.96	0.262	1.035

Cycle 12:Residue 10



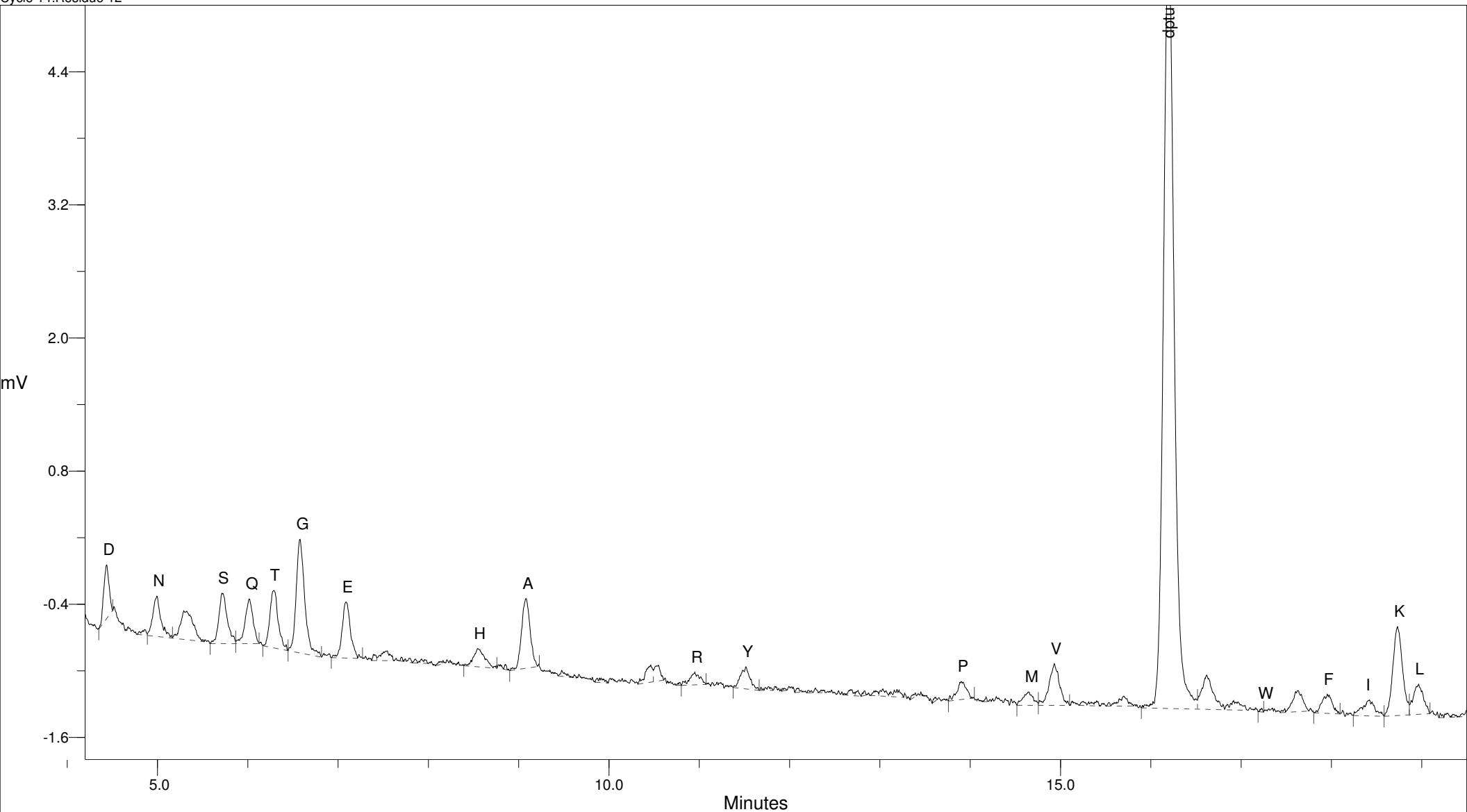
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.43	4.43	0.451	1.142	Y	11.51	11.50	0.190	0.740
N	4.98	4.95	0.380	1.031	P	13.90	13.90	0.189	0.803
S	5.72	5.69	0.443	1.851	M	14.63	14.63	0.081	0.291
Q	6.00	5.98	0.447	1.483	V	14.95	14.93	0.275	0.982
T	6.29	6.25	0.945	3.964	dptu	16.20	16.19	6.903	30.814
G	6.58	6.55	0.904	3.589	W	17.33	17.32	0.040	0.133
E	7.08	7.07	0.521	1.470	F	17.95	17.95	0.168	0.633
H	8.55	8.52	0.187	0.859	I	18.41	18.41	0.155	0.732
A	9.08	9.06	0.790	2.951	K	18.75	18.73	1.473	3.848
R	10.95	10.91	0.080	0.437	L	18.97	18.96	0.253	1.000

Cycle 13:Residue 11



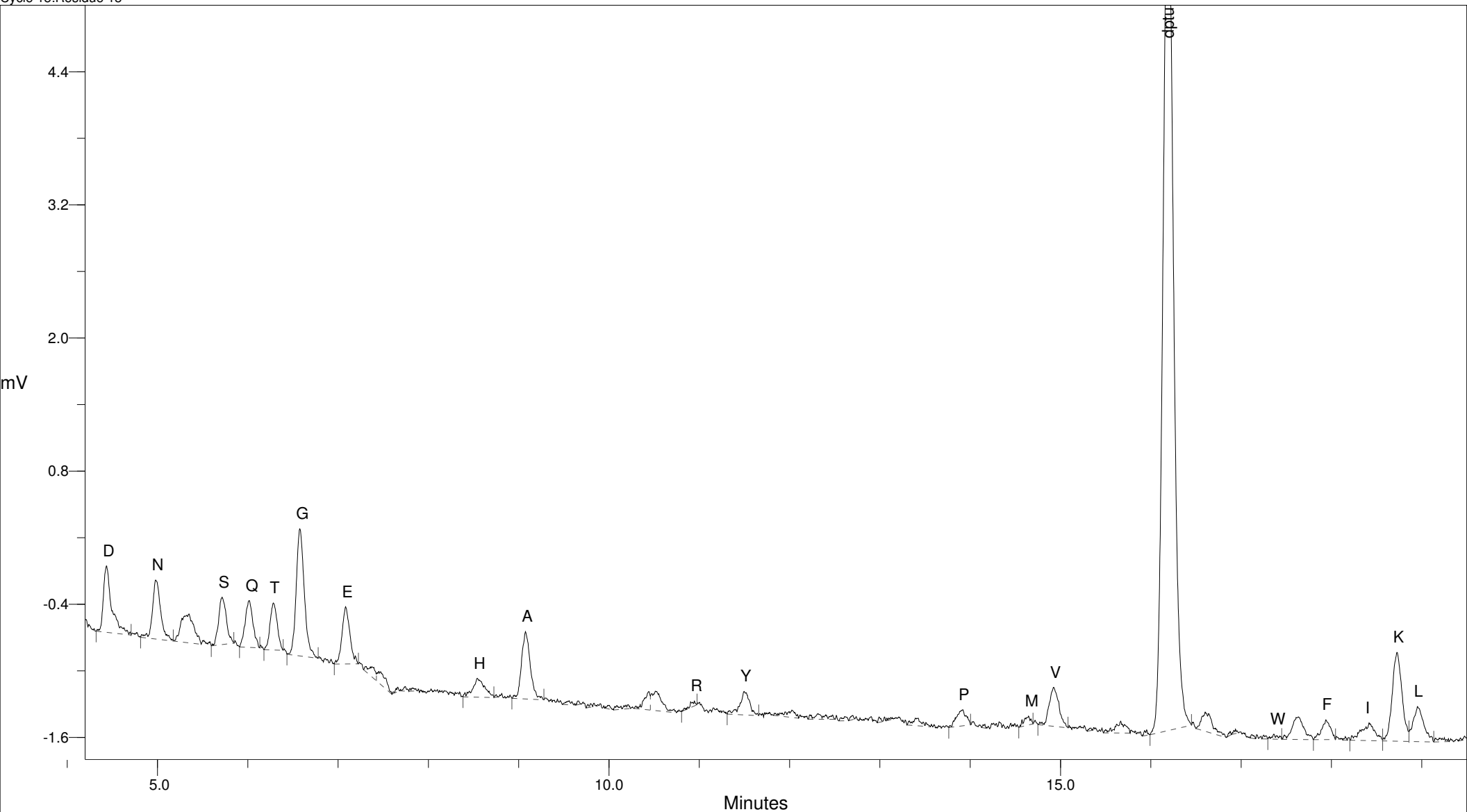
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.45	4.43	0.474	1.201	Y	11.52	11.50	0.186	0.725
N	5.01	4.95	0.317	0.858	P	13.96	13.90	0.164	0.696
S	5.73	5.69	0.460	1.921	M	14.66	14.63	0.092	0.329
Q	6.04	5.98	0.406	1.345	V	14.94	14.93	0.373	1.334
T	6.30	6.25	0.701	2.938	dptu	16.21	16.19	7.417	33.107
G	6.60	6.55	0.826	3.278	W	17.38	17.32	0.052	0.173
E	7.11	7.07	0.502	1.415	F	17.95	17.95	0.198	0.748
H	8.57	8.52	0.162	0.741	I	18.42	18.41	0.123	0.581
A	9.09	9.06	0.697	2.607	K	18.75	18.73	0.978	2.556
R	11.00	10.91	0.068	0.373	L	18.99	18.96	0.280	1.106

Cycle 14:Residue 12



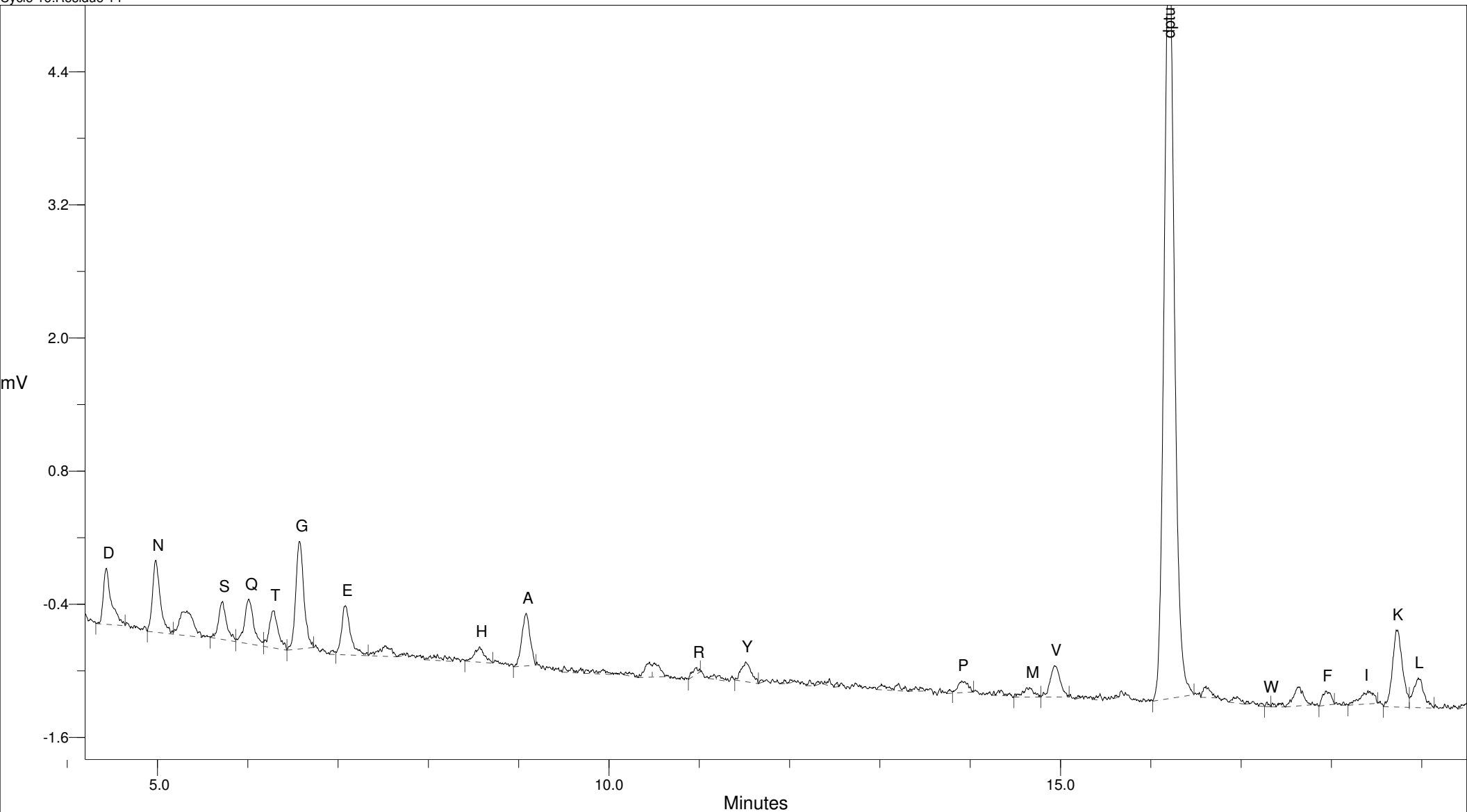
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.44	4.43	0.485	1.228	Y	11.52	11.50	0.201	0.783
N	4.99	4.95	0.366	0.992	P	13.90	13.90	0.163	0.691
S	5.71	5.69	0.453	1.892	M	14.65	14.63	0.122	0.439
Q	6.02	5.98	0.402	1.334	V	14.93	14.93	0.377	1.347
T	6.29	6.25	0.517	2.168	dptu	16.20	16.19	7.024	31.355
G	6.58	6.55	1.027	4.077	W	17.23	17.32	0.033	0.110
E	7.09	7.07	0.506	1.428	F	17.95	17.95	0.172	0.649
H	8.55	8.52	0.165	0.757	I	18.42	18.41	0.144	0.682
A	9.08	9.06	0.627	2.344	K	18.73	18.73	0.802	2.096
R	10.95	10.91	0.114	0.625	L	18.97	18.96	0.272	1.073

Cycle 15:Residue 13



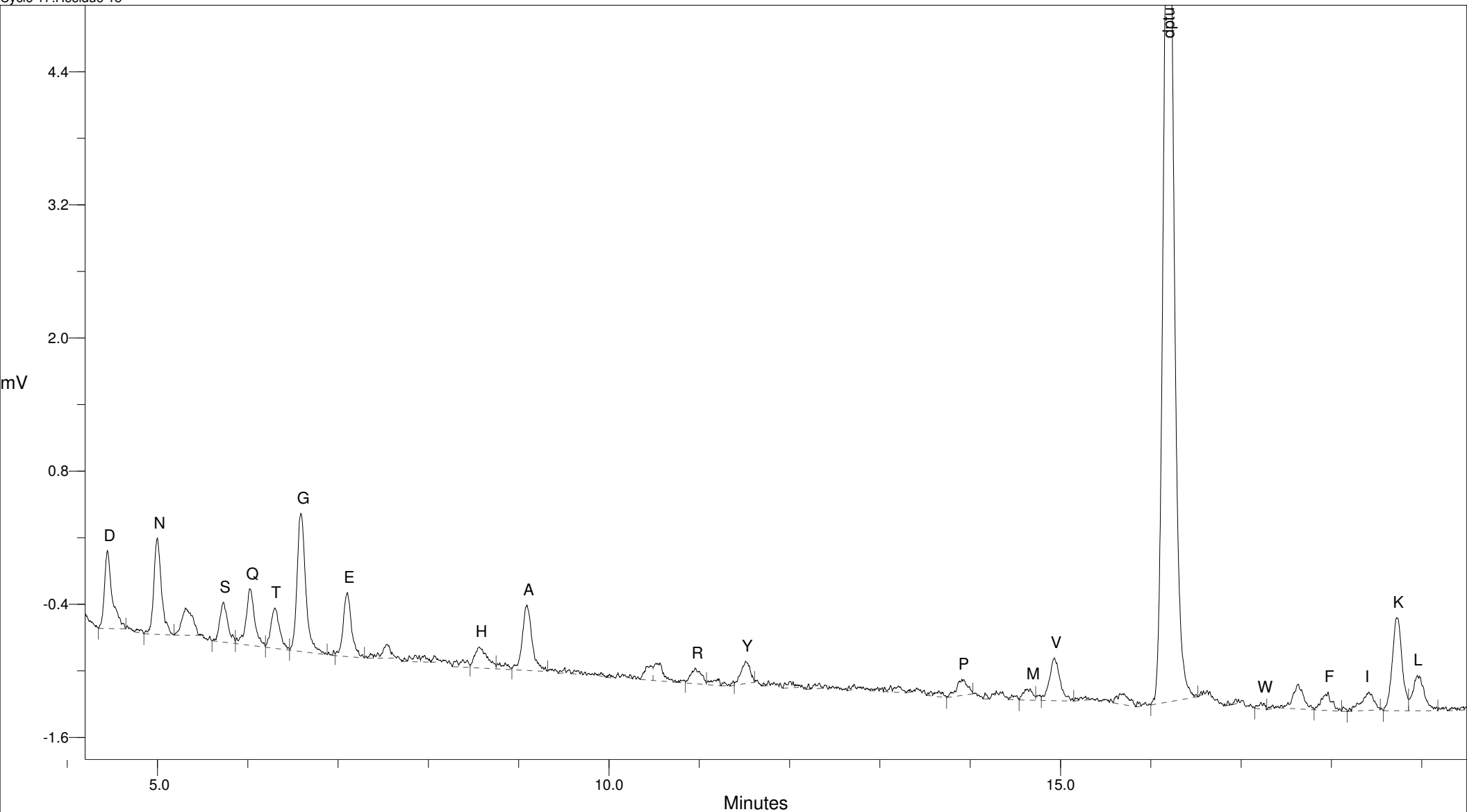
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.43	4.43	0.601	1.522	Y	11.50	11.50	0.211	0.823
N	4.98	4.95	0.531	1.440	P	13.91	13.90	0.145	0.613
S	5.72	5.69	0.427	1.785	M	14.65	14.63	0.081	0.290
Q	6.02	5.98	0.423	1.402	V	14.93	14.93	0.352	1.258
T	6.28	6.25	0.424	1.777	dptu	16.19	16.19	7.978	35.611
G	6.58	6.55	1.146	4.550	W	17.36	17.32	0.046	0.153
E	7.08	7.07	0.515	1.453	F	17.94	17.95	0.178	0.670
H	8.54	8.52	0.170	0.780	I	18.42	18.41	0.161	0.760
A	9.07	9.06	0.607	2.268	K	18.73	18.73	0.801	2.092
R	10.95	10.91	0.044	0.240	L	18.95	18.96	0.316	1.247

Cycle 16:Residue 14



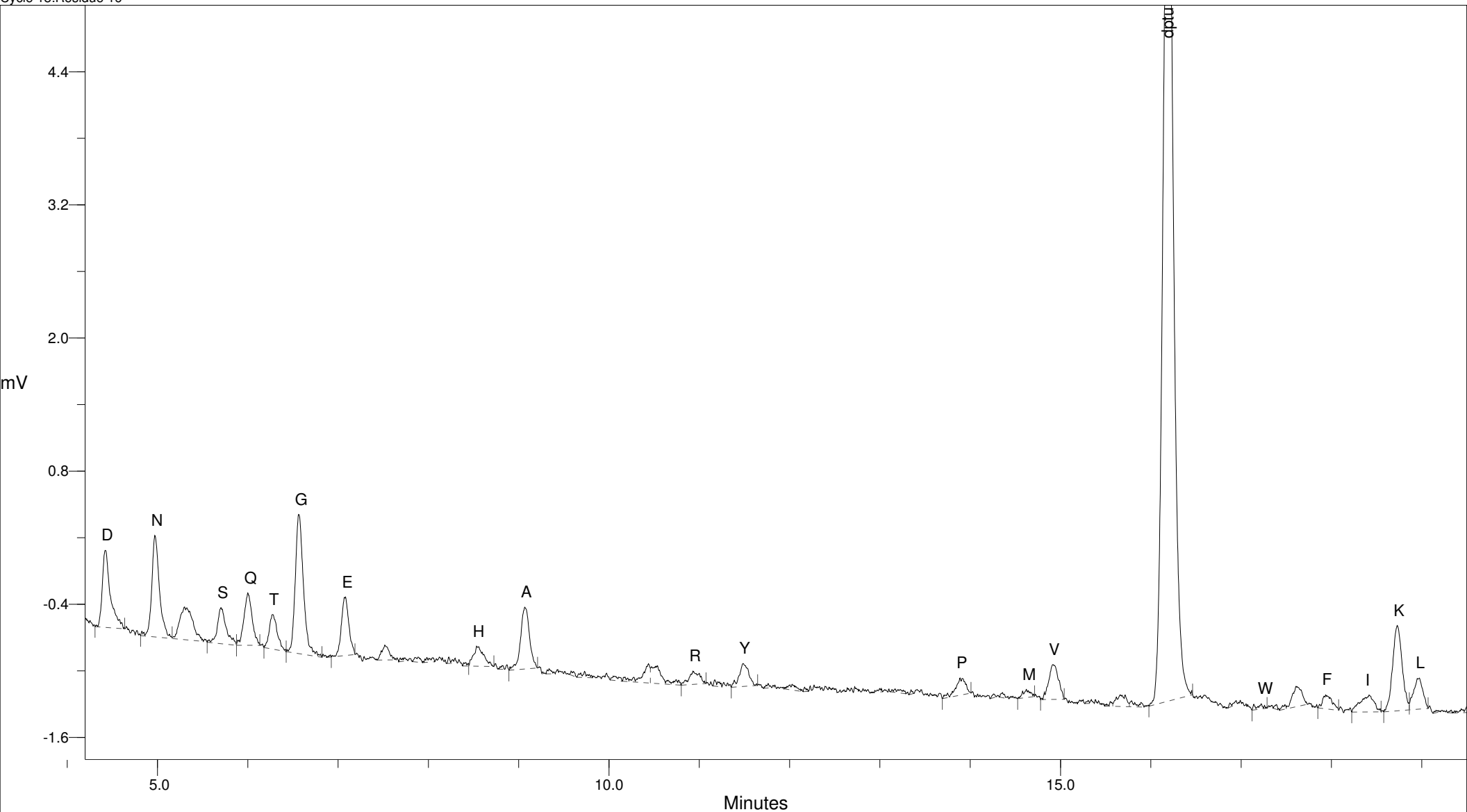
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.43	4.43	0.505	1.280	Y	11.51	11.50	0.179	0.697
N	4.98	4.95	0.651	1.764	P	13.90	13.90	0.107	0.454
S	5.72	5.69	0.343	1.434	M	14.66	14.63	0.086	0.310
Q	6.01	5.98	0.404	1.338	V	14.93	14.93	0.282	1.008
T	6.29	6.25	0.335	1.405	dptu	16.20	16.19	6.929	30.929
G	6.57	6.55	0.970	3.850	W	17.29	17.32	0.043	0.143
E	7.08	7.07	0.443	1.250	F	17.94	17.95	0.129	0.485
H	8.57	8.52	0.139	0.639	I	18.40	18.41	0.119	0.564
A	9.08	9.06	0.474	1.773	K	18.72	18.73	0.695	1.816
R	10.97	10.91	0.060	0.331	L	18.96	18.96	0.268	1.059

Cycle 17:Residue 15



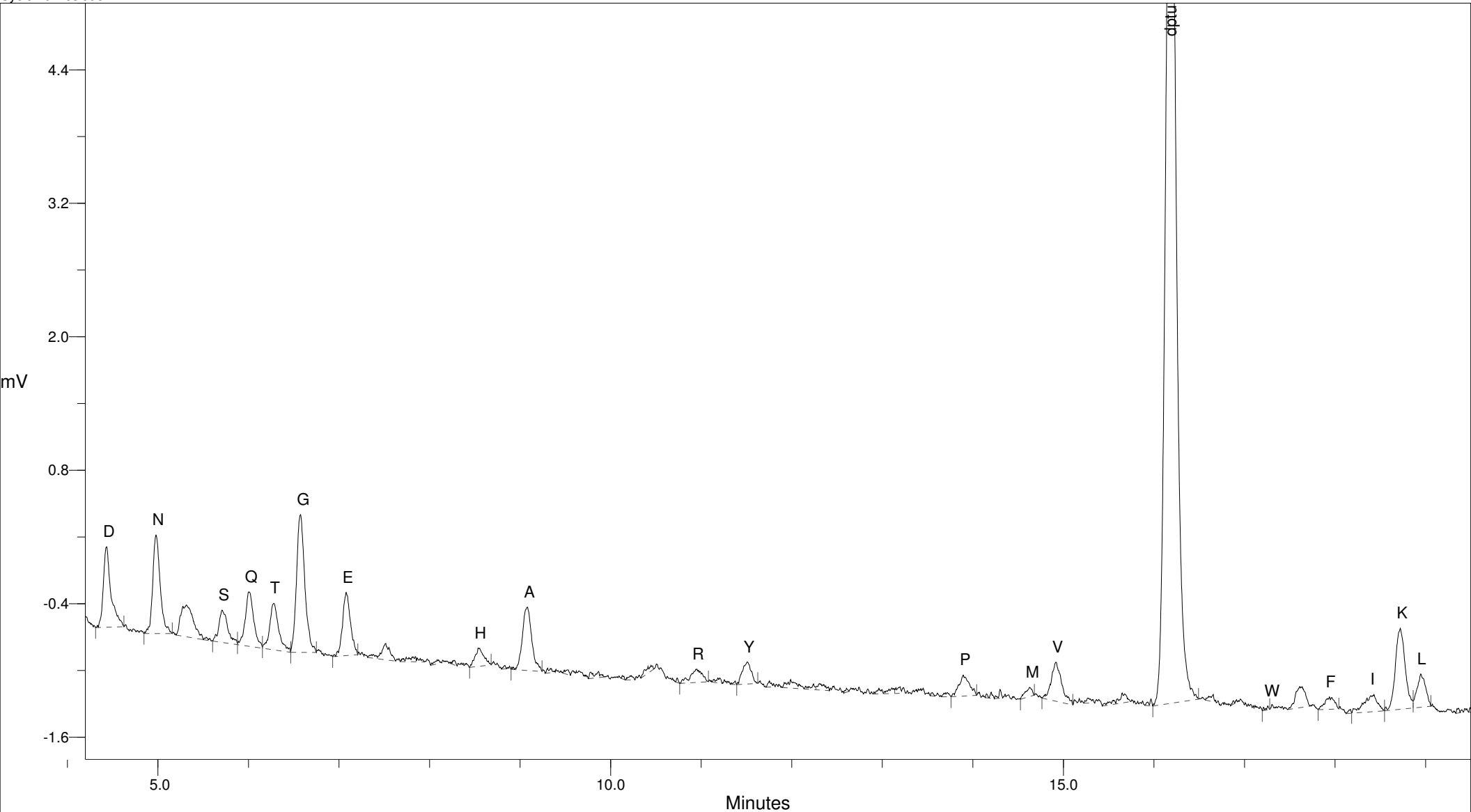
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.45	4.43	0.703	1.780	Y	11.51	11.50	0.202	0.786
N	5.00	4.95	0.869	2.357	P	13.91	13.90	0.146	0.618
S	5.73	5.69	0.360	1.504	M	14.66	14.63	0.102	0.367
Q	6.02	5.98	0.510	1.693	V	14.93	14.93	0.386	1.377
T	6.30	6.25	0.364	1.525	dptu	16.20	16.19	8.540	38.123
G	6.59	6.55	1.245	4.943	W	17.22	17.32	0.061	0.205
E	7.10	7.07	0.578	1.630	F	17.96	17.95	0.167	0.627
H	8.56	8.52	0.190	0.871	I	18.41	18.41	0.167	0.788
A	9.09	9.06	0.590	2.204	K	18.72	18.73	0.839	2.192
R	10.95	10.91	0.141	0.773	L	18.95	18.96	0.319	1.260

Cycle 18:Residue 16



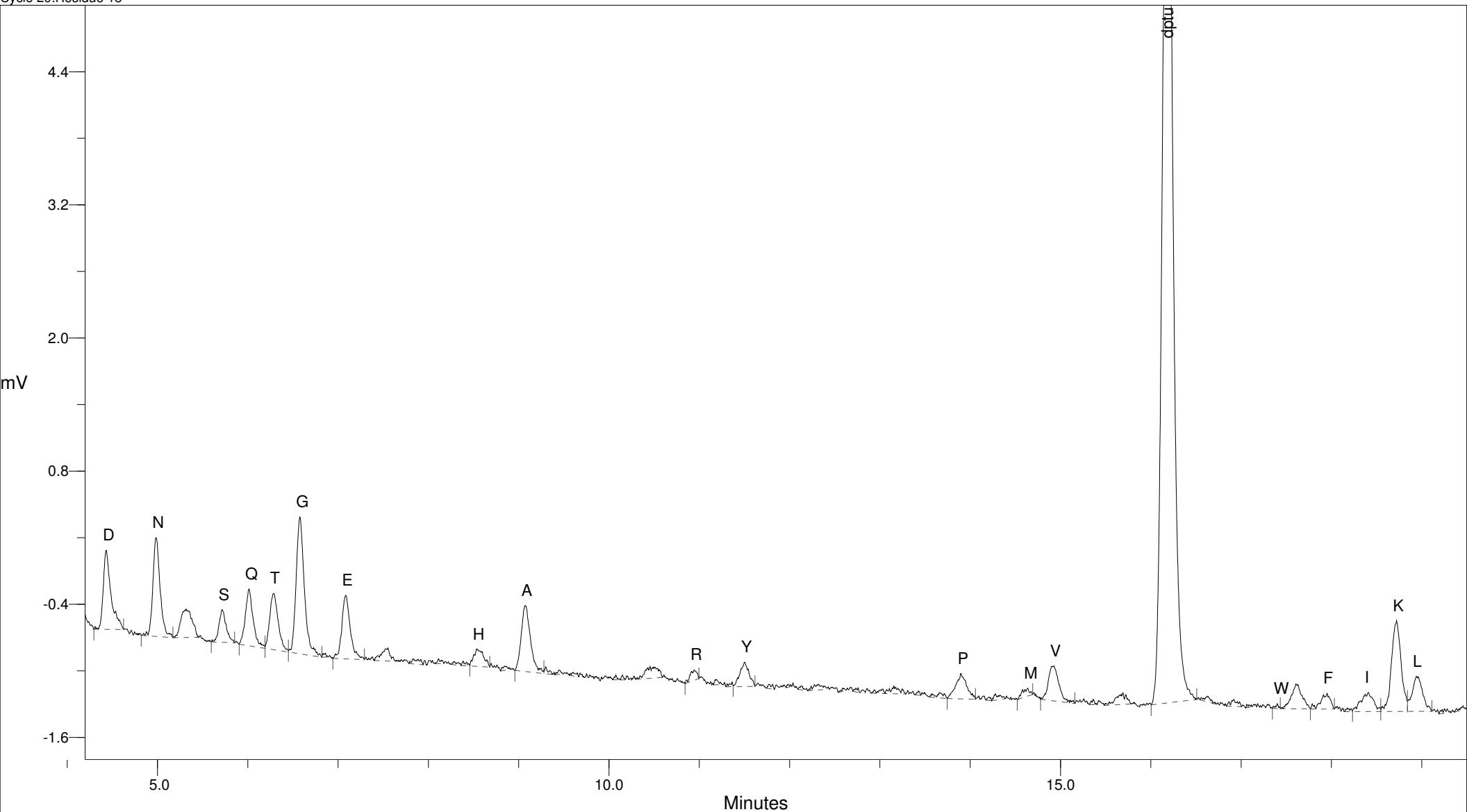
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.42	4.43	0.695	1.760	Y	11.48	11.50	0.207	0.809
N	4.97	4.95	0.915	2.480	P	13.89	13.90	0.156	0.662
S	5.70	5.69	0.326	1.362	M	14.62	14.63	0.074	0.265
Q	6.00	5.98	0.472	1.566	V	14.91	14.93	0.314	1.122
T	6.28	6.25	0.312	1.307	dptu	16.19	16.19	8.475	37.833
G	6.56	6.55	1.256	4.985	W	17.23	17.32	0.047	0.156
E	7.08	7.07	0.526	1.482	F	17.94	17.95	0.126	0.476
H	8.53	8.52	0.180	0.824	I	18.42	18.41	0.153	0.725
A	9.07	9.06	0.558	2.087	K	18.73	18.73	0.768	2.008
R	10.93	10.91	0.119	0.652	L	18.98	18.96	0.281	1.109

Cycle 19:Residue 17



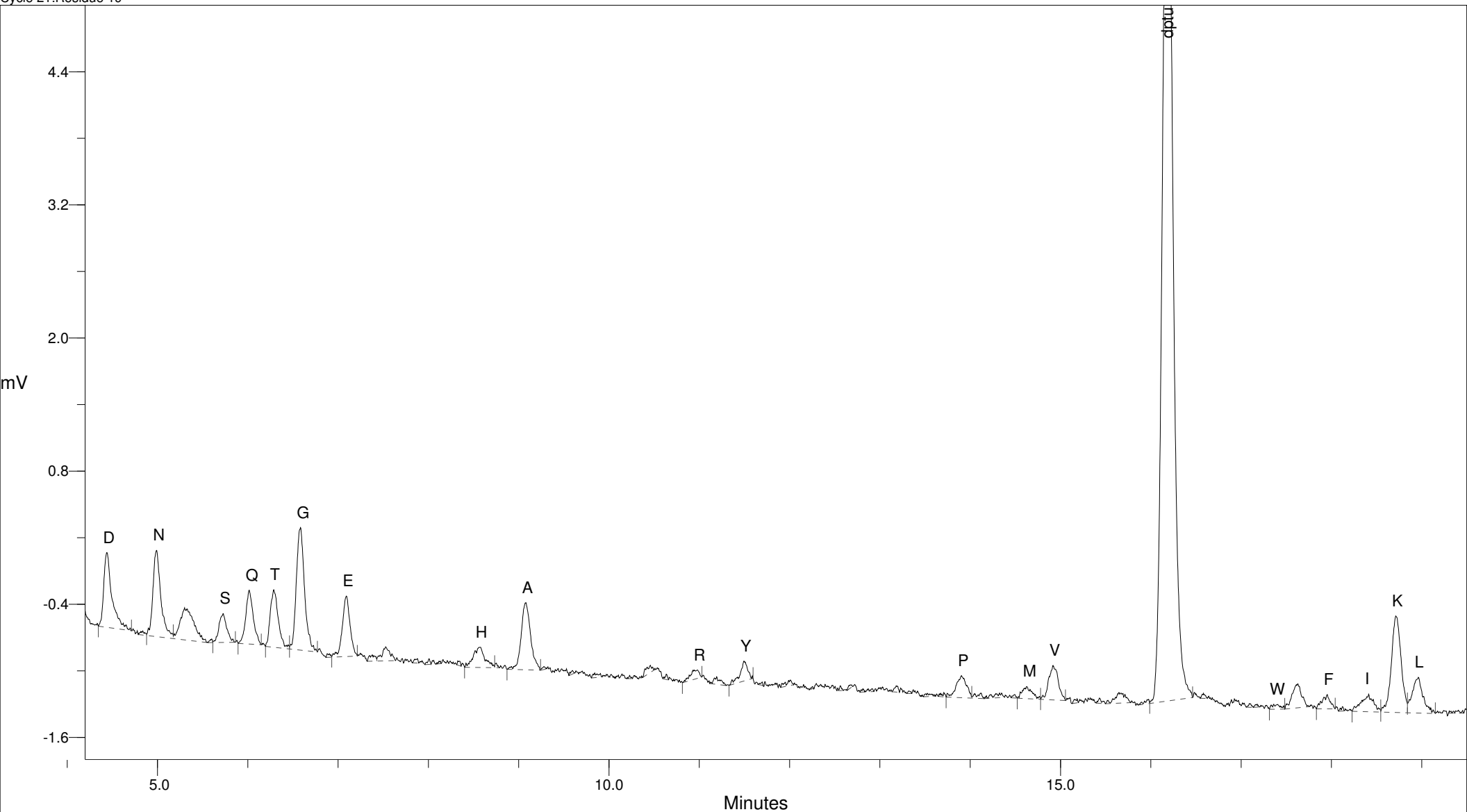
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.43	4.43	0.723	1.831	Y	11.51	11.50	0.199	0.775
N	4.98	4.95	0.884	2.397	P	13.90	13.90	0.191	0.810
S	5.71	5.69	0.292	1.218	M	14.63	14.63	0.083	0.297
Q	6.00	5.98	0.489	1.623	V	14.92	14.93	0.351	1.255
T	6.28	6.25	0.420	1.761	dptu	16.18	16.19	9.033	40.322
G	6.58	6.55	1.239	4.917	W	17.26	17.32	0.035	0.118
E	7.08	7.07	0.568	1.602	F	17.94	17.95	0.111	0.420
H	8.54	8.52	0.166	0.760	I	18.43	18.41	0.153	0.724
A	9.08	9.06	0.572	2.137	K	18.72	18.73	0.728	1.902
R	10.94	10.91	0.120	0.656	L	18.95	18.96	0.300	1.187

Cycle 20:Residue 18



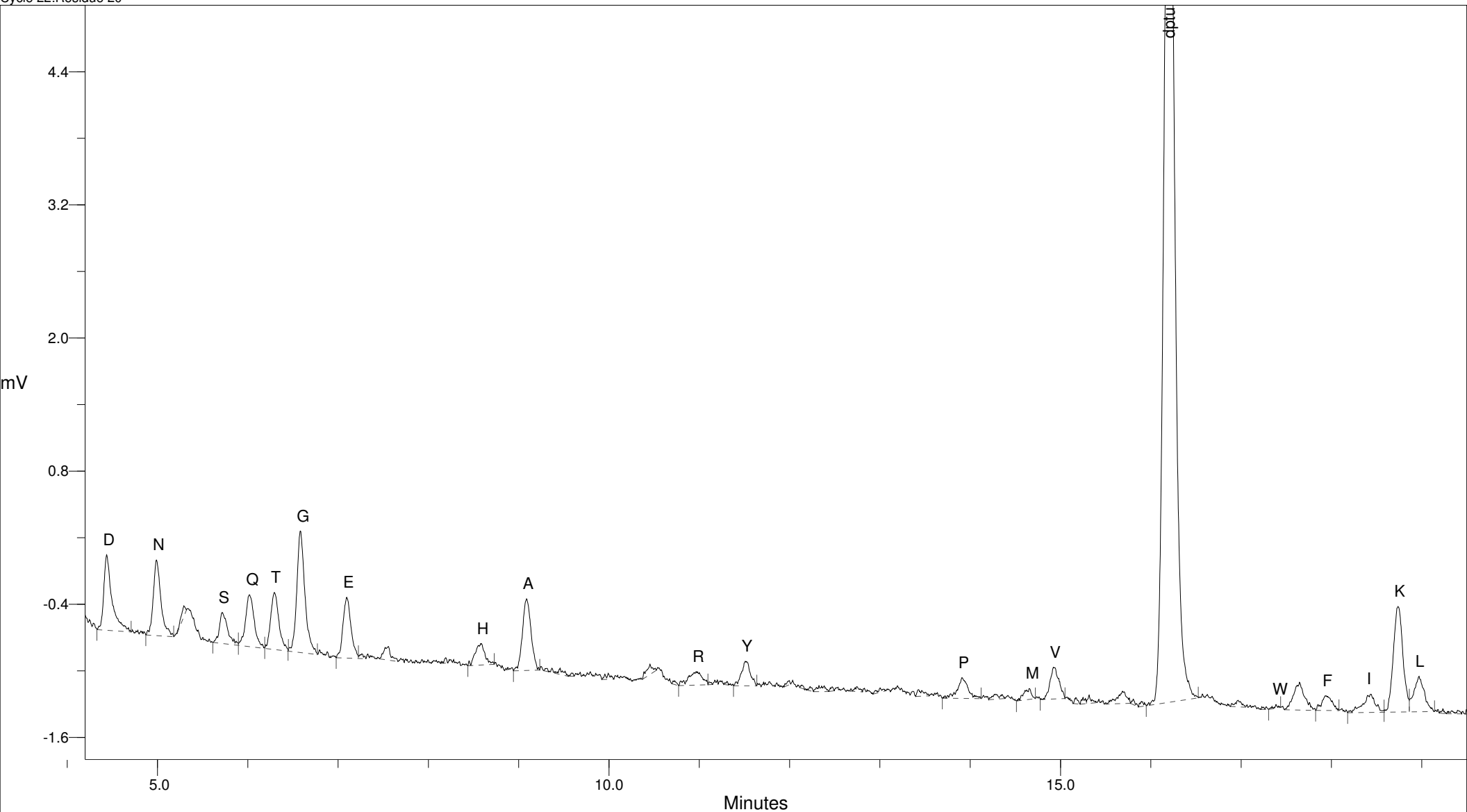
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.43	4.43	0.713	1.806	Y	11.50	11.50	0.221	0.862
N	4.98	4.95	0.890	2.414	P	13.90	13.90	0.228	0.968
S	5.72	5.69	0.295	1.231	M	14.64	14.63	0.072	0.258
Q	6.01	5.98	0.514	1.703	V	14.93	14.93	0.314	1.123
T	6.29	6.25	0.508	2.130	dptu	16.18	16.19	9.278	41.415
G	6.58	6.55	1.237	4.908	W	17.40	17.32	0.042	0.143
E	7.08	7.07	0.574	1.620	F	17.95	17.95	0.143	0.540
H	8.53	8.52	0.156	0.714	I	18.41	18.41	0.172	0.814
A	9.07	9.06	0.595	2.222	K	18.72	18.73	0.818	2.138
R	10.94	10.91	0.095	0.519	L	18.94	18.96	0.316	1.247

Cycle 21:Residue 19



PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.44	4.43	0.675	1.710	Y	11.50	11.50	0.180	0.702
N	4.99	4.95	0.779	2.113	P	13.90	13.90	0.199	0.843
S	5.73	5.69	0.261	1.092	M	14.63	14.63	0.110	0.395
Q	6.02	5.98	0.488	1.617	V	14.92	14.93	0.310	1.107
T	6.29	6.25	0.517	2.169	dptu	16.18	16.19	8.846	39.488
G	6.58	6.55	1.105	4.386	W	17.36	17.32	0.046	0.155
E	7.09	7.07	0.545	1.536	F	17.95	17.95	0.129	0.486
H	8.56	8.52	0.182	0.835	I	18.41	18.41	0.158	0.748
A	9.08	9.06	0.606	2.265	K	18.71	18.73	0.870	2.273
R	10.98	10.91	0.076	0.417	L	18.96	18.96	0.323	1.275

Cycle 22:Residue 20



PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.44	4.43	0.680	1.722	Y	11.51	11.50	0.220	0.858
N	4.99	4.95	0.681	1.847	P	13.91	13.90	0.188	0.796
S	5.72	5.69	0.281	1.172	M	14.65	14.63	0.098	0.353
Q	6.02	5.98	0.468	1.553	V	14.92	14.93	0.286	1.020
T	6.30	6.25	0.515	2.160	dptu	16.20	16.19	9.442	42.149
G	6.58	6.55	1.096	4.348	W	17.39	17.32	0.034	0.114
E	7.10	7.07	0.549	1.547	F	17.94	17.95	0.133	0.502
H	8.58	8.52	0.194	0.888	I	18.43	18.41	0.165	0.780
A	9.09	9.06	0.646	2.414	K	18.74	18.73	0.951	2.486
R	10.97	10.91	0.122	0.670	L	18.97	18.96	0.321	1.267

Raw Pmol Table

	ASP	ASN	SER	GLN	THR	GLY	GLU	HIS	ALA	ARG	TYR	PRO	MET	VAL	TRP	PHE	ILE	LYS	LEU
1	1.226	0.609	3.335	1.607	0.979	73.48	13.08	0.458	2.436	0.861	1.085	0.358	0.503	1.021	0.133	0.502	0.772	2.506	1.032
2	0.867	0.442	1.463	1.209	1.329	27.67	3.386	0.267	1.687	0.663	0.524	0.574	1.186	0.820	0.070	0.254	0.714	1.297	11.32
3	0.781	0.483	1.153	1.005	0.808	10.65	1.594	0.475	1.366	0.540	0.585	0.596	0.672	1.396	0.000	0.464	0.568	1.237	3.998
4	0.865	0.599	1.075	2.012	0.909	7.127	7.232	0.485	2.286	0.356	0.799	0.645	0.528	1.069	0.156	0.479	0.599	1.179	1.942
5	1.020	0.589	0.976	1.590	1.442	4.911	5.743	0.650	1.989	0.633	0.719	0.803	0.154	1.541	0.108	0.467	0.381	5.655	1.235
6	0.928	0.684	1.097	1.412	2.049	4.507	3.573	0.519	7.042	0.337	0.607	0.788	0.100	1.010	0.130	0.350	0.153	5.083	1.039
7	1.142	0.764	2.997	1.387	1.642	3.885	2.378	0.717	6.453	0.562	0.727	0.738	0.241	1.487	0.000	0.466	0.733	3.255	1.034
8	1.156	0.758	2.998	1.358	1.561	3.634	1.801	0.875	4.584	0.604	0.763	0.733	0.205	1.270	0.168	0.432	1.274	4.757	0.925
9	1.281	0.891	2.274	1.447	3.593	3.583	1.531	0.777	3.563	0.665	0.710	0.714	0.375	1.073	0.107	0.465	1.113	5.061	1.035
10	1.142	1.031	1.851	1.483	3.964	3.589	1.470	0.859	2.951	0.437	0.740	0.803	0.291	0.982	0.133	0.633	0.732	3.848	1.000
11	1.201	0.858	1.921	1.345	2.938	3.278	1.415	0.741	2.607	0.373	0.725	0.696	0.329	1.334	0.173	0.748	0.581	2.556	1.106
12	1.228	0.992	1.892	1.334	2.168	4.077	1.428	0.757	2.344	0.625	0.783	0.691	0.439	1.347	0.110	0.649	0.682	2.096	1.073
13	1.522	1.440	1.785	1.402	1.777	4.550	1.453	0.780	2.268	0.240	0.823	0.613	0.290	1.258	0.153	0.670	0.760	2.092	1.247
14	1.280	1.764	1.434	1.338	1.405	3.850	1.250	0.639	1.773	0.331	0.697	0.454	0.310	1.008	0.143	0.485	0.564	1.816	1.059
15	1.780	2.357	1.504	1.693	1.525	4.943	1.630	0.871	2.204	0.773	0.786	0.618	0.367	1.377	0.205	0.627	0.788	2.192	1.260
16	1.760	2.480	1.362	1.566	1.307	4.985	1.482	0.824	2.087	0.652	0.809	0.662	0.265	1.122	0.156	0.476	0.725	2.008	1.109
17	1.831	2.397	1.218	1.623	1.761	4.917	1.602	0.760	2.137	0.656	0.775	0.810	0.297	1.255	0.118	0.420	0.724	1.902	1.187
18	1.806	2.414	1.231	1.703	2.130	4.908	1.620	0.714	2.222	0.519	0.862	0.968	0.258	1.123	0.143	0.540	0.814	2.138	1.247
19	1.710	2.113	1.092	1.617	2.169	4.386	1.536	0.835	2.265	0.417	0.702	0.843	0.395	1.107	0.155	0.486	0.748	2.273	1.275
20	1.722	1.847	1.172	1.553	2.160	4.348	1.547	0.888	2.414	0.670	0.858	0.796	0.353	1.020	0.114	0.502	0.780	2.486	1.267

9.4 Anexo4: Blastp del fragmento identificado por degradación de Edman.

BLAST ®

Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/ BLAST/ blastp suite/](#) **Formatting Results - 179KS3CG016**
[Formatting options](#)
[Download](#)
[Blast report description](#)

ELCEKASKT

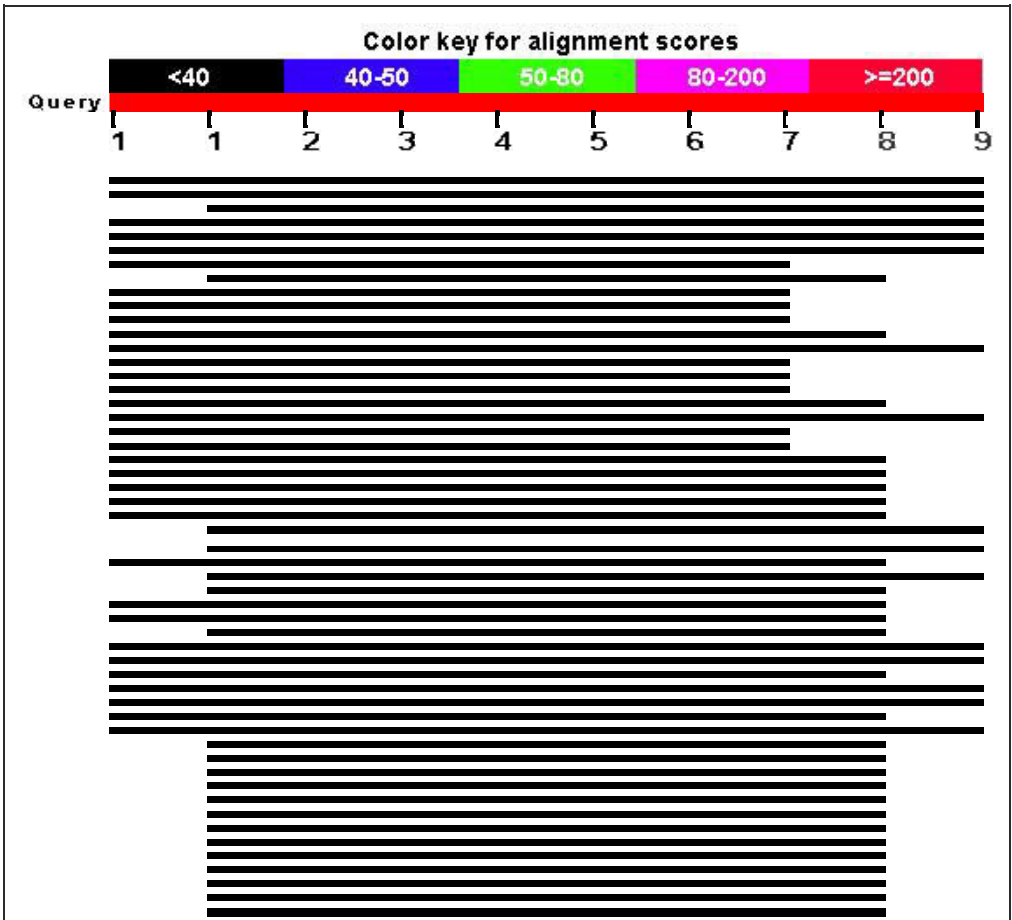
Query ID |cl|28889
Description None
Molecule type amino acid
Query Length 9

Database Name nr
Description All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
Program BLASTP 2.2.28+

Graphic Summary

No putative conserved domains have been detected

Distribution of 103 Blast Hits on the Query Sequence



Descriptions

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
RecName: Full=Defensin-like protein 1; AltName: Full=Cysteine-rich antimicrobial protein 1; AltName: Full=Defensin AMP1; Short=DmAMP1 >pir S66221 defensin AMP1 - Dahlia merckii >gb AAB34972.1 defensin Dm-AMP1=cysteine-rich antimicrobial protein [Dahlia merckii, seeds, Peptide, 50 aa]	31.2	31.2	100%	2.5	100%	P0C8Y4.1
defensin AMP2 - Dahlia merckii (fragment) >gb AAB34973.1 defensin Dm-AMP2=cysteine-rich antimicrobial protein [Dahlia merckii, seeds, Peptide Partial, 20 aa]	27.4	27.4	100%	18	89%	S66222
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: zinc finger protein 605-like [Echinops telfairi]	27.8	27.8	88%	58	100%	XP_004709818.1
defensin [Helianthus annuus]	26.9	26.9	100%	91	89%	AAM27914.1
conserved hypothetical protein [Neospora caninum Liverpool] >emb CBZ51386.1 conserved hypothetical protein [Neospora caninum Liverpool]	26.1	26.1	100%	198	89%	XP_003881419.1
PREDICTED: calpain-7-like [Strongylocentrotus purpuratus]	25.7	25.7	100%	271	89%	XP_003729856.1
MarR family transcriptional regulator [Burkholderia ambifaria AMMD] >ref WP_011657239.1 MarR family transcriptional regulator [Burkholderia ambifaria] >gb ABI87554.1 transcriptional regulator, MarR family [Burkholderia ambifaria AMMD]	25.2	25.2	77%	338	100%	YP_773888.1
hypothetical protein [Cardiobacterium valvarum] >gb EHM54678.1 hypothetical protein HMPREF9080_01122 [Cardiobacterium valvarum F0432]	24.8	24.8	77%	338	100%	WP_006985140.1
putative low-complexity protein [Cylindrospermum stagnale PCC 7417] >ref WP_015211182.1 putative low-complexity protein [Cylindrospermum stagnale] >gb AFZ27949.1 putative low-complexity protein [Cylindrospermum stagnale PCC 7417]	25.2	25.2	77%	340	100%	YP_007150629.1
GM19272 [Drosophila sechellia] >gb EDW45274.1 GM19272 [Drosophila sechellia]	25.2	25.2	77%	342	100%	XP_002046044.1
ribosomal RNA methyltransferase RrmJ/FtsJ [Thermodesulfatator indicus DSM 15286] >ref WP_013907769.1 50S rRNA methyltransferase [Thermodesulfatator indicus] >gb AEH45027.1 ribosomal RNA methyltransferase RrmJ/FtsJ [Thermodesulfatator indicus DSM 15286]	25.2	25.2	77%	346	100%	YP_004625991.1
predicted protein [Ostreococcus lucimarinus CCE9901] >gb ABO97710.1 predicted protein [Ostreococcus lucimarinus CCE9901]	25.2	25.2	88%	350	88%	XP_001419417.1
serine dehydratase subunit alpha						

[Paenibacillus sanguinis]	25.2	25.2	100%	356	78%	WP_018751070.1
GD18587 [Drosophila simulans] >gb EDX13688.1 GD18587 [Drosophila simulans]	25.2	25.2	77%	359	100%	XP_002104185.1
GM23777 [Drosophila sechellia] >gb EDW42944.1 GM23777 [Drosophila sechellia]	25.2	25.2	77%	359	100%	XP_002031958.1
DNA polymerase eta subunit [Galdieria sulphuraria]	25.2	42.4	77%	364	100%	EME29580.1
predicted protein [Fibroporia radiculosa]	25.2	42.0	88%	364	88%	CCM05185.1
PREDICTED: uncharacterized protein LOC100798058 [Glycine max]	25.2	25.2	100%	368	78%	XP_003548564.1
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7-like [Monodelphis domestica]	25.2	25.2	77%	369	100%	XP_003341676.1
PREDICTED: ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 [Sarcophilus harrisii]	25.2	25.2	77%	369	100%	XP_003761763.1
hypothetical protein, partial [Streptococcus suis GZ1] >ref WP_014636060.1 hypothetical protein, partial [Streptococcus suis] >gb ADE31747.1 hypothetical protein SSGZ1_1291 [Streptococcus suis GZ1]	24.8	24.8	88%	394	88%	YP_006074689.1
Protein B0563.8 [Caenorhabditis elegans] >sp Q11084.2 YT68_CAEEL RecName: Full=Uncharacterized protein B0563.8 >emb CCD62261.1 Protein B0563.8 [Caenorhabditis elegans]	24.8	24.8	88%	424	88%	NP_509548.2
hypothetical protein SSUST1_1360 [Streptococcus suis ST1] >ref WP_014736123.1 hypothetical protein [Streptococcus suis] >gb AER21714.1 hypothetical protein SSUST1_1360 [Streptococcus suis ST1]	24.8	24.8	88%	437	88%	YP_006359232.1
hypothetical protein SSUSC84_1307 [Streptococcus suis SC84] >ref YP_003027125.1 hypothetical protein SSU1277 [Streptococcus suis P1/7] >ref YP_003029059.1 hypothetical protein SSUBM407_1354 [Streptococcus suis BM407] >ref YP_006650137.1 hypothetical protein YYK_06130 [Streptococcus suis S735] >ref WP_012775241.1 hypothetical protein [Streptococcus suis] >emb CAZ52083.1 hypothetical protein SSUSC84_1307 [Streptococcus suis SC84] >emb CAZ56211.1 hypothetical protein SSUBM407_1354 [Streptococcus suis BM407] >emb CAR46663.1 hypothetical protein SSU1277 [Streptococcus suis P1/7] >gb AFR00739.1 hypothetical protein YYK_06130 [Streptococcus suis S735]	24.8	24.8	88%	437	88%	YP_003025299.1
hypothetical protein SSUST3_1322 [Streptococcus suis ST3] >ref YP_006076758.1 hypothetical protein SSUJS14_1427 [Streptococcus suis JS14] >ref YP_006078771.1 hypothetical protein SSU12_1344 [Streptococcus suis SS12] >ref YP_006080903.1 hypothetical protein SSUD9_1471 [Streptococcus suis D9] >ref YP_006082964.1						

hypothetical protein SSUD12_1436 [Streptococcus suis D12] >ref WP_009910392.1 hypothetical protein [Streptococcus suis] >gb ADV70487.1 hypothetical protein SSUJS14_1427 [Streptococcus suis JS14] >gb AEB81747.1 hypothetical protein SSUST3_1322 [Streptococcus suis ST3] >gb AER15523.1 hypothetical protein SSU12_1344 [Streptococcus suis SS12] >gb AER17655.1 hypothetical protein SSUD9_1471 [Streptococcus suis D9] >gb AER19716.1 hypothetical protein SSUD12_1436 [Streptococcus suis D12]	24.8	24.8	88%	438	88%	YP_004401933.1
Chain A, Solution Structure Of The Major Allergen Of Artemisia Vulgaris (Art V 1)	24.8	24.8	88%	442	88%	2KPY_A
major pollen allergen Artv1 [synthetic construct]	24.8	24.8	88%	443	88%	AAQ07455.1
hypothetical protein SSUA7_1292 [Streptococcus suis A7] >ref YP_007571293.1 hypothetical protein NJAUSS_1350 [Streptococcus suis SC070731] >ref WP_002935612.1 hypothetical protein [Streptococcus suis] >gb EEF65159.1 hypothetical protein SsuiDRAFT_3475 [Streptococcus suis 89/1591] >gb AER44612.1 hypothetical protein SSUA7_1292 [Streptococcus suis A7] >gb AGG64812.1 hypothetical protein NJAUSS_1350 [Streptococcus suis SC070731]	24.8	24.8	88%	444	88%	YP_006084954.1
RecName: Full=Major pollen allergen Art v 1; AltName: Full=Defensin-like protein 1; AltName: Allergen=Art v 1; Flags: Precursor >gb AAQ24900.1 major pollen allergen Art v 1 precursor [Artemisia vulgaris]	24.8	24.8	88%	454	88%	Q84ZX5.1
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PpiC-type [Rhodosporidium toruloides NP11]	24.8	24.8	77%	464	100%	EMS23402.1
sodium transport system ATP-binding protein [Pseudoalteromonas sp. Bsw20308] >gb EKS12821.1 sodium transport system ATP-binding protein [Pseudoalteromonas sp. Bsw20308]	24.8	24.8	88%	479	88%	WP_007376924.1
ABC transporter [Pseudoalteromonas sp. BSi20495] >dbj GAA78918.1 sodium transport system ATP-binding protein [Pseudoalteromonas sp. BSi20495]	24.8	24.8	88%	479	88%	WP_008135099.1
exopolysaccharide biosynthesis protein, WecB/TagA/CpsF family [Leptolyngbya sp. PCC 7375] >gb EKU97430.1 exopolysaccharide biosynthesis protein, WecB/TagA/CpsF family [Leptolyngbya sp. PCC 7375]	24.8	24.8	77%	484	100%	WP_006518612.1
L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Paenibacillus barengoltzii] >gb EOS55682.1 L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Paenibacillus barengoltzii G22]	24.8	24.8	100%	484	78%	WP_016313253.1
PREDICTED: cinnamoyl-CoA reductase 1-like [Setaria italica]	24.8	24.8	100%	486	60%	XP_004956189.1
Ribose-phosphate pyrophosphokinase [Scheffersomyces stipitis CBS 6054] >gb EAZ63478.2 Ribose-phosphate	24.8	24.8	88%	486	88%	XP_001387501.2

pyrophosphokinase [Scheffersomyces stipitis CBS 6054]

PREDICTED: bifunctional dihydroflavonol 4-reductase/flavanone 4-reductase-like [Brachypodium distachyon]

hypothetical protein RO3G_09432 [Rhizopus delemar RA 99-880]

PREDICTED: uncharacterized protein LOC101068202 [Takifugu rubripes]

related to vegetatible incompatibility protein HET-E-1 [Claviceps purpurea 20.1]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus RM]

polyprotein orf1ab [Feline coronavirus UU54]

polyprotein orf1ab [Feline coronavirus UU20]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU24]

polyprotein orf1ab [Feline coronavirus UU47]

polyprotein orf1ab [Feline coronavirus UU30]

polyprotein orf1ab [Feline coronavirus UU19]

polyprotein orf1ab [Feline coronavirus UU40]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU34]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU31]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU21]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU18]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU17]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU23]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU22]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU9]

polyprotein orf1ab [Feline coronavirus UU16]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU3]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU2]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU15]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU5]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU8]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU4]

orf1ab polyprotein [Feline coronavirus

24.8	24.8	100%	487	60%	XP_003567728.1
24.8	24.8	100%	489	78%	E84722.1
24.8	24.8	88%	491	88%	XP_003978116.1
24.8	24.8	100%	504	78%	CCE30648.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ACT10853.1
24.8	24.8	77%	508	100%	AEK25520.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ADO39838.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ADL71475.1
24.8	24.8	77%	508	100%	AEK25510.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ADO39849.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ADO39827.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ADO39816.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ADL71496.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ADL71485.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ADL71465.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ADL71454.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ADL71445.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ADC35471.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ADC35460.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ACT10969.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ACT10926.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ACT10958.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ACT10947.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ACT10915.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ACT10905.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ACT10895.1
24.8	24.8	77%	508	100%	ACT10886.1

UU7]	24.8	24.8	77%	508	100%	ACT10875.1
polyprotein 1ab [Feline coronavirus]	24.8	24.8	77%	508	100%	ABI14446.1
polyprotein 1ab [Feline coronavirus]	24.8	24.8	77%	508	100%	ABX60144.1
orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU10]	24.8	24.8	77%	508	100%	ACT10936.1
orf1ab polyprotein [Feline coronavirus UU11]	24.8	24.8	77%	508	100%	ACT10864.1
orf1ab [SARS coronavirus GD01]	24.8	24.8	77%	508	100%	AAP51225.1
nonstructural polyprotein [SARS coronavirus GZ02]	24.8	24.8	77%	508	100%	AAS00002.1
hypothetical protein ST0775 [Sulfolobus tokodaii str. 7] >ref WP_010978770.1 methyltransferase type 11 [Sulfolobus tokodaii] >dbj BAB65787.1 hypothetical protein STK_07750 [Sulfolobus tokodaii str. 7]	24.4	24.4	88%	638	88%	NP_376678.1
dihydrodipicolinate reductase [Porphyromonas catoniae] >gb EKY00849.1 dihydrodipicolinate reductase [Porphyromonas catoniae F0037]	24.4	24.4	100%	653	78%	WP_005467248.1
dihydrodipicolinate reductase [Bacteroides sp. CAG:189]	24.4	24.4	100%	654	78%	CCY48567.1
dihydrodipicolinate reductase [Bacteroides salyersiae] >gb EY66170.1 dihydrodipicolinate reductase [Bacteroides salyersiae CL02T12C01] >gb EOA50709.1 dihydrodipicolinate reductase [Bacteroides salyersiae WAL 10018 = DSM 18765 = JCM 12988]	24.4	24.4	100%	654	78%	WP_005927709.1
hypothetical protein [candidate division OP9 bacterium OP9-cSCG]	24.4	24.4	88%	654	88%	WP_017889032.1
hypothetical protein [candidate division OP9 bacterium OP9-77CS]	24.4	24.4	88%	654	88%	WP_017872408.1
RhsD protein [Xanthomonas oryzae pv. oryzae KACC 10331] >ref YP_450489.1 Rhs-related protein [Xanthomonas oryzae pv. oryzae MAFF 311018] >ref WP_011258354.1 type IV secretion protein Rhs [Xanthomonas oryzae] >gb AAW74834.1 RhsD protein [Xanthomonas oryzae pv. oryzae KACC 10331] >dbj BAE68215.1 putative Rhs-related protein [Xanthomonas oryzae pv. oryzae MAFF 311018]	24.4	24.4	100%	672	89%	YP_200219.1
Flavinbinding monooxygenase-like subfamily protein [Acanthamoeba castellanii str. Neff] >gb ELR13200.1 Flavinbinding monooxygenase-like subfamily protein [Acanthamoeba castellanii str. Neff]	24.4	24.4	100%	674	78%	XP_004335213.1
hypothetical protein TREMEDRAFT_29917, partial [Tremella mesenterica DSM 1558]	24.4	24.4	88%	674	88%	EW70192.1
RhsD protein [Xanthomonas oryzae pv. oryzae PXO99A] >ref WP_012444433.1 type IV secretion protein Rhs [Xanthomonas oryzae] >gb ACD58112.1 RhsD protein [Xanthomonas oryzae pv. oryzae PXO99A]	24.4	24.4	100%	681	89%	YP_001912644.1
RhsD protein [Xanthomonas oryzae pv. oryzae BLS256] >ref WP_014504328.1 type IV secretion protein Rhs [Xanthomonas oryzae]	24.4	24.4	100%	681	89%	YP_005629779.1

>gb|AEQ97611.1| RhsD protein
[Xanthomonas oryzae pv. oryzicola
BLS256]

PREDICTED: arf-GAP with Rho-GAP
domain, ANK repeat and PH domain-
containing protein 2-like [Bombyx mori]

24.4

24.4

100%

682

89%

[XP_004932886.1](#)

type IV secretion protein Rhs
[Xanthomonas gardneri]

24.4

24.4

100%

684

89%

[WP_006448935.1](#)

>gb|EGD20740.1| Rhs family protein
[Xanthomonas gardneri ATCC 19865]

hypothetical protein PITG_08180
[Phytophthora infestans T30-4]

24.0

24.0

100%

775

80%

[XP_002904342.1](#)

>gb|EEY54520.1| hypothetical protein
PITG_08180 [Phytophthora infestans
T30-4]

hypothetical protein [Bacillus sp.
10403023]

24.0

24.0

88%

852

88%

[WP_010284518.1](#)

negative regulator of genetic competence
sporulation and motility [Clostridium sp.
CAG:921]

24.0

24.0

88%

881

88%

[CCY70971.1](#)

haloacid dehalogenase superfamily
subfamily IA variant 1 with third motif
having Dx(3-4)D or Dx(3-4)E [Clostridium
sp. CAG:352]

24.0

24.0

88%

888

88%

[CDC39889.1](#)

amino acid ABC transporter substrate-
binding protein [[Clostridium] difficile]

24.0

24.0

100%

891

78%

[WP_009904280.1](#)

enoyl-CoA hydratase [Bacillus
coahuilensis]

24.0

24.0

88%

891

89%

[WP_010174169.1](#)

amino acid ABC transporter substrate-
binding protein [Clostridium difficile
CD196] >ref|YP_003218163.1| amino
acid ABC transporter substrate-binding
protein [Clostridium difficile R20291]
>ref|YP_006198903.1| amino acid ABC
transporter, substrate-binding protein
[Clostridium difficile BI1]
>ref|WP_009889730.1| amino acid ABC
transporter substrate-binding protein
[[Clostridium] difficile]
>emb|CBA63246.1| amino acid ABC
transporter, substrate-binding protein
[Clostridium difficile CD196]
>emb|CBE04400.1| amino acid ABC
transporter, substrate-binding protein
[Clostridium difficile R20291]

24.0

24.0

100%

893

78%

[YP_003214719.1](#)

hypothetical protein [Alistipes
senegalensis]

24.0

24.0

88%

900

88%

[WP_019149542.1](#)

ribose-phosphate pyrophosphokinase 2
[Candida tropicalis MYA-3404]
>gb|EER35479.1| ribose-phosphate
pyrophosphokinase 2 [Candida tropicalis
MYA-3404]

24.0

24.0

88%

901

89%

[XP_002545437.1](#)

LacI family transcription regulator
[Succinatimonas hippei]

>gb|EFY06098.1| sugar-binding domain
protein [Succinatimonas hippei YIT
12066]

24.0

24.0

88%

902

88%

[WP_009144325.1](#)

hypothetical protein [Planctomyces
maris] >gb|EDL62422.1| hypothetical
protein PM8797T_28879 [Planctomyces
maris DSM 8797]

24.0

24.0

100%

902

78%

[WP_002643749.1](#)

PREDICTED: mannose-1-phosphate
guanylttransferase beta-like [Nasonia
vitripennis]

24.0

24.0

88%

905

88%

[XP_001598989.2](#)

hypothetical protein [Clostridium leptum]
>gb|EDO60250.1| malate/L-lactate

24.0

24.0

100%

908

80%

[WP_003532702.1](#)

dehydrogenase [Clostridium leptum
DSM 753]

hypothetical protein [Clostridium
butyricum] >gb|EMU52045.1|

amylopullulanase [Clostridium butyricum
DKU-01] >gb|ENZ29493.1| hypothetical
protein HMPREF1084_04202
[Clostridium butyricum 60E.3]

24.0

24.0

88%

918

89%

[WP_002583134.1](#)

alpha-amylase [Clostridium butyricum]
>gb|EDT77120.1| amylopullulanase
[Clostridium butyricum 5521]
>gb|EEP52592.1| amylopullulanase
[Clostridium butyricum E4 str. BoNT E
BL5262]

24.0

24.0

88%

918

89%

[WP_003406183.1](#)

hypothetical protein [Marinilabilia
salmonicolor]

24.0

44.1

88%

920

88%

[WP_010663716.1](#)

structural maintenance of chromosome
protein, putative [Entamoeba invadens
IP1] >gb|ELP95070.1| structural
maintenance of chromosome protein,
putative [Entamoeba invadens IP1]

24.0

24.0

88%

926

88%

[XP_004261841.1](#)

Alignments

RecName: Full=Defensin-like protein 1; AltName: Full=Cysteine-rich antimicrobial protein 1; AltName: Full=Defensin AMP1;
Short=DmAMP1

Sequence ID: **sp|P0C8Y4.1|DEF1_DAHME** Length: 50 Number of Matches: 1

See 2 more title(s)

Range 1: 1 to 9

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
31.2 bits(66)	2.5()		9/9(100%)	9/9(100%)	0/9(0%)	

Features:

Query 1 ELCEKASKT 9
ELCEKASKT
Sbjct 1 ELCEKASKT 9

defensin AMP2 - Dahlia merckii (fragment)

Sequence ID: **pir||S66222** Length: 20 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 1 to 9

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
27.4 bits(57)	18()		8/9(89%)	8/9(88%)	0/9(0%)	

Features:

Query 1 ELCEKASKT 9
E CEKASKT
Sbjct 1 EVCEKASKT 9

PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: zinc finger protein 605-like [Echinops telfairi]

Sequence ID: **ref|XP_004709818.1|** Length: 1213 Number of Matches: 1

Range 1: 101 to 108

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
27.8 bits(58)	58()		8/8(100%)	8/8(100%)	0/8(0%)	

Features:

Query 2 LCEKASKT 9
 LCEKASKT
 Sbjct 101 LCEKASKT 108

defensin [*Helianthus annuus*]

Sequence ID: **gb|AAM27914.1|AF364865_1** Length: 108 Number of Matches: 1

Range 1: 29 to 37

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
26.9 bits(56)	91()		8/9(89%)	8/9(88%)	0/9(0%)	

Features:

Query 1 ELCEKASKT 9
 ELCEKAS T
 Sbjct 29 ELCEKASQT 37

conserved hypothetical protein [*Neospora caninum* Liverpool]

Sequence ID: **ref|XP_003881419.1|** Length: 774 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 725 to 733

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
26.1 bits(54)	198()		8/9(89%)	8/9(88%)	0/9(0%)	

Features:

Query 1 ELCEKASKT 9
 ELC KASKT
 Sbjct 725 ELCKKASKT 733

PREDICTED: calpain-7-like [*Strongylocentrotus purpuratus*]

Sequence ID: **ref|XP_003729856.1|** Length: 959 Number of Matches: 1

Range 1: 58 to 66

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
25.7 bits(53)	271()		8/9(89%)	8/9(88%)	0/9(0%)	

Features:

Query 1 ELCEKASKT 9
 ELC KASKT
 Sbjct 58 ELCIKASKT 66

MarR family transcriptional regulator [*Burkholderia ambifaria* AMMD]

Sequence ID: **ref|YP_773888.1|** Length: 154 Number of Matches: 1

See 2 more title(s)

Range 1: 134 to 140

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
25.2 bits(52)	338()		7/7(100%)	7/7(100%)	0/7(0%)	

Features:

Query 1 ELCEKAS 7
 ELCEKAS
 Sbjct 134 ELCEKAS 140

hypothetical protein [Cardiobacterium valvarum]

Sequence ID: **ref|WP_006985140.1|** Length: 42 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 28 to 34

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
24.8 bits(51)	338()		7/7(100%)	7/7(100%)	0/7(0%)	

Features:

```
Query  2  LCEKASK  8
       LCEKASK
Sbjct  28  LCEKASK  34
```

putative low-complexity protein [Cylindrospermum stagnale PCC 7417]

Sequence ID: **ref|YP_007150629.1|** Length: 162 Number of Matches: 1

See 2 more title(s)

Range 1: 139 to 145

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
25.2 bits(52)	340()		7/7(100%)	7/7(100%)	0/7(0%)	

Features:

```
Query  1  ELCEKAS  7
       ELCEKAS
Sbjct  139 ELCEKAS  145
```

GM19272 [Drosophila sechellia]

Sequence ID: **ref|XP_002046044.1|** Length: 172 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 127 to 133

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
25.2 bits(52)	342()		7/7(100%)	7/7(100%)	0/7(0%)	

Features:

```
Query  1  ELCEKAS  7
       ELCEKAS
Sbjct  127 ELCEKAS  133
```

ribosomal RNA methyltransferase RmJ/FtsJ [Thermodesulfatator indicus DSM 15286]

Sequence ID: **ref|YP_004625991.1|** Length: 195 Number of Matches: 1

See 2 more title(s)

Range 1: 95 to 101

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
25.2 bits(52)	346()		7/7(100%)	7/7(100%)	0/7(0%)	

Features:

```
Query  1  ELCEKAS  7
       ELCEKAS
Sbjct  95  ELCEKAS  101
```

predicted protein [Ostreococcus lucimarinus CCE9901]

Sequence ID: **ref|XP_001419417.1|** Length: 227 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 220 to 227

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
25.2 bits(52)	350()		7/8(88%)	7/8(87%)	0/8(0%)	

Features:

Query 1 ELCEKASK 8
 ELCE ASK
 Sbjct 220 ELCEKASK 227

serine dehydratase subunit alpha [Paenibacillus sanguinis]

Sequence ID: **ref|WP_018751070.1|** Length: 295 Number of Matches: 1

Range 1: 11 to 19

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
25.2 bits(52)	356()		7/9(78%)	8/9(88%)	0/9(0%)	

Features:

Query 1 ELCEKASKT 9
 +LCEK SKT
 Sbjct 11 DLCEKESKT 19

GD18587 [Drosophila simulans]

Sequence ID: **ref|XP_002104185.1|** Length: 362 Number of Matches: 1**See 1 more title(s)**

Range 1: 317 to 323

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
25.2 bits(52)	359()		7/7(100%)	7/7(100%)	0/7(0%)	

Features:

Query 1 ELCEKAS 7
 ELCEKAS
 Sbjct 317 ELCEKAS 323

GM23777 [Drosophila sechellia]

Sequence ID: **ref|XP_002031958.1|** Length: 362 Number of Matches: 1**See 1 more title(s)**

Range 1: 317 to 323

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
25.2 bits(52)	359()		7/7(100%)	7/7(100%)	0/7(0%)	

Features:

Query 1 ELCEKAS 7
 ELCEKAS
 Sbjct 317 ELCEKAS 323

[Return to Blast result](#) - View local alignment.**Selected annotation from match** **P0C8Y4** [Customize](#)

Entry	Entry name	Status	Protein names	Organism	Length	Gene names
P0C8Y4	DEF1_DAHME	★	Defensin-like protein 1	Dahlia merckii (Bedding dahlia)	50	

Alignment 1 against P0C8Y4

Score	66	E-value	2.6
Identity	100.0%	Positives	100.0%
Query length	9	Match length	50
Position	P0C8Y4 matches from 1 to 9 (9AA), in the query sequence from 1 to 9 (9AA)		
Graphical	 		



Learn how to print this alignment in color

```
1  ELCEKASKT      9 Query
   ELCEKASKT
1  ELCEKASKT      9 P0C8Y4
```

.....

Annotations

No sequence annotation (features) available for this local alignment.

Amino acid properties

- ☐ Similarity
- ☐ Hydrophobic
- ☐ Negative
- ☐ Positive
- ☐ Aliphatic
- ☐ Tiny
- ☐ Aromatic
- ☐ Charged
- ☐ Small
- ☐ Polar
- ☐ Big
- ☐ Serine Threonine

