

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



**TEMA: “BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS PROCEDENTE DE
PROTEÍNA RESIDUAL DE PAPA (*Solanum Tuberosum*) CONTRA
FITOPATÓGENOS”**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

AUTOR(A):

Jhalmar Andrés Guerrero Rosero

DIRECTOR(A):

Ing. Santiago Zárate Baca MSc.

Ibarra, 2025

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN

CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

ESCUELA DE INGENIERIA EN

BIOTECNOLOGÍA

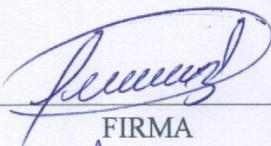
“BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS PROCEDENTE DE PROTEÍNA RESIDUAL DE PAPA (*Solanum Tuberosum*) CONTRA FITOPATÓGENOS”

Trabajo de grado revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su
presentación como requisito parcial para obtener Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

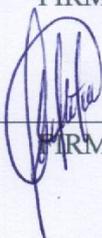
APROBADO:

Ing. Santiago Zárate MSc.
DIRECTOR



FIRMA

Biol. Sania Ortega MSc.
MIEMBRO TRIBUNAL



FIRMA



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto Repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la Universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	DE	0401555701	
APELLIDOS Y NOMBRES:	Y	GUERRERO ROSERO JHALMAR ANDRÉS	
DIRECCIÓN:	Barrio "El Sagrario" Calles Cristóbal Tobar Subia y Dr. Luis Madera		
EMAIL:	jaguerror1@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	-	TELF. MOVIL	0962920070

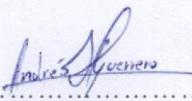
DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS PROCEDENTE DE PROTEÍNA RESIDUAL DE PAPA (<i>Solanum Tuberosum</i>) CONTRA FITOPATÓGENOS
AUTOR (ES):	GUERRERO ROSERO JHALMAR ANDRÉS
FECHA: DD/MM/AAAA	10/02/2025
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> GRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Santiago Zárate Baca MSc.

AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

Yo, Jhalmar Andrés Guerrero Rosero, con cédula de identidad Nro. 0401555701, en calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de integración curricular descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior Artículo 144.

Ibarra, a los 10 días del mes de febrero de 2025

EL AUTOR:

Firma.....

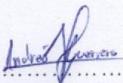
Jhalmar Andrés Guerrero Rosero.

CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 10 días, del mes de febrero de 2025

EL AUTOR:

Firma... 
Jhalmar Andrés Guerrero Rosero

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

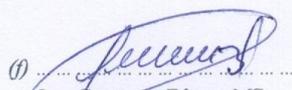
Ibarra, 10 de febrero de 2025

Ing. Santiago Zárate Baca MSc.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

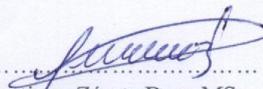
CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.


Ing. Santiago Zárate MSc.
C.C.: 1718974841

APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del trabajo de Integración Curricular
“BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS PROCEDENTE DE
PROTEÍNA RESIDUAL DE PAPA (*Solanum Tuberosum*) CONTRA
FITOPATÓGENOS” elaborado por Jhalmar Andrés Guerrero Rosero, previo a
la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología, aprueba el presente
informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:

(f):.....
Ing. Santiago Zárate Baca MSc.
C.C.: 1718974841

(f):.....
Biol. Sania Ortega MSc.
C.C.: 1002631677

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Aníbal Guerrero y Marcia Rosero quienes han luchado para que yo pueda culminar con éxitos mis estudios, el apoyo siempre estuvo cuando más lo necesite y fueron esa luz al final del día que me inspiró para que no me rindiera, a mi hermano Alexis Guerrero todas esas palabras de aliento me ayudaron a que paso a paso siga hacia adelante con mis estudios, siempre fue una fortaleza dentro de mi vida, a mi abuela Rosa Rosero que con sus locuras y ocurrencias me hacía olvidar de los problemas y a mi hijo Gael Guerrero que todo el tiempo fue mi fortaleza para levantarme día con día, la inspiración que necesitaba para seguir adelante y mi fuente de alegría cuando más triste me encontraba.

AGRADECIMIENTO

Primero quiero agradecer a Dios, por siempre cuidarme y darme la fuerza para seguir adelante. Agradezco a mis padres por su apoyo incondicional tanto económico como emocional, gracias a ellos estoy donde estoy, a mi hijo por ser mi inspiración y mi fuerza para luchar día a día, a mi hermano por todo el apoyo que me brinda en el transcurso de mi vida, sus consejos, risas, y momentos que compartimos, a mi abuela por sus bendiciones sé que no estaría donde estoy sin su apoyo, y a mi novia por ser uno de los pilares fundamentales al momento de realizar mi investigación. A todos los que conocí en este camino llamado Universidad todos mis amigos que siempre estuvieron a mi lado, con quienes luchamos, lloramos y nos divertimos.

También le agradezco a todos los profesores que me ayudaron y enseñaron en esta etapa, en especial a mi tutor el ingeniero Santiago Zárate, quien siempre me inculcó sus valores, compromiso, incorruptibilidad y pasión por la biotecnología, más que un profesor siempre estuvo como un amigo en este camino llamado vida, tengo un especial cariño y le agradezco por todos los momentos de sabiduría que me supo brindar, a mi asesora blga. Sania Ortega ya que su pasión por enseñar siempre se vio reflejada en el aula y su carisma me ayudo a enfrentar nuevos retos.

.

RESUMEN EJECUTIVO

La papa (*Solanum tuberosum*), es el tercer alimento de mayor consumo a nivel mundial, en Ecuador su cultivo se realiza principalmente en las provincias de Carchi, Chimborazo y Tungurahua, generando 82 mil empleos. En el país se estima que existen 550 variedades nativas, 17 silvestres y 23 mejoradas. Una de las limitaciones de su producción son sus problemas fitosanitarios principalmente causados por hongos como *Fusarium* sp y *Botrytis cinérea* que provocan pérdidas económicas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la bioactividad de proteínas provenientes de papa *Solanum tuberosum* contra fitopatógenos. Se extrajo la proteína de papa de la variedad mejorada súper chola y de variedades nativas como carrizo, yema de huevo, chaucha amarilla y chaucha roja. Se cuantificaron las proteínas mediante el método de Bradford, la proteína se liofilizó y se realizó el ensayo SDS-PAGE para determinar los pesos moleculares de los péptidos de cada variedad. Finalmente se evaluó la inhibición de estos péptidos frente a *Fusarium* spp, y *B. cinérea*. Las variedades con mayor concentración de proteína fueron chaucha roja, amarilla y super chola. Los posibles principales péptidos encontrados en el análisis SDS-PAGE fueron los Inhibidores de proteasa (15-20 kDa), las patatinas (25-37 kDa) y lectinas de Unión a quitina (50 kDa). Además, en las pruebas antagónicas existió hasta un 34% de inhibición de *B. cinerea*, mientras que hasta un 18% en *Fusarium* spp, además se determinó que los productores siembran sus papas dándole valor a el precio y el conocimiento del mercado. Estos datos promueven el cultivo y cuidado de variedades nativas para alimentación y para su uso en otras industrias.

Palabras clave: SDS-PAGE, inhibidores de proteasa, lectinas unidas a quitina, patatinas

ABSTRACT

The potato (*Solanum tuberosum*) is the third most consumed food globally. In Ecuador its cultivation primarily taking place in the provinces of Carchi, Chimborazo, and Tungurahua, it is generating 82,000 jobs. It is estimated that there are 550 native varieties, 17 wild varieties, and 23 improved varieties in the country. One of the main limitations of potato production is the presence of phytopathogens, primarily fungi such as *Fusarium* spp. and *Botrytis cinerea*, which cause significant economic losses. The objective of this research was to evaluate the bioactivity of proteins extracted from *S. tuberosum* against phytopathogens. Proteins were extracted from the improved variety 'super chola' and native varieties 'carrizo', 'yema de huevo', 'chaucha amarilla', and 'chaucha Roja'. Protein quantification was performed using the Bradford method, and the proteins were lyophilized and analyzed by SDS-PAGE to determine the molecular weights of the peptides from each variety. Finally, the inhibition of these peptides against *Fusarium* spp. and *B. cinerea* was evaluated. The varieties with the highest protein concentration were 'chaucha roja', 'chaucha amarilla', and 'super chola'. The main peptides identified by SDS-PAGE analysis were protease inhibitors (15-20 kDa), patatinas (25-37 kDa), and chitin-binding lectins (50 kDa). Additionally, up to 34% inhibition of *B. cinerea* and up to 18% inhibition of *Fusarium* spp. were observed. Furthermore, it was determined that farmers value the price and market knowledge when planting potatoes. These results promote the cultivation and care of native varieties for food and other industrial uses.

Keywords: SDS-PAGE, protease inhibitors, chitin-bound lectins, patatins.

LISTA DE SIGLAS

- BSA.** Albumina sérica bovina
- CIP.** Centro internacional de la papa
- COA.** Código Orgánico Ambiental
- DCA.** Diseño completamente al azar
- DW.** Peso seco
- FAO.** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura
- Ha.** Hectáreas
- ICA.** Instituto Colombiano Agropecuario
- INIAP.** Instituto nacional de investigaciones agropecuarias
- KDa.** Kilodalton
- MAE.** Ministerio del Ambiente del Ecuador.
- MAG.** Ministerio de Agricultura y Ganadería y la Alimentación.
- Msnm.** Metros sobre el nivel del mar
- PDA.** Agar papa dextrosa
- PKPI.** Inhibidores de tipo Kunitz
- PPI.** Inhibidoras de proteasa
- SDS PAGE.** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
- TGS.** Tris-Glycine-SDS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA	3
AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD	4
CONSTANCIAS.....	5
CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR.....	6
APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR.....	7
DEDICATORIA	8
AGRADECIMIENTO.....	9
RESUMEN EJECUTIVO	10
ABSTRACT.....	11
LISTA DE SIGLAS.....	12
ÍNDICE DE CONTENIDOS	xiii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
CAPÍTULO I.....	17
INTRODUCCIÓN	17
1.1 Problema de investigación.	18
1.2 Justificación	19
1.3. Objetivos	21
1.3.1. Objetivo General	21
1.3.2 Objetivos Específicos	21
1.4. Hipótesis o preguntas de investigación.	21
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	22
2.1. Generalidades de <i>S. tuberosum</i>	22
2.1.1. Composición del tubérculo de <i>S. tuberosum</i>	23
2.2. Producción en Ecuador.....	23
2.2.1. El cultivo de papa en la provincia del Carchi.....	24
2.2.2. Variedades de papa cultivadas en Ecuador.....	25
2.3. Principales enfermedades que afectan a la papa	27
2.4. Manejo de enfermedades de <i>S. tuberosum</i>	28
2.5. Péptidos bioactivos de origen vegetal	29
2.5.1. Biopéptidos de <i>S. tuberosum</i>	30

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	34
3. 1. Recolección de muestra y área de estudio	34
3.2. Material biológico	34
3.3 Obtención del almidón	34
3.4. Obtención de proteína soluble.....	35
3.5. Cuantificación de proteína soluble	35
3.7. Electroforesis vertical SDS-PAGE para fracciones proteicas	35
3.7.1 Tinción de geles y visualización de proteínas	37
3.8. Evaluación de la actividad antifúngica.....	37
3.10. Análisis estadísticos.....	38
CAPÍTULO IV.....	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1. Composición del extracto de pulpa de papa.....	40
4.2. Concentración de proteína de diferentes variedades de <i>S. tuberosum</i>	41
4.3. Caracterización de proteína de diferentes variedades de <i>S. tuberosum</i>	44
4.3.1. Efecto de calor durante la ruptura de la proteína	47
4.4. Análisis de la actividad antifúngica de las fracciones proteicas.....	49
4.5. <i>Análisis Biocultural</i>	53
CAPÍTULO V	60
5 . CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	60
5.1. Conclusiones	60
5.2. Recomendaciones	60
Bibliografía.....	62
ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción mundial de <i>S. tuberosum</i>	22
Tabla 2. Zonas de producción en Ecuador	24
Tabla 3. Variedades cultivadas en las distintas zonas del Ecuador	25
Tabla 4. Principales variedades de papa nativas que se cultivan en Ecuador	26
Tabla 5. Composición química de las papas nativas en relación con la variedad mejorada Superchola.....	27
Tabla 6. Principales enfermedades que afectan a <i>S. tuberosum</i>	28
Tabla 7. Inhibidores de proteasa y sus pesos moleculares en kDa	31
Tabla 8. <i>Tratamientos de concentración proteica</i>	38
Tabla 10. Pesos moleculares y posibles péptidos de las variedades sin tratamiento de calor .	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Almidón total presente en cada variedad de papa	40
Figura 2. Concentración de proteína soluble de variedades nativas	42
Figura 3. Gel de electroforesis de yema de huevo, carrizo y súper chola	44
Figura 4. Gel de electroforesis de la variedad chaucha roja y chaucha amarilla	45
Figura 5. Porcentaje de inhibición de diferentes variedades de papa en <i>B. cinérea</i> a las 72h	49
Figura 6. Bioactividad de fracciones proteicas de variedades de papa en <i>B. cynerea</i> ... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 7. Porcentaje de inhibición de diferentes variedades de papa en <i>Fusarium sp.</i> a las 72h	51
Figura 8. Bioactividad de fracciones proteicas de variedades de papa en <i>Fusariun spp.</i>	52
Figura 9. Número de hectáreas de terreno empleadas para cultivo de <i>S. tuberosum</i> por los agricultores entrevistados. De 1 a 6 hectáreas de cultivo.	53
Figura 10. Variedades de <i>S. tuberosum</i> cultivadas por los agricultores	54
Figura 11. Métodos de labranza empleados por agricultores	56
Figura 12. Aspectos durante la elección de variedades de cultivo	57
Figura 13. Aspectos durante la elección de cultivo para consumo propio	57
Figura 14. Personas de quienes los agricultores aprendieron a cultivar papa	58
Figura 15. Lugares de donde los agricultores obtienen la semilla	59

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum*) es el tercer alimento de mayor consumo a nivel mundial según la FAO, se cultiva en más de 100 países en una superficie de 20 millones de hectáreas (Singh & Kaur, 2009), en el 2017 la producción mundial de papa superó los 388 millones de toneladas (Reyniers et al., 2020). En Ecuador en el año 2021 la producción nacional fue de 244 749 toneladas de papa en una superficie de 19.088 hectáreas en la región sierra, principalmente en las provincias de Carchi, Chimborazo y Tungurahua. El cultivo de *S. tuberosum* constituye una fuente importante de alimentación e ingresos para los 82 mil productores, se estima que existen más de 550 especies nativas, 17 silvestres y 23 variedades mejoradas que están conservadas por el INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias) para su programa de mejoramiento (Cuesta et al., 2022). Una de las limitaciones de la producción de papa son los problemas fitosanitarios como las enfermedades y plagas que afectan al tubérculo provocando pérdidas parciales o totales, entre las que se encuentran el pie negro causado por la bacteria *Erwinia carotovora*, la Rizoctoniasis (*Rhizoctonia solani*) y la pudrición seca (*Fusarium*) (Villa-Martínez et al., 2014). La pudrición seca es causada por varias especies de *Fusarium* entre ellas *F. solani*, *F. culmorum* y *F. avenaceum*, esta enfermedad amenaza la productividad de papa (Castro & Contreras, 2011). Para combatir estas enfermedades se emplean fungicidas como el Fludioxonil y Azoxistrobina, entre otros (Syngenta, 2022), siendo compuestos tóxicos (Ramírez et al., 2014), tanto para los productores como consumidores debido a sus residuos (Benítez et al., 2015), por lo que es importante encontrar alternativas sostenibles, entre ellas la proteína residual de papa.

Las proteínas de papa son conocidas por sus propiedades nutricionales, espumantes, formadoras de gel, antioxidantes y nutricionalmente ricas para la industria alimenticia, además poseen actividades antimicóticas, antimicrobianas y antivirales, también representan una alternativa para la protección de la planta, las proteínas son clasificadas dependiendo de su peso molecular en patatinas, inhibidores de proteasa y otras proteínas como las defensinas. (Bártová et al., 2019).

1.1 Problema de investigación.

En Ecuador la producción de *S. tuberosum* ocupa una superficie anual de 25 mil hectáreas en la región sierra, principalmente en las provincias de Carchi, Chimborazo y Tungurahua. (MAG, 2021). El costo de producción del tubérculo en el país es de \$17 el quintal, sin embargo el precio en el mercado fluctúa de \$10 a \$35 el quintal, los factores que influyen esta variación son las enfermedades, el contrabando, el cambio climático y la sobreproducción (El Universo, 2024) por ello se requiere mejorar el rendimiento y el manejo sanitario del cultivo, para abastecer las necesidades requeridas frente a la demanda para que el desarrollo sostenible de la provincia sea el adecuado (MAG, 2020). La producción de este tubérculo demanda recursos como suelo, agua, fertilizantes, manejo de plagas y enfermedades (Caro Castro et al., 2019), el mal manejo de las normativas durante su producción implica la degradación de suelos, pérdida de materia orgánica, nutrientes y erosión (Oesterheld, 2008).

Los mecanismos utilizados para el control de enfermedades en este cultivo suelen ser de naturaleza química (fungicidas) lo que involucra un impacto directo al medio ambiente, un riesgo hacia la salud de los productores y consumidores (Trujillo & Perera, 2019). Los productores de papa en el Ecuador se han enfocado principalmente en la producción de

una manera acelerada, esto conlleva a la utilización de métodos tradicionales o de fácil acceso sin tomar en cuenta las nuevas tecnologías eco amigables que puedan enfocarse a una economía sostenible (Gargoloff et al., 2011). Existen varias técnicas y metodologías que pueden contribuir a la sostenibilidad del cultivo de papa, estos parámetros utilizan los mismos sistemas de defensa que tiene la planta frente a patógenos, sin embargo, al tratarse de procesos no tradicionales, no son conocidos por parte de los productores (López, 2002).

1.2 Justificación

El cultivo y comercialización de *S. tuberosum* en el Ecuador y Latinoamérica genera una cadena de valor agroalimentaria influenciada por todos los recursos que se necesitan para su producción y representa una fuente de ingresos económicos para las comunidades que se apoyan de este producto (Avalos, 2022). El cultivo de papa tiene variedades que no han sido investigadas para otros propósitos que no estén relacionados con la agricultura y alimentación, la utilización de variedades nativas permite la conservación de la genética local y aporta con un nuevo enfoque más sostenible (Cisne & Laguna, 2004).

Las plantas tienen mecanismos de defensa que se encargan de atacar patógenos que pueden causar enfermedades al cultivo, los péptidos que producen las plantas son los que facilitan estos procesos, este mecanismo se basa en fases de preingreso y postingreso del patógeno al organismo vegetal (A. Muñoz, 2008). Además presentan resistencia inespecífica y específica, esta última utiliza factores o mecanismos bioquímicos que pueden dar respuesta directa a la infección e involucra células especializadas que van a producir péptidos antifúngicos o antibacterianos para atacar el patógeno, esto conlleva especificidad al momento de enfrentar enfermedades en cultivos vegetales, y es una

alternativa relevante, que puede sustituir los métodos tradicionales de control de plagas en cosechas, que afectan en forma negativa los ecosistemas (Islas et al., 2005).

Los péptidos que genera la planta se encargan de las infecciones o agresiones que recibe el organismo vegetal, los mismos que son codificados por genes que se especializan en atacar bacterias gram positivas, gram negativas y hongos, cumplen papeles importantes cuando existe la presencia de patógenos en la planta y se organizan dependiendo de sus características estructurales, estas propiedades o mecanismos de acción se relacionan con la lisis de la membrana o penetración del péptido y consecutivamente su ataque a objetivos intracelulares, su capacidad anfipática permite interactuar con la naturaleza de la membrana de los microorganismos patógenos para lograr que este no afecte al organismo vegetal (Oosterheld, 2008)

La investigación planteada pretende presentar una alternativa sostenible para el manejo agrícola del cultivo de papa con el objeto de disminuir el impacto ambiental negativo que se genera con el uso de agroquímicos, utilizando los propios mecanismos de defensa que provee la planta, como los péptidos antimicrobianos y antifúngicos que se crean en ella. Estos compuestos pueden ser extraídos y utilizados para contrarrestar los efectos producidos por fitopatógenos específicos causantes de enfermedades en el cultivo de papa generando un sistema de protección para el cultivo agrícola y reduciendo el consumo de productos químicos. frente a patógenos como una alternativa favorable, reduciendo el consumo de productos químicos perjudiciales (Oosterheld, 2008)

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar la bioactividad de proteínas provenientes de papa *Solanum tuberosum* contra fitopatógenos.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Extraer péptidos procedentes de proteínas de papa mediante tratamiento fisicoquímico.
- Caracterizar de forma molecular los péptidos extraídos de papa.
- Analizar la bioactividad de los péptidos de proteína de papa contra fitopatógenos.

1.4. Hipótesis o preguntas de investigación.

¿Los biopéptidos obtenidos de las proteínas residuales de papa, pueden ser utilizados como biocontroladores frente a fitopatógenos?

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de *S. tuberosum*

S. tuberosum es una planta dicotiledónea, herbácea anual, pertenece a la familia de las solanáceas (Rodríguez-Pérez, 2011), se produce en latitudes entre los 47°S y los 65°N, crece por encima de los 1 000 m.s.n.m en regiones altas tropicales de los Andes, África, Indonesia. Las variedades comerciales se cultivan entre los 2 500 y 3 000 msnm, en la Tabla 1, se resume la producción mundial de papa por continentes (Rodríguez-Pérez, 2011).

Tabla 1.

Producción mundial de S. tuberosum

Continente	Área cosechada (ha)	Producción (t)
África	1 541 498	1 705 500
Asia	8 751 259	143 259 252
Oceanía	44 402	1 671 602
Europa	6 275 549	123 817 694
América	1 549 532	40 644 974
Mundo	16 620 742	309 393 522

Fuente: Rodríguez-Pérez (2011).

La diversidad genética de *S. tuberosum* cultivada y silvestre se encuentra localizada en los Andes de América del Sur. Existen variedades mejoradas o modernas que son obtenidas mediante procesos de mejoramiento genético y selección por parte de los agricultores que pueden diferenciarse entre ellas, principalmente por el potencial de rendimiento de resistencia a enfermedades (UCE, 2021).

La producción de papa está directamente relacionada con su consumo, 1.4 mil millones de personas consumen este alimento y se produce mundialmente alrededor de 300 millones de toneladas métricas anuales, existen aproximadamente 4 000 variedades nativas, principalmente localizadas en la región andina, aunque no todas son consumidas debido a su sabor y sus características, pueden ser muy importantes desde el punto de vista de resistencia natural a plagas, enfermedades y condiciones climáticas (CIP, 2015).

2.1.1. Composición del tubérculo de *S. tuberosum*

Los componentes presentes en la papa son importantes por sus beneficios en la salud y son deseables en la dieta humana. De acuerdo con su composición se estima que entre un 65% a 80% de todo el producto es almidón. En cuanto al peso seco del tubérculo se ha determinado que es una fuente muy importante de proteínas, hierro, riboflavina y ácido ascórbico (FAO, 1998).

2.2. Producción en Ecuador

En Ecuador *S. tuberosum* se cultiva entre los 2 800 hasta los 3 500 msnm, el cultivo de *S. tuberosum* constituye una fuente ingreso y alimentación para la sierra ecuatoriana, donde 88 130 productores se dedican al cultivo, además que 250 000 personas están vinculadas con este rubro generando ingresos de 70 millones de dólares (Cuesta et al., 2022). El 90% de la papa se consume en estado fresco y el 10% se destina a la industria como papas enlatadas, prefritas, chips, entre otros (Untuña et al., 2011)

En el país se identifican tres regiones dedicadas al cultivo: Carchi e Imbabura en la zona norte, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo y Bolívar en el centro; Cañar, Azuay y Loja al sur (Araujo et al., 2020). Carchi, Chimborazo y Tungurahua representan el 66.33% de superficie de cosecha (Cuesta et al., 2022), en la provincia del Carchi este tubérculo representa el 41.27% de cosecha, en el año 2021 la producción alcanzó las

101.007 (t) y un rendimiento de 25.12 (t/ha). En la Tabla 2 se resume las características de cada zona de producción.

Tabla 2.

Zonas de producción en Ecuador

Zona	Provincias	Altitud (msnm)	Superficie (ha)	Producción (t)	Riesgos
Norte	Carchi	2800-3200	7 323	217 522	Heladas
	Imbabura				
	Pichincha				
	Cotopaxi				
Centro	Tungurahua	2600-3600	133 079	258 254	Granizadas Sequía
	Chimborazo				
	Bolívar				
Sur	Azuay	2700-3400	1 703	41 878	Sequía
	Cañar				
	Loja				

Fuente: Araujo et al.(2020)

2.2.1. El cultivo de papa en la provincia del Carchi

Existen 70 variedades de papa que se cosechan en el Ecuador enfocadas principalmente a su uso comercial y se toman en cuenta por sus características físicas como forma y color además de su sabor, en la provincia del Carchi se cultivan 15 de ellas, que posteriormente son distribuidas a nivel nacional (Monteros, Yumisaca, et al., 2010). Existen centros de reproducción de semillas, gracias a su uso, los agricultores pueden mejorar su rendimiento de producción y generar ingresos adicionales. Estos programas manejados por instituciones gubernamentales apoyan el crecimiento potencial de rendimiento, sin embargo, no existen planes de manejo específico para reducir el índice

de contaminantes que el productor puede aplicar al alimento con el fin de reducir las enfermedades y plagas (MAG, 2018).

2.2.2. Variedades de papa cultivadas en Ecuador

Ecuador es un centro de diversidad de papa en el mundo, según el INIAP se estima que existe 550 variedades nativas, 17 especies silvestres y 23 mejoradas que presentan resistencia a enfermedades y mejores rendimientos (Tabla 3) (Cuesta et al., 2022).

Tabla 3.

Variedades cultivadas en las distintas zonas del Ecuador

Zona	Variedades	Características
Norte	INIAP-Gabriela, ICA Capiro, INIAP-Esperanza, Superchola, Yema de huevo, Carrizo	Piel clara, carne crema, alto contenido de materia seca
Centro	INIAP-Santa Catalina, INIAP-Esperanza, Superchola, Uvilla, Yema de huevo, Leona	Piel rosada, carne amarilla, alto contenido de materia seca
Sur	INIAP-Santa Catalina, Ana, Uvilla, Bolona, INIAP Gabriela	Peil clara, forma esférica, carne amarillo-crema, alto contenido en materia seca

Fuente: Torres et al. (2011)

Los tubérculos nativos son variedades domesticadas, seleccionadas y conservadas como herencia ancestral (Monteros et al., 2005). Estas papas son altamente valoradas por sus propiedades como olor, textura, identidad cultural. Además, presentan diversidad de formas y tamaños, presentan colores de piel amarilla, roja, rosada o morada y diseños vistosos (Monteros et al., 2005). A diferencia de las mejoradas, las papas nativas

presentan mayor contenido sólido, lo que las hace más nutritivas y con propiedades organolépticas de interés, tienen además carotenoides, flavonoides y antocianinas. La tabla 4 presenta ejemplos de tubérculos nativos cultivados en Ecuador.

Tabla 4.

Principales variedades de papa nativas que se cultivan en Ecuador

Nombre	Destino de producción	Rendimiento (kg por planta)	Rango de adaptación (m.s.n.m.)
Coneja	Autoconsumo	1.4	3 200-3 500
Chaucha roja	Autoconsumo, Mercado	1.2	3 000-3 200
Chaucha amarilla	Mercado	1.2	3 000-3 300
Yema de huevo	Autoconsumo, mercado	1.4	2 600-3 300
Carrizo	Mercado	1.2	3 000-3 600
Leona del Carchi	Autoconsumo	1.0	3 000-3 500
Mampuera	Autoconsumo, mercado	1.2	3 000-3 400
Osito	Autoconsumo	0.7	2 600-3 500
Papa botella	Autoconsumo	0.9	2 600-3 300
Rosada	Autoconsumo, mercado	1.1	2 800-3 500
Uva	Mercado	1.2	2 800-3 500
Violeta	Autoconsumo	0.8	2 600-3 900

Fuente: Cuesta et al., 2022

Estas pueden ser caracterizadas o reintroducidas a sus lugares de origen e incluso utilizarlas para mejoramiento genético y desarrollar nuevas variedades, sin embargo, las variedades mejoradas van en aumento desplazando especies nativas, esto provoca la extinción de ciertas especies, sin conservar su valor genético (Monteros J. et al., 2010), únicamente 20 variedades nativas tienen presencia comercial en la sierra ecuatoriana (Monteros et al., 2005). Las papas nativas además aportan proteína, fibra y antioxidantes en relación con las mejoradas (Monteros, Reinoso, et al., 2010) como se observa en la Tabla 5.

Tabla 5.

Composición química de las papas nativas en relación con la variedad mejorada Superchola

Nutriente	Máximo Papa nativa	Mínimo Papa nativa	Superchola
Proteína (g)	10.6	5.6	8.5
Fibra (g)	6.1	1.9	2.5
Almidón (g)	87.5	79.1	84.5
Potasio (mg)	2103	1346.7	4.2
Zinc (mg)	5	0.8	0.8

Fuente: Monteros, Reinoso, et al., 2010

2.3. Principales enfermedades que afectan a la papa

S. tuberosum es susceptible a enfermedades tanto la planta como al tubérculo. Pueden contenerse en la semilla o presentarse en el suelo, se ha identificado 50 especies de hongos, 10 especies bacterianas y 30 víricas que causan pérdidas económicas en los cultivos de papa (Bártová et al., 2019). La tabla 6 resume los principales agentes patógenos que atacan a estos cultivos (Pumisacho & Sherwood, 2002)

Tabla 6.*Principales enfermedades que afectan a S. tuberosum*

Enfermedad	Patógeno		Características
Lancha	Hongo	<i>Phytophthora infestans</i>	Alto riesgo Presenta resistencia 2800-3400msnm 12-18°C Manchas pálidas
Tizón temprano	Hongo	<i>Alternaria solani</i>	Cualquier estadio de desarrollo Manchas necrótidas en forma de anillos
Mildu polvoso	Hongo	<i>Erysiphe chichoracearum</i>	Alta humedad Cultivos con déficit Masas blancas de micelio y esporas en las hojas
Pudrición seca	Hongo	<i>Fusarium solani</i>	Ubicado en suelos Por lesiones Zonas oscuras en el centro de la lesión
Pierna negra	Bacteria	<i>Erwinia spp</i>	Presente en suelo, o semilla, pudrición en la base del tallo
Sarna común	Bacteria	<i>Streptomyces spp</i>	Presente en suelo y tubérculo pH 6.5-8
Amarillamiento de las venas de la papa	Virus	Crinivirus	Lesiones angulosas Las venas de las hojas se tornan amarillo

Fuente: Pumisacho & Sherwood, 2002

2.4. Manejo de enfermedades de *S. tuberosum*

El aumento de la población humana, la intensificación del cultivo, así como epidemias regulares causadas por patógenos demandan la aplicación constante de fungicidas, dando como resultado que el cultivo de papa a nivel fitosanitario sea controversial, debido a la

sobreutilización de agroquímicos teniendo efectos negativos para el medio ambiente y salud humana (Pumisacho & Sherwood, 2002).

Estudios han determinado que Carchi es una de las provincias con mayor uso de plaguicidas, representando hasta un 32% de sus costos de producción, el 80% de los fungicidas son de la familia de los dithiocarbamatos, que tienen efectos dermatológicos y mutagénicos, además se ha visto que el uso y manejo de estos plaguicidas en esta provincia son deficientes, esto ha provocado daños en la salud, envenenamiento (171 personas al año), desordenes de pigmentación y efecto neuro psicológicos en más del 60% de la población rural. El impacto ambiental es difícil de cuantificar, debido a que estos compuestos pueden afectar la cadena trófica provocando que los depredadores naturales de los parásitos mueran, frente a esta situación es importante regular el uso de plaguicidas (Pumisacho & Sherwood, 2002), así como encontrar bioproductos que sean sostenibles en el ambiente y no afecten a la salud. Un ejemplo de ello es el control biológico, mediante el uso de microorganismo o compuestos bioactivos como los péptidos con actividades antimicrobianas y antifúngicas (Altemimi et al., 2017; Bártová et al., 2019).

2.5. Péptidos bioactivos de origen vegetal

Se ha definido a los péptidos bioactivos como secuencias cortas de aminoácidos que son derivados de proteínas que poseen propiedades potencialmente benéficas más allá de la nutrición; mantienen componentes como antioxidantes, vitaminas, proteínas y otros nutrientes esenciales, y presentan diferentes actividades biológicas como: antioxidante, antihipertensivos, antimicrobianos, anticancerígenos, etc (Martínez, 2009).

Las plantas tienen mecanismos de defensa propios contra organismos patógenos, estos sistemas incluyen a los biopéptidos que llegan a expresarse consecutivamente como parte de una primera línea de defensa en la entrada del patógeno al organismo vegetal, si el patógeno ya ingresó se crea un procedimiento de producción de estos péptidos para combatir con patrones moleculares para una respuesta inmediata de defensa. Los análisis microscópicos revelan que algunos biopéptidos pueden atacar al hongo cuando está en el proceso de alargamiento de las hifas y así interrumpir la germinación de esporas creando una alteración en la superficie de la célula fúngica (Mandal et al., 2013). En el estudio realizado por Muñoz et al., (2014) menciona que los biopéptidos pueden llegar a producir la desestabilización de las membranas debido a la interacción directa con los fosfolípidos, estos eventos conducirían a la permeabilidad de un microorganismo específico.

2.5.1. Biopéptidos de *S. tuberosum*

Las proteínas de la papa son el segundo componente más abundante después de los carbohidratos (2% del total en peso seco), se encuentran en el córtex y la medula. Según su solubilidad se clasifican en solubles e insolubles. Las proteínas globulares constituyen el 75-85% de todas las fracciones de proteínas solubles, el 25% del resto de proteínas son insolubles y forman parte de las paredes celulares de la papa. La mayoría de las proteínas solubles son fracciones de albúmina (49%) y globulina (26%), solubles en agua y soluciones salinas respectivamente, también destacan las prolaminas (4.3%) y glutelinas (8.3%) (Bártová et al., 2019; Pełksa & Miedzianka, 2021).

Según su peso molecular las proteínas de la papa se clasifican en tres grupos: los inhibidores de proteasas, patatina, proteínas y péptidos de baja masa molecular (defensinas, tioninas y snakinas) (Bártová et al., 2019). La patatina, inhibidores de

proteasas y proteínas de alto peso molecular representan el 40% de las proteínas de la papa y contienen aminoácidos importantes como la lisina, metionina y cisteína (Grommers & Van Der Krogt, 2009). Estas proteínas poseen efectos antimicrobianos y antifúngicos, que podrían emplearse en la alimentación, agricultura por sus propiedades nutritivas, espumantes, emulsionantes y formadoras de gel (Waglay et al., 2014; Waglay & Karboune, 2016).

Los Inhibidores de proteasa protegen a la planta contra enfermedades, plagas y herbívoros, debido a que actúan en la defensa inducida por herida causada por herbívoros o microorganismos, estos suprimen la proteínasa característica durante el ataque fúngico, los más comunes pertenecen a los inhibidores de tipo Kunitz (PKPI) y las inhibidoras de proteasa I y II (PPI-I y PPI-II). La Tabla 7 resumen las proteínas y sus pesos moleculares (Bártová et al., 2019).

Tabla 7.

Inhibidores de proteasa y sus pesos moleculares en kDa

Inhibidor de proteasa	Masa molécula kDa
PPI-I	7.68-7.87
PPI-II	20.02-20.68
PKPI	20.19-20.244

Fuente: Bártová et al., 2019

Las snakinas son un grupo de proteínas antimicrobianas asociadas a la pared celular, participan en la división celular, alargamiento y crecimiento celular, son muy ricas en cisteína. Las patatinas son un grupo uniforme de glicoproteínas con un peso molecular de 39 a 43 kDa, tiene actividad acil hidrolasa, fosfolipasa, acil transferasa (Bártová et al., 2019). Una de las propiedades de mayor interés de los péptidos, es la antifúngica contra patógenos, por ejemplo estudios demuestran que la patatina de *S. tuberosum* inhibió la

germinación de esporas de *P. infestans* resistente, mientras que los inhibidores de proteasa redujeron el crecimiento de *Rhizoctonia solani* y *B. cinérea*, así mismo los miembros de la familia Kunitz inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* (Bártova et al., 2019). Además, se ha visto que la fracción proteica tiene un efecto contra *Fusarium* sp., un cambio de coloración del patógeno como respuesta a la toxicidad ejercida (Guapas, 2020).

2.6. Legislación del Ecuador referente a saberes ancestrales y uso de pesticidas.

En el Ecuador la Ley de Comercialización y empleo de plaguicidas, Codificación 11, Registro Oficial Suplemento 315 regula la formulación, fabricación, comercialización y uso de plaguicidas. En el artículo 22 se menciona que el Ministerio de Agricultura y Ganadería recomienda el uso de plaguicidas cuando no existen enemigos naturales de las plagas a controlar y recomienda que sean productos biodegradables. Además, se señala en el artículo 23 que se prohíben las aplicaciones aéreas de plaguicidas tóxicos o peligrosos para la salud, aun cuando la concentración sea baja.

Dentro de la Constitución del Ecuador se señala el *Buen Vivir* que implica el respeto por el medio ambiente y las creencias ancestrales. Los saberes ancestrales son conocimientos que poseen los pueblos y nacionalidades, se transmiten de generación en generación por tradición oral y se han desarrollado en el tiempo. Los pueblos originarios andinos lograron la autosuficiencia alimentaria a través de producir cultivos sin afectar el entorno mediante aplicación de técnicas agrícolas como la construcción de terrazas, selección de semillas y plantas nativas. Una de las practicas era sembrar plantas como la menta o albahaca cerca de los cultivos para alejar plagas o atraer insectos beneficiosos (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2023). El MAG promueve el intercambio de semillas y saberes ancestrales mediante ferias de semillas nativas, además en estos espacios se

compartes conocimientos sobre técnicas agrícolas transmitidas de generación en generación (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2024)

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se detallan las metodologías y materiales empleados para la extracción, cuantificación, electroforesis vertical y pruebas biológicas de los biopéptidos de papa.

3.1. Recolección de muestra y área de estudio

El lugar donde se obtuvieron las muestras para la investigación y se realizó la encuesta biocultural fue la comunidad San Juan, parroquia Cristóbal Colón, cantón Montúfar, provincia del Carchi, con una latitud de 0°37'51.6" N longitud de 77°48'51.5" O. La fase experimental se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal ubicado en el campus San Vicente de Paul de la Universidad Técnica del Norte en la ciudad de Ibarra, Imbabura.

3.2. Material biológico

La selección de las variedades se realizó por facilidad de obtención. Se seleccionaron variedades de papa *S. tuberosum* de las siguientes variedades nativas: yema de huevo, carrizo, chaucha roja y chaucha amarilla y una comercial, súper chola. Se emplearon tubérculos con un peso aproximado de 50g cada tubérculo y se almacenaron en fundas herméticas, se preservaron a 4 °C hasta su llegada al laboratorio.

Los hongos *Fusarium* sp. y *Botrytis cinérea* empleados para las pruebas de bioactividad de los biopéptidos de papa, se obtuvieron del cepario de microorganismos del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Universidad Técnica del Norte.

3.3 Obtención del almidón

Para la obtención del almidón se lavaron los tubérculos con agua potable con la finalidad de retirar todas las impurezas superficiales, las muestras se secaron y se pesó cada tubérculo tomando 100 g de muestra. Con un bisturí se retiró la cáscara de cada tubérculo y se pesó. Se cortó la papa en cuadrados y se redujo su tamaño con un rallador comercial

de 3 mm, se agregó 100 ml de agua destilada y se removió con una varilla de vidrio durante 5 minutos de forma constante. Se filtró la mezcla con un tamiz 0.5 mm de diámetro de poro. El filtrado se recogió en tubos falcon de 50 ml, previamente pesados. Se centrifugó los tubos a 3 600 xg durante 20 minutos a temperatura ambiente en la centrífuga Thermo scientific (Solvall ST16R). El sobrenadante se tomó con cuidado y se llevó a un vaso de precipitación de 250 ml. Se midió el pH del sobrenadante. El pellet y la pulpa se secaron durante 4 días en la estufa (Quincy Lab, Model 30) a 90 °C, se pesó el pellet y el almidón obtenido en una balanza analítica (Guapas, 2020).

3.4. Obtención de proteína soluble.

El sobrenadante obtenido previamente, se ajustó el pH a 4 con H₂SO₄ 0.5 M se distribuyó en tubos falcon de 50 ml y se llevó a Baño María durante 10 minutos a una temperatura de 80 °C. Se dejó enfriar la muestra durante 20 minutos y se centrifugaron los tubos a 1 600 xg por 15 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se guardaron a 4 °C para posteriores análisis.

3.5. Cuantificación de proteína soluble

La cuantificación se realizó con el método de Bradford. Se empleó Albúmina Sérica Bovina (BSA) para la curva de calibración estándar. Se empleó tampón fosfato 25 mM pH 7 para las diluciones. Se tomó 100 µl de muestra de proteína soluble y se añadió 1000 µl de reactivo Bradford, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se evaluó en el espectrofotómetro (Jenway 6705 UV/Vis) con absorbancia de 595 nm, el blanco fue tampón fosfato (Guapas, 2020). La proteína soluble se liofilizó en la Escuela Politécnica Nacional.

3.7. Electroforesis vertical SDS-PAGE para fracciones proteicas

Para identificar el peso de las proteínas se empleó el equipo Mini-PROTEAN Tetra Cell de BIO-RAD, un sistema de electroforesis vertical que emplea geles de poliacrilamida,

para esta investigación se emplearon geles tipo precast y se siguieron las instrucciones de la casa comercial. Para preparar la muestra se tomó 5 μ l de proteína soluble y 5 μ l del Buffer de muestra Laemmli 2x (catalog #161-0737), el volumen final fue de 10 μ L.

Para obtener el Buffer de carga Laemmli SDS-PAGE 1x, se preparó 250 ml de Buffer TGS 10x, para ello se tomó 36.03 g de glicina, 7.57 g de Tris Base y 2.5 g de SDS, se disolvió y se ajustó el pH a 8.4, se tomó 100 ml del Buffer TGS 10x y se aforó a 1 000 ml, se ajustó el pH a 8.3 y se obtuvo el Buffer de carga Laemmli SDS-PAGE 1x (Laemmli, 1970). Se colocó el gel dentro de la cámara y se añadió el Buffer de carga (1L), se colocó las muestras, el estándar, BSA como control positivo en los pocillos, se emplearon los estándares Precisión Plus Protein Dual Colors (BIO-RAD Cat#161-0374) se corrió la muestra durante 40 minutos a temperatura de 25 °C a 200 V (inicial 25-50 mA y final 20-31 mA).

El análisis se llevó a cabo comparando las muestras con un estándar de proteína (ST) y BSA, lo que permitió identificar la presencia de estas proteínas en las variedades de papa siguientes: Chaucha amarilla (ChA), Chaucha roja (CHR), Yema de huevo (YH), Carrizo (C) y Súper chola (SC) la concentración de las muestras fue de 1mg DW/ml. Se evaluó la corrida del gen sin aplicación de calor y con la aplicación de calor, para ello, se tomaron las muestras y se llevaron al termobloque a 100°C durante 5 minutos. Los valores de peso molecular de las proteínas del estándar se encontraban desde 10 a 250 kDa. Debido a que, durante la corrida del gel, el estándar de proteína contaminó los pocillos donde se encontraban ChA y ChR, se realizó una segunda corrida, la muestra tuvo una concentración de 2mg DW/ml esto se puede observar en el apartado resultados.

3.7.1 Tinción de geles y visualización de proteínas

Se retiró el gel de la cámara, se lavó con agua destilada y se sumergió en 50 ml de Comassie Brilliant blue R-250 (BIO-RAD Cat. #1610436), se agitó suavemente y se dejó durante 24 horas en temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo se retiró el exceso de tinte, se lavó con 50 ml de solución decolorante (compuesta por metanol, agua y ácido acético en proporción 4:5:1) durante 24 horas, pasado el tiempo se descartó la solución decolorante, nuevamente se añadieron 50 ml de solución decolorante durante 24 horas para evitar la deshidratación del gel (Garfin, 1990; Laemmli, 1970). La visualización del gel se realizó bajo luz natural.

3.8. Evaluación de la actividad antifúngica

Para la evaluación de la actividad antifúngica se realizó una identificación de las cepas *Fusarium* sp. y *Botrytis cinérea* mediante morfología y tinción con azul de lactofenol. A los extractos liofilizados se les realizó una hidratación y se obtuvo una concentración de 1 mg.ml⁻¹ de cada una de las variedades. Se empleó medio PDA con 2 ml de muestra de extracto proteico para cada uno de los tratamientos. Se colocó 20 ml de medio de cultivo en cajas Petri, se realizaron cuatro repeticiones por variedad. Para el control positivo se empleó fungicida (Siganex) y para el control negativo 2 ml de agua. Se dividieron las cajas con medio de cultivo en 4 cuadrantes, se inoculó el hongo en la coordenada 00 con capilar, se realizó un raspado a las hifas y se colocó la muestra en el medio de cultivo. Se incubaron las cajas a 26 °C y se midió el crecimiento radial durante 3 días en intervalos de 24 horas (Guapas, 2020).

3.9. Encuestas a agricultores

Se realizó una encuesta a 11 productores de papa pertenecientes a asociaciones de agricultores, representantes de entidades gubernamentales y agricultores informales del cantón Espejo, provincia del Carchi, para determinar si conocen variedades nativas de

papa, así como el conocimiento biocultural de los mismos, el uso de pesticidas y la siembra para consumo propio, así como las características que son de relevancia al momento de escoger una variedad. El banco de preguntas fue validado por el asesor y se presenta en el capítulo de resultados.

3.10. Análisis estadísticos

Para establecer diferencias significativas en la concentración de proteínas se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA) ajustado a un Diseño completamente al azar (DCA). Los tratamientos se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8.

Tratamientos de concentración proteica

Variedad	Tratamiento
Yema de huevo	Yh
Carrizo	Ca
Chaucha Amarilla	Ch A
Chaucha roja	Ch R
Super chola	SC

Para el análisis de actividad antifúngica de *B. cinerea* se aplicó un ANOVA ajustado a un diseño de bloques completos al azar (DBCA), mientras que la actividad antifúngica de *Fusarium* sp., se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, los tratamientos se observan en la Tabla 9. Todos los ensayos se realizaron al 95% de nivel de confianza, el supuesto de normalidad se evaluó por la prueba de Shapiro-Wilks y el de homogeneidad por la prueba de Levene, para determinar los mejores tratamientos se aplicó Tukey (95%), el programa empleado fue InfoStat L 2020.

Tabla 9.

Tratamientos del análisis de actividad antifúngica

Variedad	Especie de hongo	Tratamiento
Yema de huevo	<i>Fusarium</i> sp.	Yh.F
Carrizo	<i>Fusarium</i> sp	Ca.F
Chaucha Amarilla	<i>Fusarium</i> sp	Ch A.F
Chaucha roja	<i>Fusarium</i> sp	Ch R.F
Super chola	<i>Fusarium</i> sp	SC.F
Control positivo	<i>Fusarium</i> sp	CP.F
Control negativo	<i>Fusarium</i> sp	CN.F
Yema de huevo	<i>B. cinerea</i>	Yh.B
Carrizo	<i>B. cinerea</i>	Ca.F
Chaucha Amarilla	<i>B. cinerea</i>	Ch.A.B
Chaucha roja	<i>B. cinerea</i>	Ch.R.B
Super chola	<i>B. cinerea</i>	SC.B
Control positivo	<i>B. cinerea</i>	CP.B
Control negativo	<i>B. cinerea</i>	CN.F

Para el análisis de la encuesta se realizó un análisis descriptivo.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

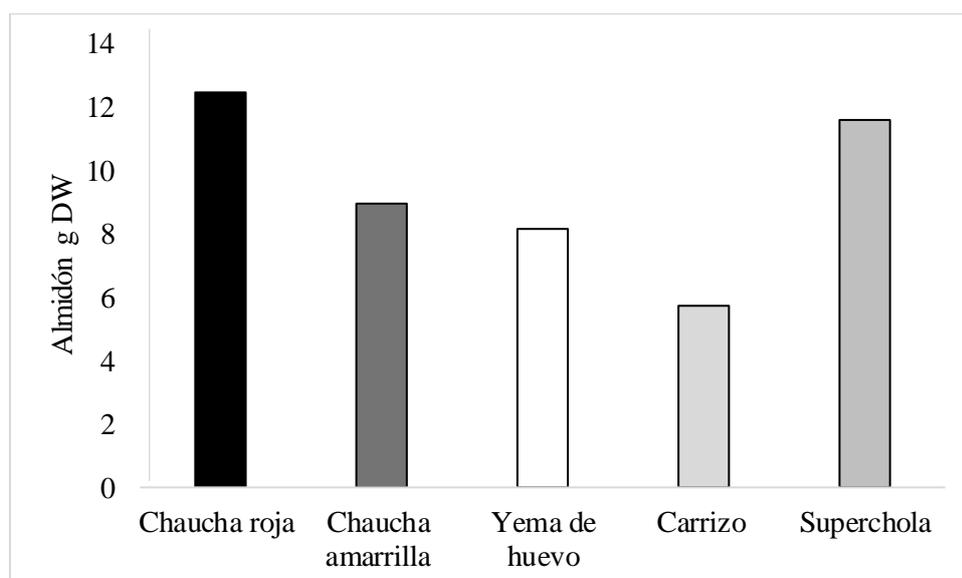
En este capítulo se presentan los resultados de la investigación, el paso seco del almidón, la concentración de proteína de las diferentes variedades de papa, la electroforesis de proteínas SDS-Page y la actividad antifúngica.

4.1. Composición del extracto de pulpa de papa

La Figura 1 indica la cantidad de almidón total de cada variedad de papa, se observa que chaucha roja presentó 12.44 g DW de almidón, súper chola 11.58 g DW, chaucha amarilla 8.94 g DW, yema de huevo 8.15 g DW y carrizo 5.72 g DW. En el estudio de Guapas (2020), se obtuvo un contenido de 13.84 g DW de almidón en súper chola similar a lo obtenido en este estudio. En otras investigaciones con papas nativas se encontró que presentaban un peso seco de 11-26 g DW de almidón, similares a los encontrados en la investigación actual (Cárdenas et al., 2020).

Figura 1.

Almidón total presente en cada variedad de papa



En esta investigación el rendimiento de almidón fue de chaucha roja (60%), chaucha amarilla (44%), yema de huevo (38%), carrizo (28%) y súper chola (44%), estos valores son menores a los rendimientos de almidón obtenidos previamente de variedades nativas: yema de huevo (86.2%), chaucha roja (79%), carrizo (80.8%) chaucha amarilla, (85.5%) y super chola (73-84.5%) (Monteros, Yumisaca, et al., 2010; Orbea, 2020; Villacrés et al., 2009), estas diferencias pueden deberse al método de cuantificación ya que Villacrés et al. (2009) obtuvo los carbohidratos totales con un método indirecto de carbohidratos solubles conocido como Extracto Libre de Nitrógeno, donde se cuantifica a los azúcares libres y el almidón (Tacón, 1989). En el caso de la centrifugación de este estudio se puede perder almidón durante el centrifugado por lo que los datos obtenidos pueden ser 10% menores a los reales (Melian, 2010).

El contenido de almidón varía dependiendo de la variedad de papa, hay estudios donde variedades comerciales presentan un contenido de almidón mayor al de variedades nativas (Guapas, 2020; Melian, 2010), mientras otros no presentan diferencias entre variedades nativas y comerciales (Monteros, Yumisaca, et al., 2010; Villacrés et al., 2009) como es el caso de este estudio donde super chola y chaucha amarilla presentaron el mismo rendimiento de almidón.

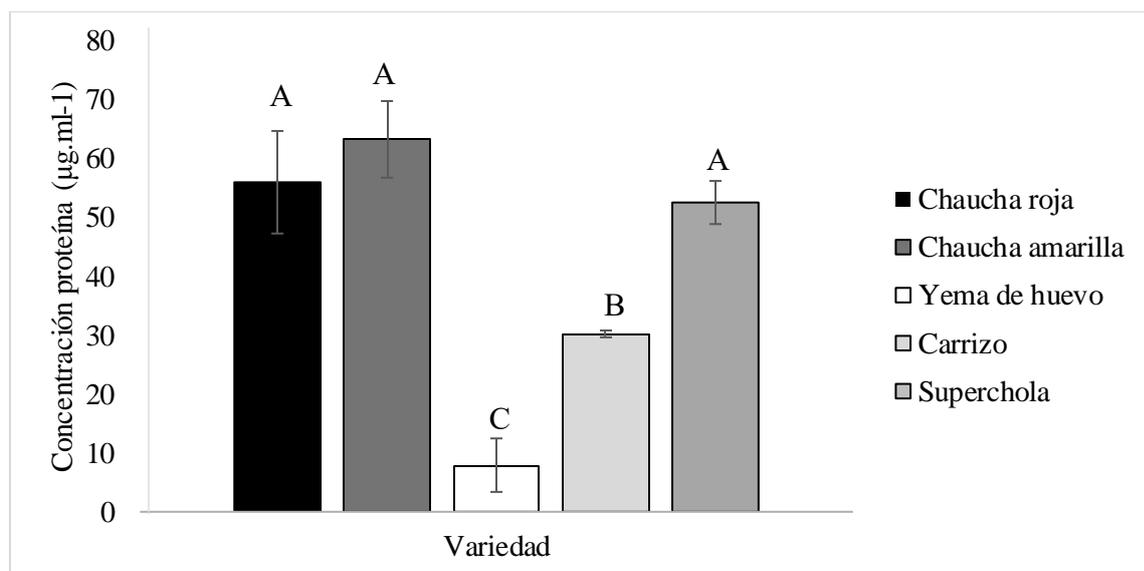
4.2. Concentración de proteína de diferentes variedades de *S. tuberosum*

En el estudio se encontraron diferencias significativas entre las variedades para la variable concentración de proteína soluble (Anexo 3), como se observa en la Figura 2. Las variedades Chaucha roja ($56 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Chaucha amarilla ($63.28 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y Súper chola ($52.55 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) se destacan con la mayor concentración de proteína soluble. Por otro lado, la variedad Carrizo tiene una concentración menor de ($30.23 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), finalmente, la variedad Yema de huevo presenta la menor concentración ($7.92 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Estas diferencias revelan importantes hallazgos sobre la variabilidad genética y su relación con las proteínas de interés presentes en las

variedades estudiadas. La identificación de diferencias significativas en la concentración de proteínas entre las variedades proporciona una base sólida para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas en la agricultura.

Figura 2.

Concentración de proteína soluble de variedades nativas



Las letras distintas sobre las barras representan diferencias significativas (Tukey 0.05). Las barras representan la desviación estándar.

En estudios previos super chola obtuvo 4.6 mg de proteína soluble mediante el método de Bradford (Guapas, 2020), mientras que en este estudio se obtuvo 5.25 mg de proteína soluble. Por otro lado, se observaron en otras investigaciones que el porcentaje de proteína total de chaucha roja era del 9.8%, chaucha amarilla (7.1%), súper chola (8.4%), carrizo (10.1%) y yema de huevo (6.4%), las diferencias en los valores pueden deberse al método de extracción y cuantificación de proteína (Villacrés et al., 2009), lo que se confirma en investigaciones previas donde se cuantificó la proteína total en papas nativas mediante el método de Kjeldahl y se obtuvo entre el 10 y 12% de proteína total (Liang et al., 2020), mientras que en la investigación actual los porcentajes son menores chaucha roja (0.006%), chaucha amarilla

(0.006%), yema de huevo (0.001%), carrizo (0.003%), y súper chola (0.005%) estos debido a que se midió la proteína soluble mediante el método de Bradford, un método sensible, rápido, específico y económico, pero puede ser afectado por la presencia de detergentes y algunos compuestos no adecuados para todas las proteínas (Venegas et al., 2018).

Las variedades chaucha amarilla, chaucha roja y súper chola destacan por su mayor contenido proteico, haciendo de ellas opciones particularmente nutritivas en términos de proteína, lo que permite promover la conservación, consumo y producción de papas nativas (Monteros, Reinoso, et al., 2010). La mejora de cultivos de papa en Ecuador, especialmente en variedades como chaucha roja, chaucha amarilla y súper chola, ha sido un enfoque importante para aumentar la productividad agrícola y la seguridad alimentaria en el país. Estas variedades no solo destacan por su alto contenido de proteínas, sino que también son apreciadas por su adaptabilidad a diversas condiciones climáticas y de suelo (Herrera y Lozano, 2022), ya que súper chola crece a 2800-3400 msnm, chaucha roja 3000-3200 msnm y chaucha amarilla a 3000-3300 msnm (Cuesta et al., 2022).

Por otro lado, la variedad Carrizo y Yema de huevo muestran un contenido de proteínas menor, lo que podría influir en las elecciones de cultivo y consumo según las necesidades nutricionales específicas. Este fenómeno podría estar relacionado con características específicas de las raíces, la microbiota del suelo o la capacidad de las plantas para sintetizar y almacenar proteínas (Vergara, 2008), así como las condiciones de crecimiento ya que yema de huevo crece de 2600-3300 msnm y carrizo de 3000-3600 msnm (Cuesta et al., 2022). La variedad Yema de huevo posee la menor concentración de proteína soluble, podría tener una menor eficiencia en la absorción de nutrientes o menos genes dedicados a la producción de proteínas. Es crucial considerar que la variabilidad genética entre las variedades puede influir significativamente en estas diferencias, pero también deben tomarse en cuenta las prácticas agrícolas y las

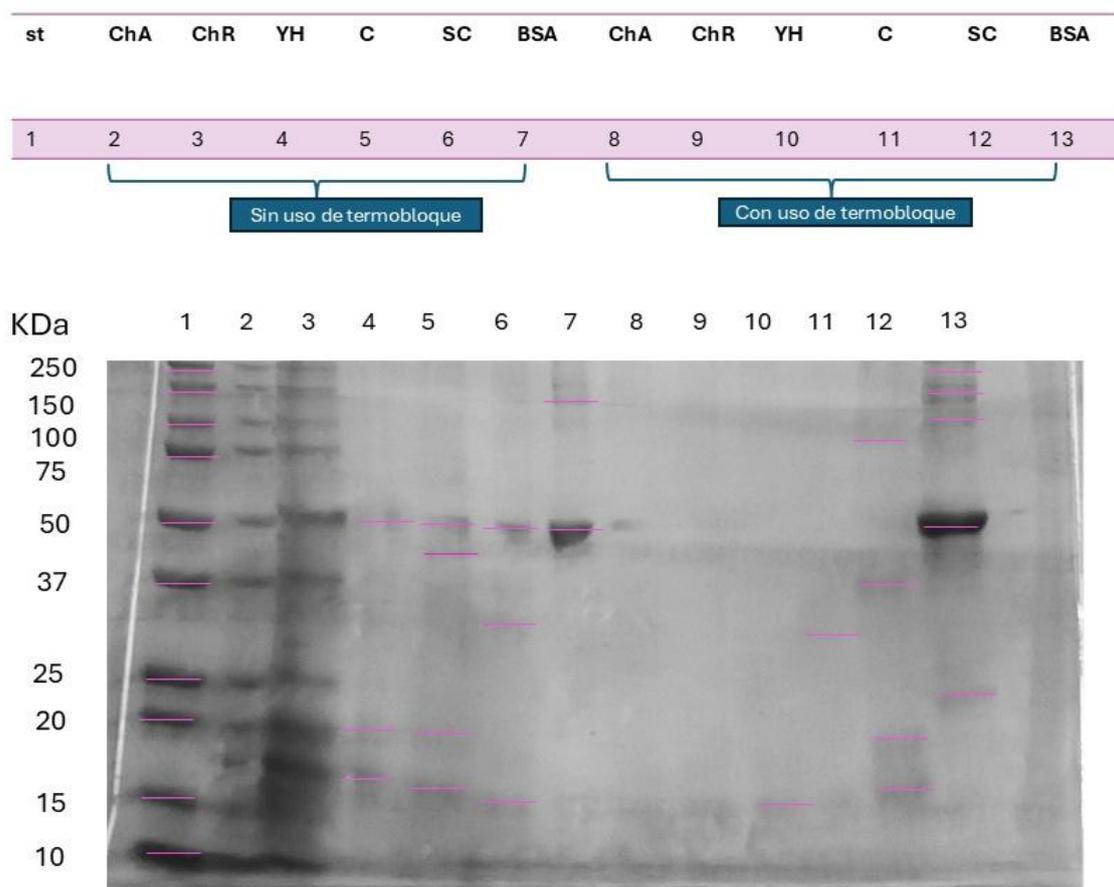
condiciones del cultivo, como la calidad del suelo, la disponibilidad de agua y la gestión de fertilizantes (Rizo et al., 2022).

4.3. Caracterización de proteína de diferentes variedades de *S. tuberosum*

Se realizó la caracterización de las proteínas mediante electroforesis usando gel de poliacrilamida discontinua comercial al 12%. La distribución de bandas de fragmentos proteicos de las variedades de papa se indica en la Figura 3, antes y después del tratamiento térmico.

Figura 3.

Gel de electroforesis en poliacrilamida de las muestras de proteína soluble de las variedades yema de huevo, carrizo y súper chola

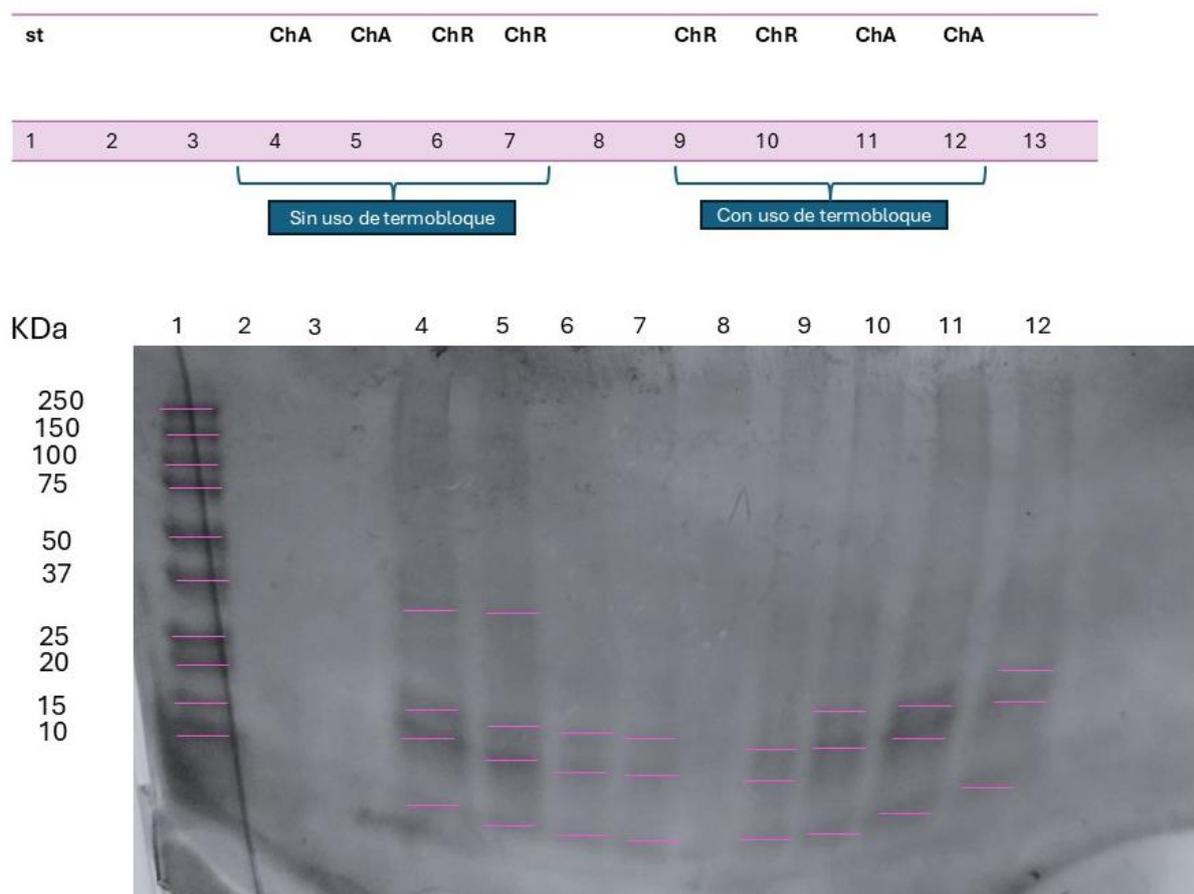


St: estándar, ChA; Chaucha amarilla, ChR: Chaucha roja, YH: Yema de huevo, C: carrizo, SC: Super Chola.

Se puede observar que las variedades que no tuvieron tratamiento térmico contienen diferentes pesos moleculares, yema de huevo presenta tres bandas, carrizo cuatro bandas, súper chola tres bandas, chaucha amarilla cuatro bandas y chaucha roja tres bandas (Figura 4). Mientras que las variedades que no tuvieron tratamiento con calor presentaron menos bandas, yema de huevo presentó una banda, carrizo una banda, súper chola presentó 3 bandas, mientras que chaucha amarilla presentó 3 bandas y chaucha roja 3 bandas.

Figura 4.

Gel de electroforesis en poliacrilamida de las muestras de proteína soluble de las variedades chaucha roja y chaucha amarilla



La variedad con más presencia de bandas fue chaucha amarilla sin tratamiento de calor, la variedad súper chola presentó la banda más concentrada en 50 kDa, chaucha amarilla (10, 15 y 20 kDa), carrizo (15-20 y 50 kDa), yema de huevo (15-20 kDa) y chaucha roja presentó

bandas en los pesos moleculares de 10 y 15 kDa. Es importante destacar que no todas las proteínas se observaron claramente.

La tabla 10 resume las variedades y los posibles péptidos obtenidos a través del método SDS-PAGE, Los péptidos de interés entre los que se encuentran en la muestra pueden ser los Inhibidores de papa I (7.68-7.87 kDa) y II (20.02-20.68 kDa), Inhibidores de proteasa aspartato (19.87-22.7kDa), Inhibidor de proteasa tipo Kunitz (20.19-20.24), patatina (40-45 kDa) y Lectinas que se unen a quitina (45-65 kDa) (Bártová et al., 2019; Imtiaj et al., 2014).

Tabla 9.

Pesos moleculares y posibles péptidos de las variedades sin tratamiento de calor

Tratamiento	KDa	Posible péptido	Referencias
ChA	10, 15, 20	Inhibidores de proteasa (PCPI, PKPI)	(Bártová et al., 2019; Imtiaj et al., 2014; Jain et al., 2021; Sissel & Knut, 2009)
	50	Lectina	
ChR	10, 15, 20	Inhibidores de proteasa	(Bártová et al., 2019; Jain et al., 2021; Sissel & Knut, 2009)
Yh	15-20, 20	Inhibidores de proteasa	(Allen et al., 1996; Bártová et al., 2019; Imtiaj et al., 2014; Jain et al., 2021)
	50	Lectina, patatina	
C	15-20, 20	Inhibidores de proteasa	(Bártová et al., 2019; Imtiaj et al., 2014; Jain et al., 2021)
	37-50,	Patatina	
	50	Lectina	
SC	15	Inhibidores de proteasa	(Bártová et al., 2019; Jain et al., 2021)
	25-37	Patatina	
	50	Lectina	

En investigaciones previas se obtuvo que la variedad súper chola presentaba péptidos de 15-20, 20-25, 35 kDa, estos valores difieren de la presente investigación que contiene péptidos de hasta 50 kDa, esto pudo deberse a la temperatura y metodología empleada, ya que Guapás (2020) realizó un proceso de filtración. En el caso de variedad nativa, Guapás (2020) tuvo un peso de 10-15, 15-20 y 35 kDa, que difiere de las variedades nativas en el presente estudio como chaucha amarilla, carrizo y yema de huevo que presentaron péptidos de 50 kDa.

4.3.1. Efecto de calor durante la ruptura de la proteína

En la Figura 3 se observa que las variedades a las que se les aplicaron calor presentaron bandas menos intensas lo que sugiere que el uso del termobloque pudo haber afectado la estabilidad de proteínas en estas variedades. La aplicación de una temperatura de 80°C para la desnaturalización de proteínas de papa provoca una desnaturalización efectiva de estas, haciendo que pierdan su estructura tridimensional nativa y se vuelvan susceptibles a la acción de enzimas proteolíticas, esenciales para la generación de péptidos (Ospina, 2023). Esta temperatura también facilita la liberación de compuestos interferentes, como lípidos y ácidos nucleicos, mejorando así la pureza y la eficiencia del proceso, también, mejora la digestibilidad enzimática de las proteínas de papa al exponer más sitios de unión para las enzimas y permite un control preciso del grado de hidrólisis, no obstante, es necesario ajustar el tiempo de exposición para evitar la sobrehidrólisis que podría afectar la integridad de los péptidos. (Villanueva, 2023). La temperatura crítica para la degradación de péptidos es de 100 °C, temperatura que se empleó para las muestras durante la aplicación de calor, esto explica porque la intensidad de la bandas cuando se usaba el termobloque era menor (Jiang et al., 2018; Lan et al., 2010). Sin embargo, en la Figura 4 se puede observar la presencia de bandas en ChA y ChR tratadas con calor, esto puede deberse a que la concentración de muestra empleada fue de 2mg DW/ml a comparación de la empleada en la Figura 3 donde se empleó 1 mg DW/ml, en

investigaciones previas se determinó que al diluir las muestras se producen bandas más claras, pero esto puede dar espacio a una mala interpretación de resultados, ya que muestras muy diluidas no revelan resultados en absoluto, es por ello que es importante no diluir la muestra excesivamente a un punto que pueda alterar los resultados (Wang et al., 2017).

4.3.1. Condiciones para la electroforesis

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) es una técnica empleada para investigar la composición de proteínas, sin embargo existen errores frecuentes que pueden afectar los resultados de los experimentos (Kurien, 2021), en esta sección se resume los problemas que se presentaron durante la realización de la electroforesis en este trabajo de investigación.

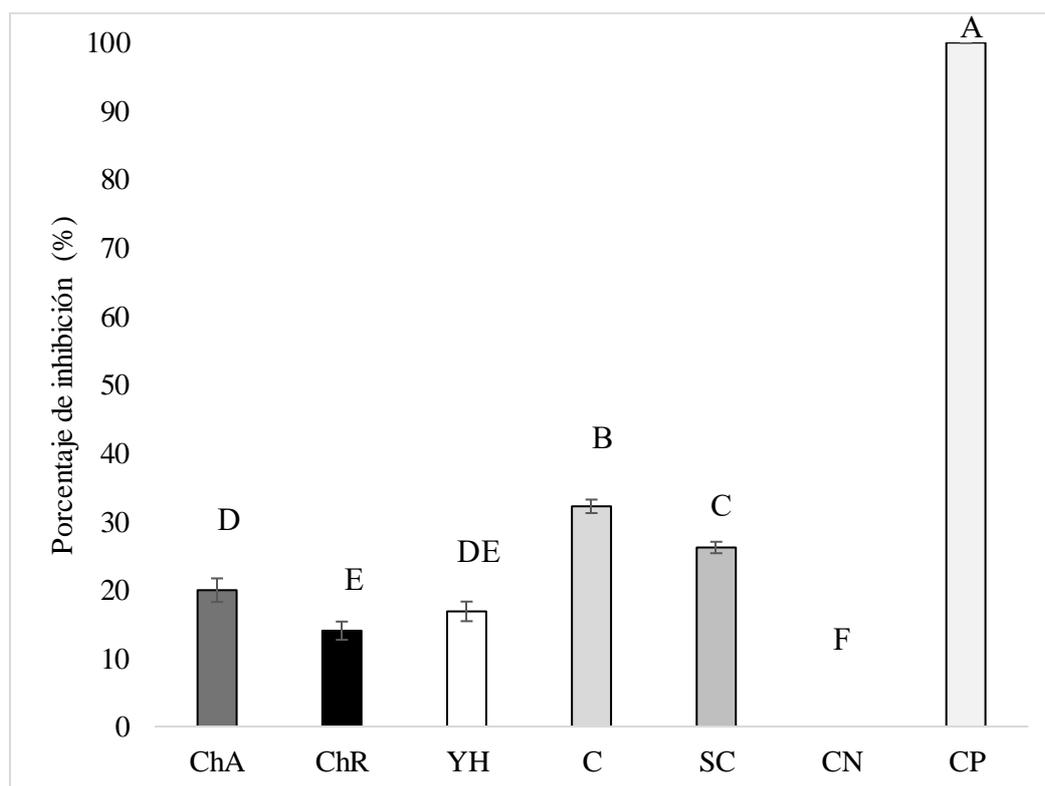
Durante la carga de la muestra en los pocillos existió dificultad debido a la poca visibilidad, se recomienda un volumen adecuado de tampón de carga para que los pocillos sean más visibles. Otra de las dificultades durante la carga fue el tamaño reducido del pocillo, ya que los geles empleados fueron de tipo precast de 15 pocillos, se recomienda emplear los geles Precast de 10 pocillos. Existieron geles defectuosos debido a que este tipo de geles prefabricados eran frágiles y difíciles de manipular, por lo que se rompían fácilmente, es importante manejarlos cuidadosamente para evitar daños. Durante la corrida de la electroforesis se presentó el “efecto sonrisa”, un efecto que causa una curvatura en las bandas de proteína, esto sucede debido a la diferencia de migración de las proteínas en diferentes partes del gel, este puede ser causado por la diferencia en la concentración de SDS en diferentes partes del gel (Kurien, 2021), diferencia en la temperatura debido al voltaje empleado o velocidad de migración, esto provocó la difusión de bandas en el gel, provocando dificultades durante su interpretación (efecto smearing) como se observa en el Anexo 4. Se recomienda además administrar el decolorante varias veces para que el gel pueda verse de mejor manera, cambiando la solución cada vez.

4.4. Análisis de la actividad antifúngica de las fracciones proteicas

En el estudio se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de las fracciones proteicas de diferentes variedades de papa en *B. cinérea* a las 72 horas (Figura 5). El control positivo tuvo 100% de inhibición del crecimiento del hongo, las variedades que tuvieron mayor porcentaje de inhibición fueron carrizo (32%), súper chola (26%), chaucha amarilla (20%), mientras que las que presentaron menor porcentaje de inhibición fueron chaucha roja (14%), yema de huevo (17%) y el control negativo (0%).

Figura 5.

Porcentaje de inhibición de diferentes variedades de papa en B. cinérea a las 72h

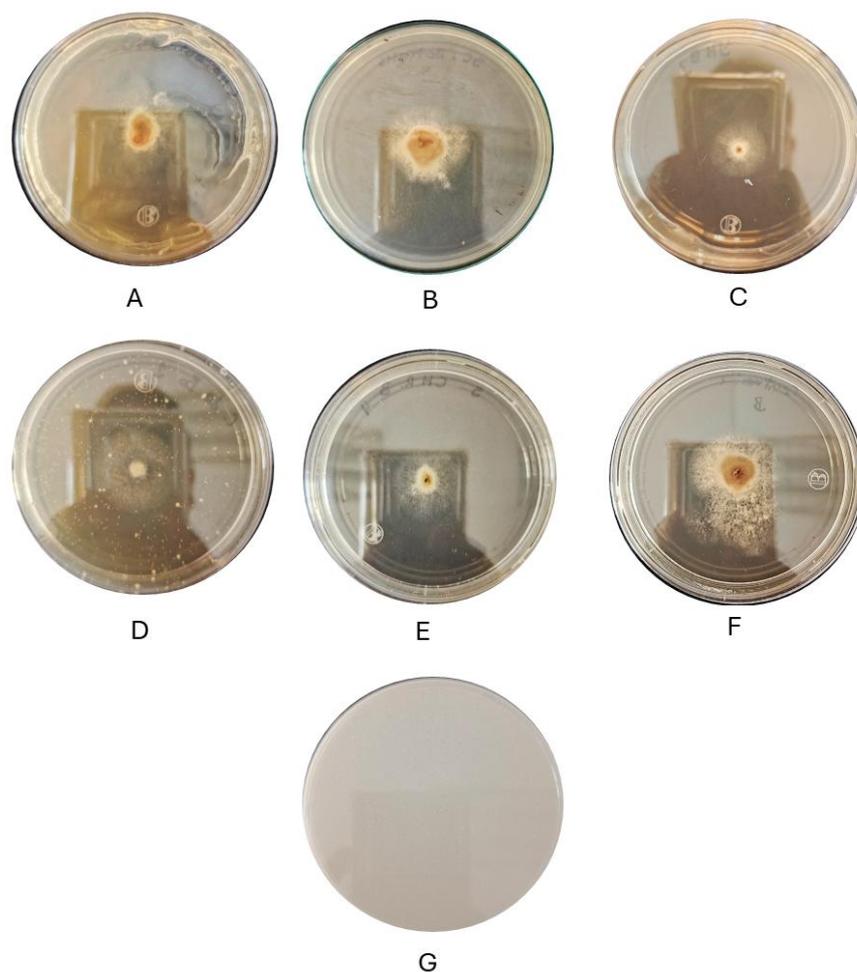


Las letras distintas sobre las barras representan diferencias significativas (Tukey 0.05). Las barras representan la desviación estándar. ChA: chaucha amarilla, ChR: chaucha roja, YH: yema de huevo, C: carrizo, SC: súper chola, CN: control negativo, CP: control positivo.

La variedad nativa carrizo presentó el mayor porcentaje de inhibición en comparación con el control negativo, esta variedad presentó en la sección anterior posibles péptidos como Inhibidores de proteasa (20 kDa) y lectina (50 kDa) que se unen a quitina, la variedad comercial fue la segunda que presentó mayor porcentaje de inhibición presentó inhibidores de proteasas y lectinas. Los inhibidores de proteasas muestran actividades antifúngicas y estudios previos han mostrado inhibir el crecimiento de *B. cinerea* de 30% como se observa en el estudio actual (Bártová et al., 2019; Hermosa et al., 2006).

Figura 6.

Crecimiento de B. cinerea en medios con fracciones proteicas de diferentes variedades de papa



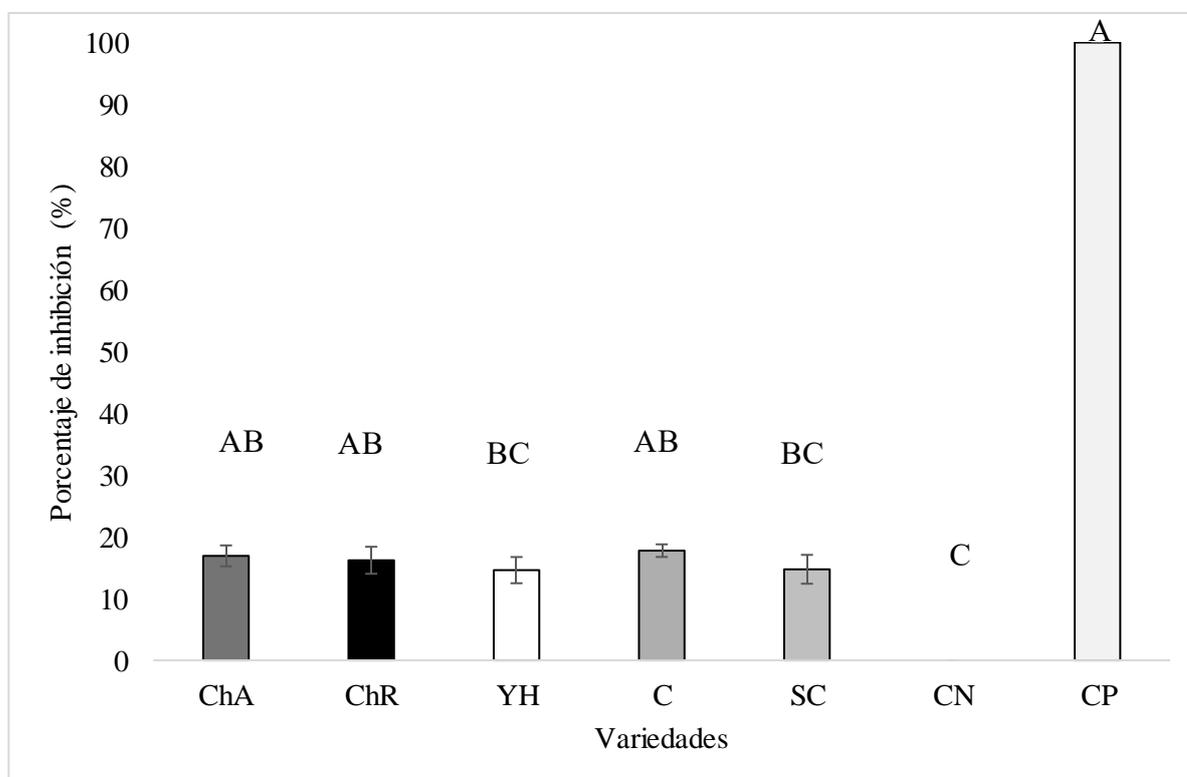
Yema de huevo (A), chaucha roja (B), chaucha amarilla (C), carrizo (D), súper chola (E), control positivo (F), control negativo (G)

Las lectinas que se unen a proteínas tienen la función de inhibir la tasa de crecimiento de insectos, hongos y bacterias (Chen et al., 2018). En la Figura 6 se observa la bioactividad de las fracciones proteicas de las distintas variedades de papa en *B. cinerea*, Se puede observar que existe inhibición en el crecimiento frente al control.

En este estudio se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de las variedades de papa en *Fusarium* sp., como se observa en la Figura 7, el mejor tratamiento fue el control positivo con 100% de inhibición, las variedades que siguen fueron carrizo (18%), chaucha amarilla (17%), chaucha roja (16%), yema de huevo (15%) y control negativo (0%).

Figura 7.

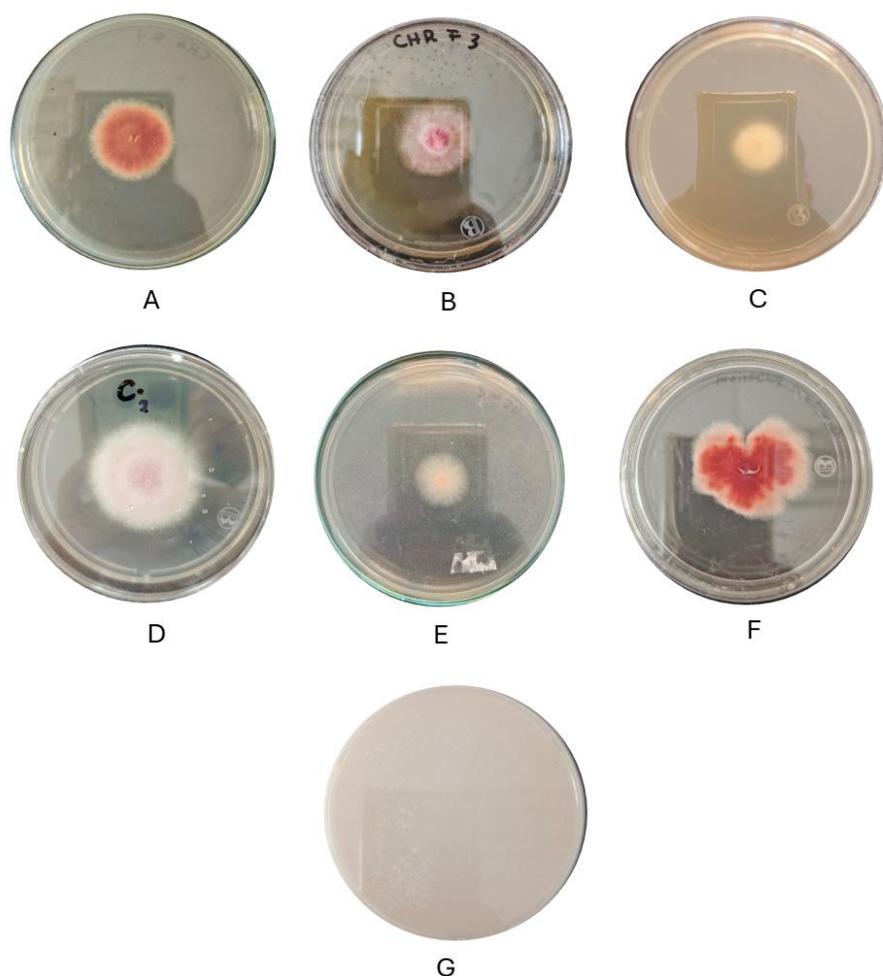
Porcentaje de inhibición de diferentes variedades de papa contra Fusarium sp. a las 72h



Aunque las mejores variedades fueron carrizo, chaucha amarilla y roja en la inhibición de *Fusarium* sp., las diferencias con yema de huevo y súper chola son bajas. Todas las variedades presentaron inhibidores de proteasa, que suprimen las actividades enzimáticas del patógeno, estudios previos han determinado que inhibidores del grupo A y B de proteasas inhiben el crecimiento de *Fusarium* sp., (Bártová et al., 2019; Heibges et al., 2003).

Figura 8.

Crecimiento de Fusarium sp en medios con fracciones proteicas de diferentes variedades de papa



Chaucha amarilla (a), chaucha roja (b), yema de huevo (c), carrizo (d), súper chola (e), control positivo (f), control negativo (g)

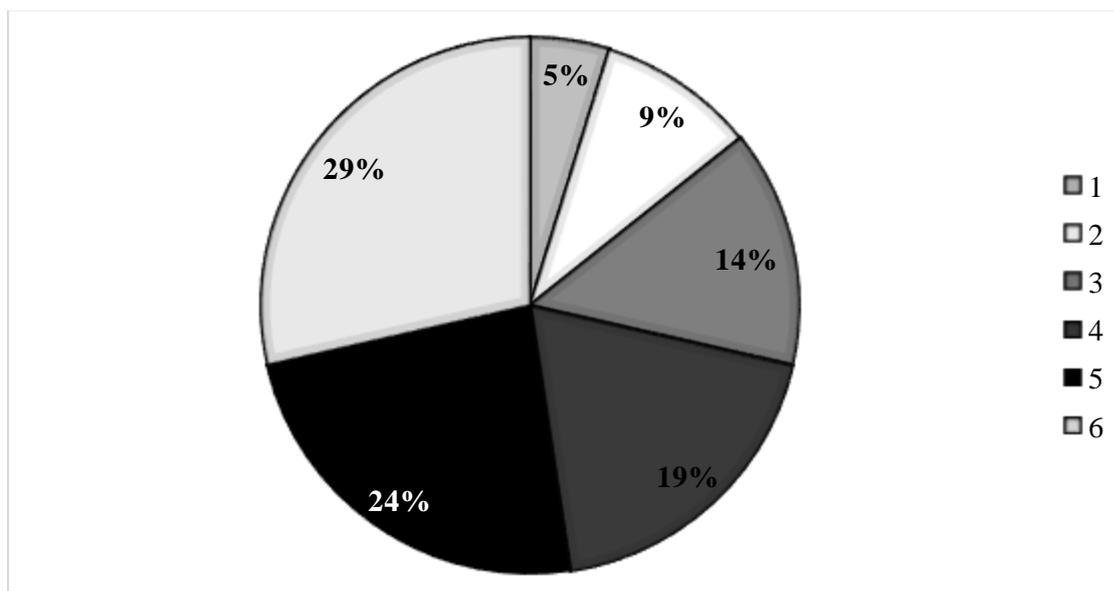
En el estudio de Guapás (2019), la variedad comercial presentó un área de crecimiento a las 72 horas de 510 mm² a diferencia del estudio actual, donde super chola obtuvo un área de crecimiento de 74 mm² esta diferencia puede deberse a que en este estudio se empleó una concentración conocida de proteína liofilizada (Aguilera-Aguirre et al., 2018). En la Figura 8 se observa el crecimiento de *Fusarium* sp., y su inhibición por fracciones proteicas de distintas variedades de papa.

4.5. Análisis Biocultural

Se encuestó a 11 agricultores del cantón Montúfar, se obtuvo que el 64% de los encuestados eran hombres y 36% mujeres. El rango de edad de los participantes fue de 15-30 años (9%), 30-40 años (36%), 40-50 años (18%) y > 50 años (36%). Se obtuvo que el área cultivada por los agricultores comprendía de 1 a 6 ha, la figura 9 muestra los resultados, estos datos son similares a los de Monteros y Yumisaca et al. (2010) que evidenció que en la provincia de Carchi los productores tenían propiedades en promedio de 5.2 ha.

Figura 9.

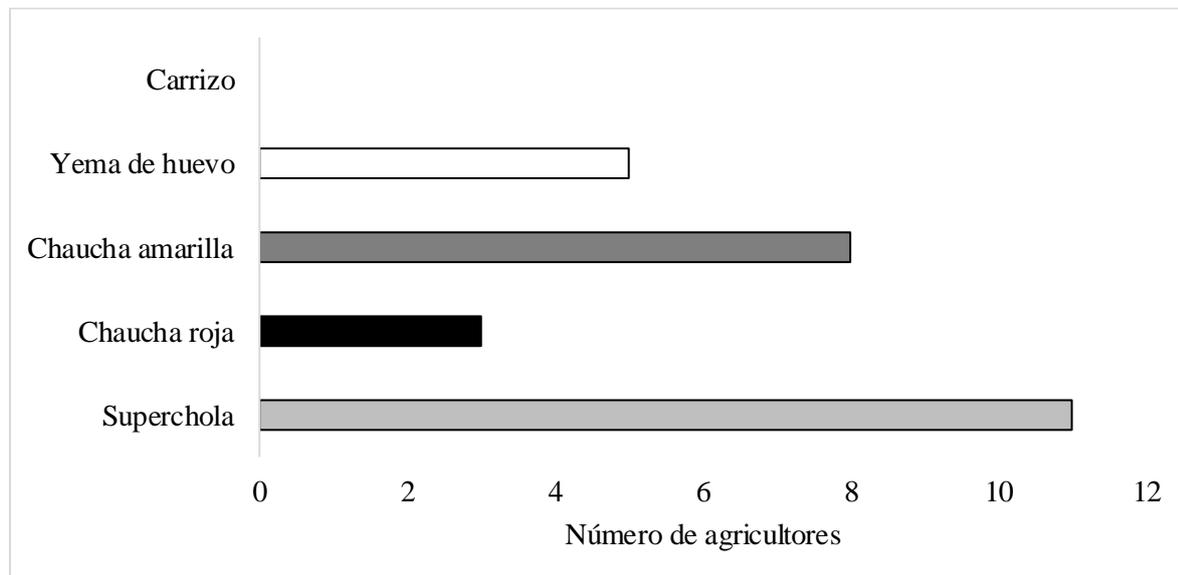
Número de hectáreas de terreno empleadas para cultivo de S. tuberosum por los agricultores entrevistados. De 1 a 6 hectáreas de cultivo.



El 82% de los encuestados afirmaron conocer variedades de papa nativas, mientras que el 18% no las conoce. La figura 10 indica las variedades de papa que los agricultores cultivan o han cultivado en sus terrenos, se observa que la variedad súper chola es la más cultivada, mientras que Carrizo no es conocida. Según Monteros, Yumisaca et al (2010) los agricultores suelen sembrar cultivares de papa nativa para el consumo familiar, sin embargo en Ecuador las variedades se encuentran en una situación crítica, ya que la presencia comercial, conocimiento y hábitos de consumo ha disminuido en la población, debido a su sustitución por variedades mejoradas de mayor rendimiento, como súper chola que ocupa el 80% de producción nacional y 83% de la producción en Carchi (Monteros, Reinoso, et al., 2010; Pozo & Lechón, 2021; Racines et al., 2023). En investigaciones previas también se encontró que las variedades súper chola y chaucha amarilla son las más conocidas, mientras que carrizo es poco conocida por los agricultores en la provincia de Tungurahua (Mullo, 2020).

Figura 10.

Variedades de S. tuberosum cultivadas por los agricultores

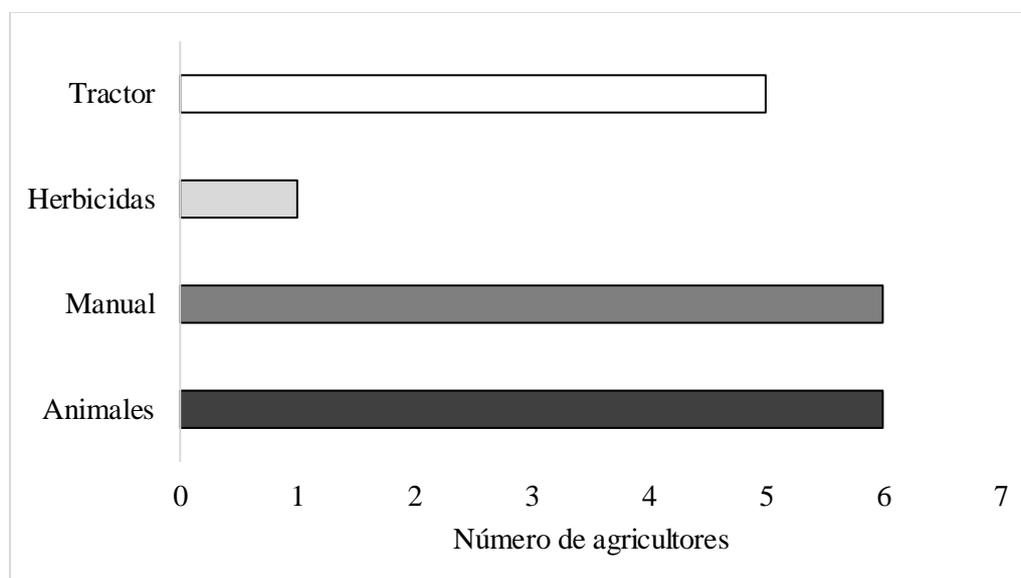


El 64% de los encuestados presentan su propia “chacra” para su cultivo, este término ha sido tomado del quichua “chakra” que significa granja, es un sistema ancestral destinada al cultivo propio de alimentos, mientras el 36% no tiene una chacra para consumo propio, ya que la

producción de papas nativas está orientada al consumo familiar de las comunidades rurales (Monteros, Reinoso, et al., 2010). El 73% de los agricultores emplean abonos orgánicos en su cultivo de papa, mientras que el 27% no los utiliza, la fertilización de papas nativas se hace de manera diferenciada de acuerdo a su destino, si es para consumo recibe mayor cantidad de abono orgánico, mientras que las destinadas al mercado recibe fertilizante químico (10-30-10, N-P-K), la incorporación de abono orgánico se realiza durante la preparación del terreno (Monteros, Yumisaca, et al., 2010). El 100% de los encuestados utiliza productos químicos para el control de enfermedades en el cultivo de papa, en Carchi se efectúan de cinco a doce aplicaciones de productos químicos para combatir enfermedades en el cultivo (Monteros, Yumisaca, et al., 2010). La Figura 11 señala los métodos de labranza empleados por los agricultores, los métodos más usados son el tractor, manual y con animales. En la provincia de Carchi donde las pendientes son superiores al 20% no se puede usar tractor, por lo que el labrado se realiza de forma manual (Monteros, Yumisaca, et al., 2010). Además, algunos agricultores aplican fertilizantes y herbicidas al momento de la siembra, ya que permite manejar áreas extensas con poco esfuerzo los más empleados son Glifosato, Amina y metribuzina (Alvarado et al., 2017; Pumisacho & Sherwood, 2002)

Figura 11.

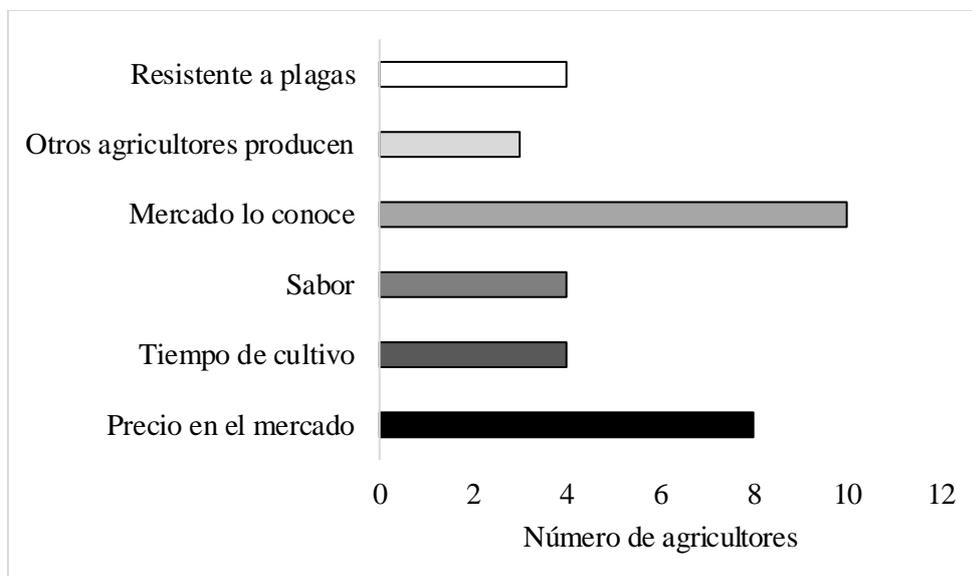
Métodos de labranza empleados por agricultores



En la Figura 12 se observa los aspectos de mayor importancia para elegir una variedad con destino comercial, las razones más importantes para los agricultores es el conocimiento y precio en el mercado, ya que el solo el 1% de los consumidores urbanos conocen de la existencia de papas nativas, este es un problema para ingresar en los mercados (Monteros & Reinoso, 2010). Las papas nativas tienen una presencia en mercados de Quito, Ambato y Riobamba limitadas, a diferencia de las variedades mejoradas. Las papas nativas debido a los volúmenes limitados de comercialización registran mejores precios por ejemplo la variedad Uvilla se pagó en el año 2005 \$22/quintal mientras que Fripapa \$14/quintal, sin embargo un problema es el menor rendimiento de las variedades nativas (Monteros et al., 2005)

Figura 12.

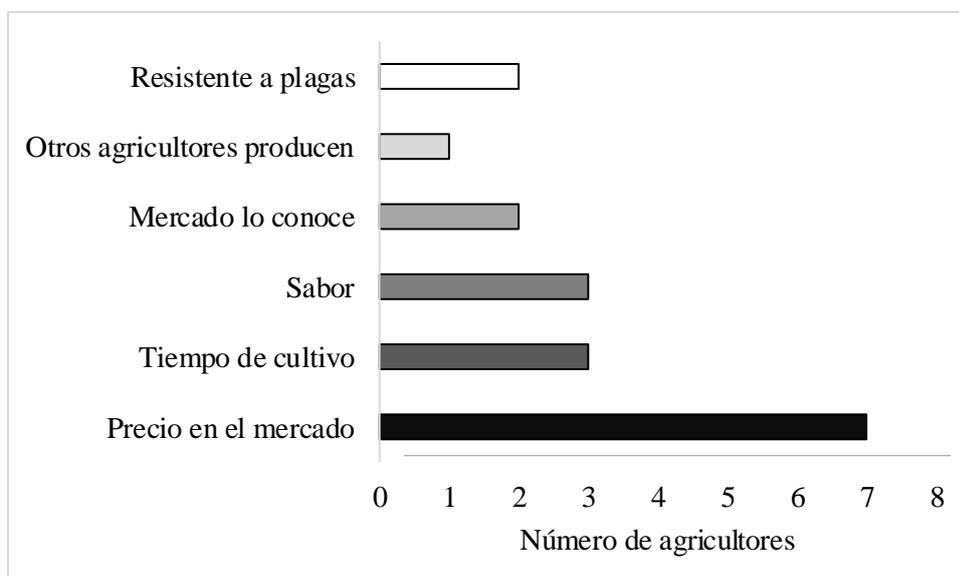
Factores que determinan la elección de variedades de cultivo por agricultores



Mientras que durante la elección de una variedad para cultivo en su chacra, los agricultores prefieren el precio en el mercado, debido a que pueden vender los excedentes en ferias agroecológicas, así como el sabor y el tiempo de cultivo (Figura 13), ya que estas papas son principalmente para su propio consumo (Monteros et al., 2005; Monteros, Yumisaca, et al., 2010).

Figura 13.

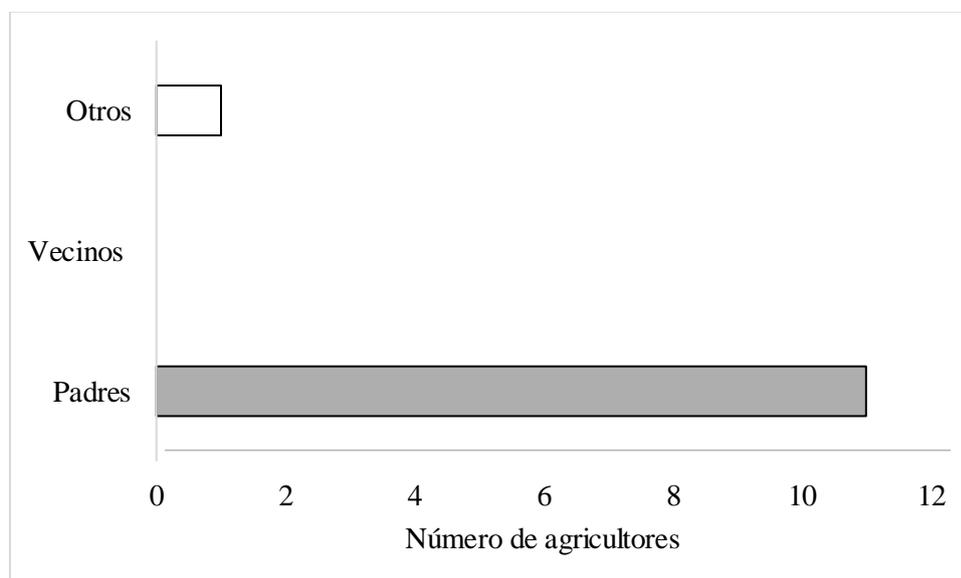
Factores que determinan la elección de variedades de cultivo para consumo propio



Para los agricultores que una variedad de papa sea conocida en el mercado para ser sembrada tiene una calificación promedio de 9.72 que indica que es muy importante, así como que la variedad sea conocida en el mercado para ser sembrada fue de 9.36 que implica que es muy importante, por lo que las variedades nativas no suelen ser cultivadas. La Figura 14 señala que los agricultores aprendieron a cultivar *S. tuberosum* de sus padres y de otros, principalmente el cultivo lo aprenden los hijos de sus padres y las mujeres son las que conocen mejor sus preparaciones así como sus usos medicinales (Monteros, Yumisaca, et al., 2010).

Figura 14.

Personas de quienes los agricultores aprendieron a cultivar papa

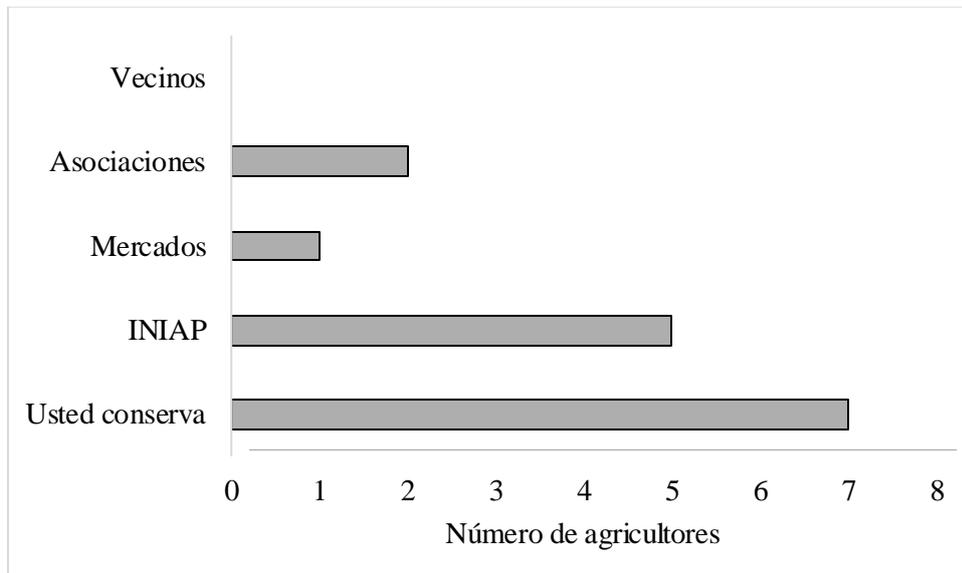


Los agricultores conservan sus propias semillas, consiguen a través de instituciones como el INIAP, mercados o asociaciones como se observa en la Figura 15 estos datos son similares a

los de Monteros, Yumisaca et al (2010) que indica que la mayoría de los agricultores utilizan su propia semilla.

Figura 15.

Lugares de donde los agricultores obtienen la semilla



CAPÍTULO V

5 . CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se identificó que existen diferencias entre la concentración de péptidos presentes en las distintas variedades. Las variedades chaucha roja, chaucha amarilla y súper chola tuvieron mayor concentración de péptidos con concentraciones de hasta $65 \mu\text{g proteína.ml}^{-1}$, mientras que carrizo y yema de huevo presentaron concentraciones menores de $10 \mu\text{g proteína.ml}^{-1}$
- El análisis molecular determinó que existen diferentes péptidos en las distintas variedades entre los que destacan los Inhibidores de proteasa (15-20 KDa), proteínas tipo Kunitz (15-20, 50 KDa), Patatina (25-37 KDa) y lectinas de unión a quitina.
- Los péptidos de las variedades nativas presentaron actividad en los hongos, en *B. cinerea*. se observó que las variedades que presentaron actividad fueron carrizo y super chola, mientras que en *Fusarium* sp. tuvieron actividad carrizo, chaucha amarilla, chaucha roja, yema de huevo y súper chola. En el análisis biocultural se encontró que la variedad nativa carrizo no es conocida por los agricultores, también que el precio y conocimiento en el mercado es importante durante la selección de variedades para el cultivo, mientras que para consumo propio se considera el sabor, tiempo de cultivo y precio en el mercado, además los agricultores conservan las semillas o las obtienen de instituciones como el INIAP.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda tomar las muestras de variedades frescas post cosecha para que estas se conserven por más tiempo, además para guardar los tubérculos no debe lavar los residuos de tierra y deben asegurarse que las papas se encuentren secas, se lava una vez se van a emplear.

- Los valores de voltaje deben estar en un rango estándar de 200V para evitar el efecto sonrisa y la alteración en la proteína cuando se realiza la corrida del gel.
- Se recomienda emplear varios métodos de cuantificación de proteína como el Lowdry, ácido bicinónico, un método colorimétrico para estimar la muestra de 0.02-2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Bainor et al., 2011), o-flalaldehido que es un método sensible (Reyes & Galbán, 2023) para obtener una variabilidad en los resultados.
- Se recomienda comprar geles pre-cast con una cantidad menor de pocillos por la facilidad al momento de colocar las muestras.
- Realizar el método SDS-PAGE con otras variedades nativas de papa del Ecuador

Bibliografía

- Aguilera-Aguirre, S., Meza-Espinoza, L., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Córdoba, B., González-Córdova, A. F., & Montalvo-González, E. (2018). Evaluación de la capacidad de inhibición de hemólisis oxidativa y actividad antimicrobiana de fracciones peptídicas obtenidas de la hidrólisis de proteínas de huevo, leche y soya usando proteasas extraídas de *Bromelia pinguin* y *Bromelia karatas*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.1.142>
- Allen, A. K., Bolwell, G. P., Brown, D. S., Sidebottom, C., & Slabas, A. R. (1996). Potato lectin: A three-domain glycoprotein with novel hydroxyproline-containing sequences and sequence similarities to wheat-germ agglutinin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28(11), 1285-1291. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(96\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00043-X)
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D., & Lightfoot, D. (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*, 6(4), 42. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
- Alvarado, A., Rojas, L., & Mora, A. (2017). *Métodos de labranza conservacionista y maquinaria para la conservación de suelos en el establecimiento de plantaciones desdroenergéticas*.
- Araujo, A., Monteros, C., Paula, N., Racines, M., Rivadeneira, J., Velásquez, J., Cuesta, X., Cartagena, Y., & Castillo, C. (2020). *Manual del cultivo de papa para pequeños productores* (Tercera). INIAP.

- Bainor, A., Chang, L., McQuade, T. J., Webb, B., & Gestwicki, J. E. (2011). Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. *Analytical Biochemistry*, 410(2), 310-312. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.015>
- Bártová, V., Bárta, J., & Jarošová, M. (2019). Antifungal and antimicrobial proteins and peptides of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(14), 5533-5547. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09887-9>
- Benítez, P., Contreras, L., Molina, Y., Sánchez, B., & Balza, A. (2015). *Residuos de plaguicidas en la cáscara e interior de la papa (Solanum tuberosum L.) proveniente de una región agrícola del estado Mérida, Venezuela*. 27(1).
- Cárdenas, I., Pérez- Trujillo, Eugenio. F., & Gonzáles - Pariona, Fernando. J. (2020). Contenido de almidón nativo de variedades nativas de papa (*Solanum* spp.). *Revista Investigación Agraria*, 2(1), 15-25. <https://doi.org/10.47840/ReInA.2.1.832>
- Castro, I., & Contreras, A. (2011). *Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa* (Editorial Austral).
- Chen, C.-S., Chen, C.-Y., Ravinath, D. M., Bungahot, A., Cheng, C.-P., & You, R.-I. (2018). Functional characterization of chitin-binding lectin from *Solanum integrifolium* containing anti-fungal and insecticidal activities. *BMC Plant Biology*, 18(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1222-0>
- Cuesta, X., Monteros, C., Racines, M., & Rivadeneira, J. (2022). *Catálogo de variedades de papa. Segunda edición. Publicación Miscelánea No. 427. Quito (Ecuador)*. 28. Publicación Miscelánea.
- El Universo. (2024). *En Carchi la producción de un quintal de papa cuesta \$ 5 más que el precio que reciben los productores.*

<https://www.eluniverso.com/noticias/ecuador/papa-produccion-carchi-enfermedad-punta-morada-caida-precios-no>

- Garfin, D. E. (1990). [33] One-dimensional gel electrophoresis. En *Methods in Enzymology* (Vol. 182, pp. 425-441). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82035-Z](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82035-Z)
- Grommers, H. E., & Van Der Krogt, D. A. (2009). Potato Starch. En *Starch* (pp. 511-539). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00011-2>
- Guapas, G. (2020). *Evaluación de la actividad biológica de proteína residual de papa de las variedades S. tuberosum L, S. tuberosum Vitellotte contra hongos obtenida mediante tratamiento térmico* [Universidad Técnica del Norte]. <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/10724/2/03%20BIO%20018%20T RABAJO%20GRADO.pdf>
- Heibges, A., Salamini, F., & Gebhardt, C. (2003). Functional comparison of homologous members of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 269(4), 535-541. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0861-z>
- Hermosa, M. R., Turrà, D., Fogliano, V., Monte, E., & Lorito, M. (2006). Identification and characterization of potato protease inhibitors able to inhibit pathogenicity and growth of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68(4-6), 138-148. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2006.09.004>
- Imtiaj, H., Farhadul, I., Yasuhiro, O., & Syed, R. K. (2014). Antiproliferative activity of cytotoxic tuber lectins from *Solanum tuberosum* against experimentally induced Ehrlich ascites carcinoma in mice. *African Journal of Biotechnology*, 13(15), 1679-1685. <https://doi.org/10.5897/AJB2014.13633>
- Jain, M., Muthukumaran, J., & Singh, A. K. (2021). Comparative structural and functional analysis of STL and SLL, chitin-binding lectins from *Solanum* spp. *Journal of*

- Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(13), 4907-4922.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1781693>
- Jiang, Q., Han, J., Gao, P., Yu, L., Xu, Y., & Xia, W. (2018). Effect of heating temperature and duration on the texture and protein composition of Bighead Carp (*Aristichthys nobilis*) muscle. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 2110-2120.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1489835>
- Kurien, B. T. (2021). Common Problems in Electrophoresis. En B. T. Kurien, *Western Blotting for the Non-Expert* (pp. 425-432). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-70684-5_42
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lan, X., Liu, P., Xia, S., Jia, C., Mukunzi, D., Zhang, X., Xia, W., Tian, H., & Xiao, Z. (2010). Temperature effect on the non-volatile compounds of Maillard reaction products derived from xylose–soybean peptide system: Further insights into thermal degradation and cross-linking. *Food Chemistry*, 120(4), 967-972.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.033>
- Liang, Z. C., Liang, M. H., & Jiang, J. G. (2020). Transgenic microalgae as bioreactors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(19), 3195-3213.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1680525>
- Melian, D. (2010). *Ensayo Comparativo de Dos Metodologías de Extracción de Almidón de Papa usando Muestras de Diez Variedades Nativas de Chiloé y dos Variedades Comerciales*. Universidad Austral de Chile.
- Monteros, C., Cuesta, X., Jimenez, J., & López, G. (2005). *Las papas nativas en el Ecuador: Estudios Cualitativos sobre oferta y demanda* (Primera). INIAP.

- Monteros, C., & Reinoso, I. (2010). *Biodiversidad y oportunidades de mercado para las papas nativas ecuatorianas*. 15-16.
- Monteros, C., Reinoso, I., & Villacres, E. (2010). *Papas nativas, rescatando nuestra biodiversidad*. INIAP.
- Monteros, C., Yumisaca, F., Andrade, J., & Reinoso, I. (2010). *Catálogo de cultivares de papa nativa Sierra Centro Norte del Ecuador*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Quito, Ecuador.
- Mullo, V. (2020). *Diagnóstico de la diversidad nativa de papa (Solanum spp.) y maíz (Zea mays L.) en seis comunidades de la provincia de Tungurahua*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Orbea, K. (2020). *Identificación del contenido de almidón en dos variedades de papa: INIAP-CECILIA (Solanum tuberosum L.) y Superchola (Solanum tuberosum) para la elaboración de bioplástico*. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo.
- Ospina, J. (2023). *Valorización de proteínas vegetales mediante hidrólisis enzimática para la obtención de péptidos con propiedades funcionales y biológicas* [Tesis doctoral]. Universidad de Granada.
- Pęksa, A., & Miedzianka, J. (2021). Potato Industry By-Products as a Source of Protein with Beneficial Nutritional, Functional, Health-Promoting and Antimicrobial Properties. *Applied Sciences*, 11(8), 3497. <https://doi.org/10.3390/app11083497>
- Pozo, F., & Lechón, B. (2021). *Característica fisicoquímica y funcional de almidón de papa superchola y su utilización en la formulación de salchicha tipo Frankfurt*. 160.176.
- Pumisacho, M., & Sherwood, S. (2002). *El cultivo de la papa en Ecuador* (Primera). INIAP.
- Racines, M., Amagua, J., Sanguo, V., & Cuesta, X. (2023). Producción y consumo de papa en Ecuador. *Décimo Congreso Ecuatoriano de la papa San Gabriel*, 18-20.

- Rámirez, F., Fournier, M., Rupert, C., & Hidalgo, C. (2014). *Uso de agroquímicos en cultivo de papa*. 25(2), 335-345.
- Reyes, E., & Galbán, A. (2023). *Métodos para la cuantificación de proteínas*.
- Reyniers, S., Ooms, N., Gomand, S. V., & Delcour, J. A. (2020). What makes starch from potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers unique: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(5), 2588-2612. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12596>
- Rodríguez-Pérez, L. (2011). Ecofisiología del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 4(1), 97-108. <https://doi.org/10.17584/rch.2010v4i1.1229>
- Singh, J., & Kaur, L. (2009). *Advances in potato chemistry and technology*. Academic.
- Sissel, L., & Knut, O. (2009). *Industrial proteins from potato juice. A review*.
- Syngenta. (2022). *Syngenta presenta nuevo fungicida poscosecha para papas*. <https://www.agribusinessglobal.com/es/agroquimicos/fungicidas/syngenta-presenta-un-nuevo-fungicida-poscosecha-para-patatas/>
- Tacón, A. (1989). Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados manual de capacitación. En *Programa Cooperativo Internacional*. FAO-Italia.
- Torres, L., Cuesta, X., Montero, C., & Rivadeneira, J. (2011). *Sa*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Quito, Ecuador.
- Untuña, P., Villaces, E., Bravo, J., & Cecelila, M. (2011). *Estudio del efecto de la fritura al vacío sobre los atributos de la calidad de chips de papa nativa*. INIAP.
- Villacrés, E., Quilca, N., Muñoz, R., & Reinoso, I. (2009). *Caracterización física, nutricional y funcional de papas nativas (Solanum tuberosum ssp.) para orientar sus usos en Ecuador*. 15(1).
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. Y

evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194-205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>

Waglay, A., & Karboune, S. (2016). Enzymatic generation of peptides from potato proteins by selected proteases and characterization of their structural properties. *Biotechnology Progress*, 32(2), 420-429. <https://doi.org/10.1002/btpr.2245>

Waglay, A., Karboune, S., & Alli, I. (2014). Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties. *Food Chemistry*, 142, 373-382. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.060>

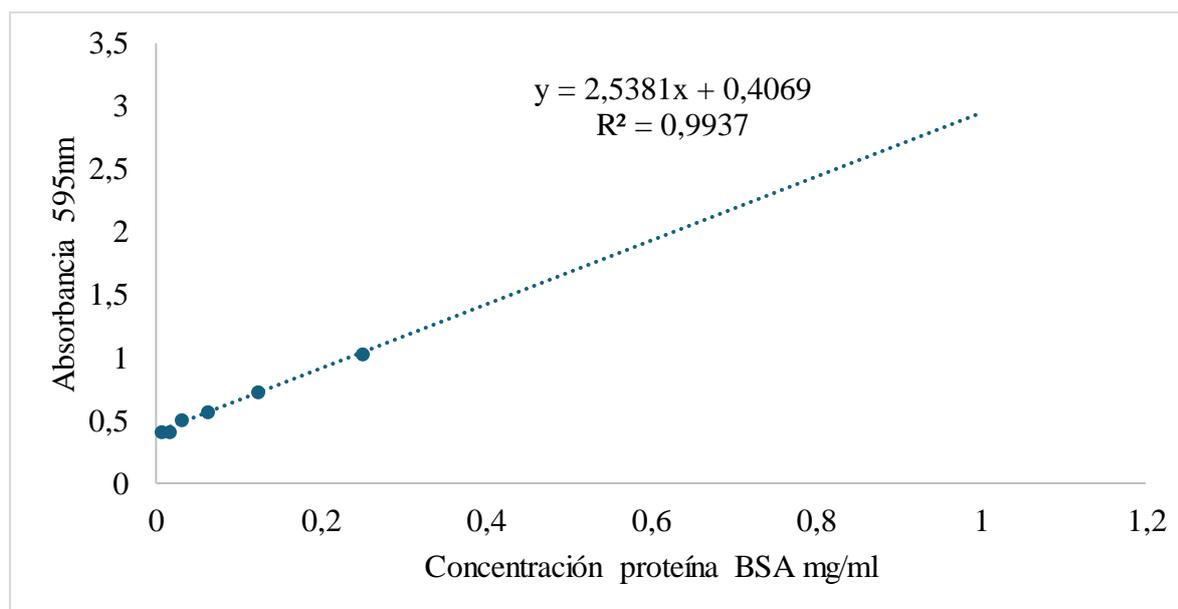
Wang, D., Kaminagayoshi, T., & Doi, T. (2017). *Development of a Technique for Quantifying Protein Degradation*.

ANEXOS

Anexo 1. Concentración de proteína de cada variedad

Variedad	Repetición	Absorbancia	Concentración proteína (mg/ml)	Promedio concentración (mg/)	Desviación
Chaucha roja	1	0.574	0.066	0.0560	0.009
Chaucha roja	2	0.532	0.049		
Chaucha roja	3	0.541	0.053		
Chaucha amarilla	1	0.549	0.056	0.0633	0.007
Chaucha amarilla	2	0.576	0.066		
Chaucha amarilla	3	0.579	0.068		
Yema de huevo	1	0.438	0.012	0.0079	0.005
Yema de huevo	2	0.415	0.003		
Yema de huevo	3	0.428	0.008		
Carrizo	1	0.482	0.030	0.0302	0.001
Carrizo	2	0.485	0.031		
Carrizo	3	0.484	0.030		
Superchola	1	0.530	0.048	0.0525	0.004
Superchola	2	0.548	0.056		
Superchola	3	0.543	0.054		

Anexo 2. Curva de calibración estándar de proteínas



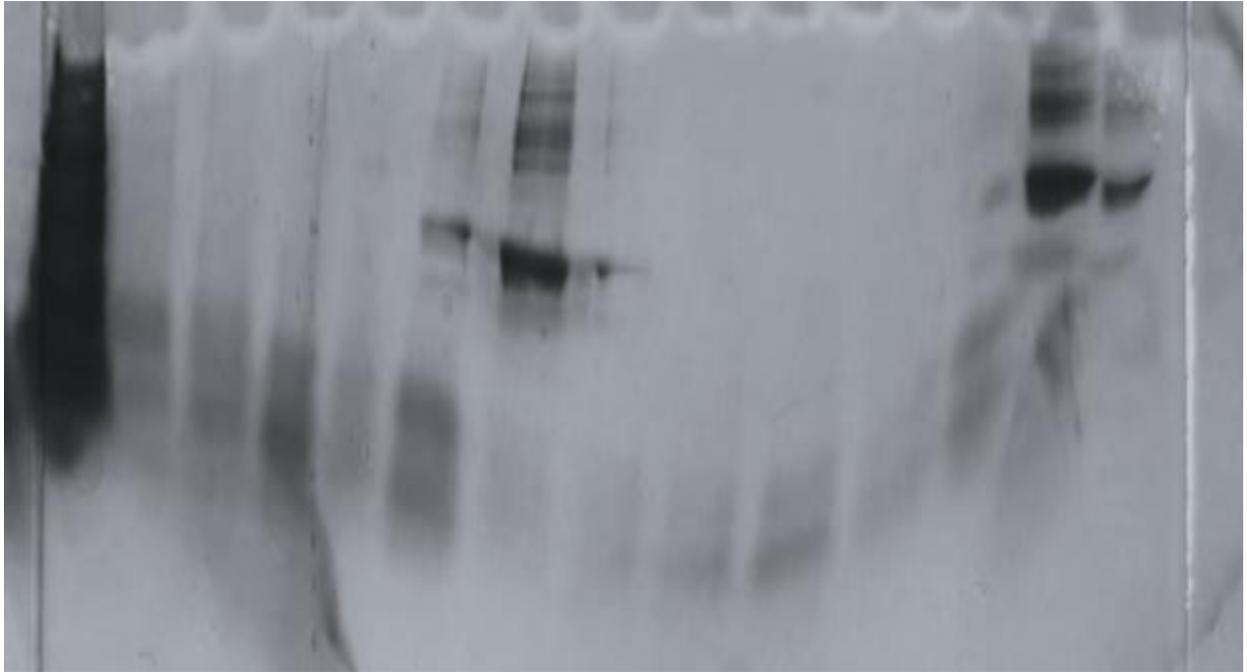
Anexo 3

Análisis de Varianza de la Concentración de proteína en diferentes variedades de papa

FV	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.01	6	1.0×10^{-3}	26.95	0.0001
Variedad	0.01	4	1.6×10^{-3}	40.38	0.0001
Repetición	7.6×10^{-6}	2	3.8×10^{-6}	0.10	0.9074
Error	3.1×10^{-4}	8	3.9×10^{-5}		
Total	0.01	14			

Anexo 4.

Efecto sonrisa en análisis SDS-PAGE



Anexo 5.

Protocolo de preparación de Tampón Fosfato 25 mM ph7

 	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL</p>
<p style="text-align: center;">Título de Tesis</p>	<p style="text-align: center;">Preparación de Tampón Fosfato 25mM ph7 “BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS PROCEDENTE DE PROTEÍNA RESIDUAL DE PAPA (<i>Solanum Tuberosum</i>) CONTRA FITOPATÓGENOS”</p>
<p style="text-align: center;">Autor de la Tesis</p>	<p style="text-align: center;">Andrés Guerrero</p>

<p>Introducción</p>
<p>El tampón fosfato es una solución empleada en la investigación biológica, bioquímica. Contienen cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio, fosfato de potasio. Su osmolaridad es muy semejante al liquido extracelular de los mamíferos. Tienen la función de mantener en equilibrio el pH óptimo para mantener la estabilidad y actividad de proteínas</p>
<p>Palabras Claves:</p>
<p>Tampón fosfato</p>
<p>Metodología:</p>
<p>Materiales</p> <ul style="list-style-type: none"> - 4 frascos de vidrio de 250mL estériles - 1 boeco de 100mL estéril - Agua destilada estéril 1L - Puntas estériles de 1000 y 100 µL - Probeta de 100 mL - Etiquetas - Vaso de precipitación de 100mL <p>Reactivos</p> <ul style="list-style-type: none"> - 0,908 g de KH_2PO_4 - 1,148 g de Na_2HPO_4 <p>Preparación de Buffer Fosfato 25mM ph 7 (100mL)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pesar 0,908g de KH_2PO_4 y 1,148g de Na_2HPO_4 y llevar a la cámara de flujo laminar - Etiquetar los frascos con el nombre de las soluciones

- Colocar los 0,908g de KH_2PO_4 en un frasco de vidrio y diluir con 100mL de agua destilada estéril.
- Colocar los 1,148g de Na_2HPO_4 en un frasco de vidrio y diluir con 100mL de agua destilada estéril.
- Tomar 19,6 mL de KH_2PO_4 y 80.4mL de Na_2HPO_4 para obtener la solución 1, mezclar.
- Tomar 90,09mL de la solución 1 y aforar a 100mL con agua destilada estéril (Se obtiene el Buffer fosfato 60mM)
- Tomar 41,6 mL del Buffer Fosfato 60mM y aforar a 100mL con agua destilada estéril (Se obtiene el Buffer fosfato 25mM) alcanzar pH7.

Observaciones:

Para mayor exactitud se utilizan las puntas de 1000 μL y 100 μL para tomar valores pequeños de las soluciones que no se pueden medir en la probeta de 100mL.

El vaso de precipitación se usará para trasvasar el agua destilada con facilidad.

Anexos:**Bibliografía:**

https://www.ugr.es/~pomif/pom-amb/pa-i/tampones_y_medios_de_cultivo/tampon_fosfato.htm

Anexo 6.

Protocolo para preparar BSA estándar

  	UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL
Título de Tesis	Preparación de BSA estándar “BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS PROCEDENTE DE PROTEÍNA RESIDUAL DE PAPA (<i>Solanum Tuberosum</i>) CONTRA FITOPATÓGENOS”
Autor de la Tesis	Andrés Guerrero

Introducción

Albúmina sérica bovina (BSA) es una proteína presente en el suero sanguíneo de los bovinos. Se utiliza para la investigación en laboratorio entre las que se destacan la calibración como estándar para cuantificación de proteínas, como diluyente para muestras biológicas, anticuerpos u otros reactivos y estabilizador de enzimas (Doumas, 1975).

El BSA se utiliza como estándar en la cuantificación de proteínas mediante métodos como el ensayo de Bradford. Se mide la absorbancia o intensidad producida para estimar la concentración de proteínas en muestras desconocidas.

Palabras Claves:

BSA

Metodología:

Materiales

- 1 tubo falcon estéril de 15 mL
- 3 ependorf estériles de 2 mL
- Probeta estéril de 10 mL
- Puntas estériles de 1000 mL

Reactivos

- 10 mg de Albúmina sérica bovina BSA
- 10 mL de tampón fosfato 25mM ph 7

<p>Preparación de Buffer Fosfato 25mM ph 7 (100mL)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se pesa 10 mg de BSA en una balanza analítica y se transporta con mucho cuidado hasta la cámara de flujo laminar. - Colocar 10 ml de tampón fosfato 25mM pH7 en una probeta estéril y llevarlo a un tubo falcon de 15 ml. - En el tubo falcon con tampón se añade los 10mg de BSA y se agita suavemente hasta diluir la mezcla (se puede notar la presencia de espuma) - Para evitar contaminación de la solución madre de BSA se toman alícuotas en tubos ependorf estériles de 2mL. - Se conservan las soluciones en refrigeración.
<p>Observaciones:</p> <p>Nota. Se debe preparar cantidades pequeñas de BSA ya que la curva de calibración no requiere cuantiosas cantidades. La concentración madre es de 1mg/1ml.</p>
<p>Anexos:</p>
<p>Bibliografía:</p> <p>Doumas, B. (1975). Standards for Total Serum Protein Assays- A Collaborative Study. Clinical Chemistry. 21 (8). 1159-1166. https://doi.org/10.1093/clinchem/21.8.1159</p>

Anexo 7.

Protocolo para electroforesis

	<p>UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL</p>
	<p>SDS-PAGE</p>
<p>Título de Tesis</p>	<p>“BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS PROCEDENTE DE PROTEÍNA RESIDUAL DE PAPA (<i>Solanum tuberosum</i>) CONTRA FITOPATÓGENOS”</p>
<p>Autor de la Tesis</p>	<p>Andrés Guerrero</p>

<p>Introducción</p> <p>La electroforesis vertical de proteínas es una técnica analítica ampliamente utilizada en bioquímica y biología molecular para separar y analizar mezclas complejas de proteínas. Esta</p>
--

técnica se basa en la migración de las proteínas a través de un gel de poliacrilamida sometido a un campo eléctrico. (Garcia.et al.,2012)

La electroforesis vertical de proteínas permite separar las proteínas según su tamaño y carga, lo que facilita la identificación y cuantificación de las diferentes proteínas presentes en una muestra. Esta técnica es especialmente útil en la investigación biomédica, la biotecnología y la industria alimentaria. (Hames.B.1998)

Palabras Claves:

SDS-PAGE

Metodología:

Para el desarrollo de esta metodología se debe utilizar el equipo Mini-PROTEAN Tetra Cell de BIO-RAD que va a trabajar con geles de poliacrilamida, los geles que se a utilizar son precast (geles prefabricados) tomando en cuenta las indicaciones del fabricante. Para preparar la muestra tomar 5ul de solución proteica y 5 ul de solución laemmli 2x (catalog #161-0737), si la solución laemmli se encuentra en 4x diluir hasta 2x. Colocar Buffer de carga hasta la marca indicada por el equipo, tomando en cuenta cuantos geles se van a colocar. Las muestras de proteína deben pasar por temperatura seca con ayuda de un termobloque a 100°C durante 5 minutos (Neuhoff, V.,Arold, N., Taube, D., & Eharhardt, W. 1988)

Se debe colocar las diferentes muestras de proteína en cada uno de los pocillos del gel, considerando que en uno de los pocillos de debe colocar el estándar de proteína, un marcador de peso molecular para comparar con los resultados Precisión Plus Protein Dual Colors (BIO-RAD Cat #161-0374). Los parámetros para la corrida de los geles se deben tomar dependiendo de las características proteicas a analizar en este caso:

- voltaje: 200
- mA: 400
- Tiempo: 45 minutos

Al finalizar se debe sacar cuidadosamente el gel de su recubierta de plástico, con la ayuda de una espátula metálica para minimizar daños en el gel. El gel debe reposar en una solución de tinción Comassie Brilliant blue R-250 (BIO-RAD Cat. #1610436) durante un minimo de 1hora a una temperatura que no dañe las muestras. Finalmente se debe colocar en una solución decolorante que contenga 25% acido acetico, 25% metanol 50% agua destilada esteril, el tiempo de decoloración se debe establecer por la intensidad del tinte. (Wilson, K.1983)

Observaciones:

- Efecto sonrisa debido a la temperatura de corrida
- Tiempo de tinción y decoloración dependerán de la temperatura y la intensidad de la tinción
- Realizar periodicamente cambios de agente decolorante

Anexo 8.

Protocolo para Buffer de carga TGX 1x

	UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL
	Buffer de carga
Título de Tesis	“BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS PROCEDENTE DE PROTEÍNA RESIDUAL DE PAPA (<i>Solanum Tuberosum</i>) CONTRA FITOPATÓGENOS”
Autor de la Tesis	Andrés Guerrero

Introducción

El buffer TGS (Tris-Glicina-Sulfato) es una solución amortiguadora ampliamente utilizada en electroforesis de proteínas. Esta solución está compuesta por tris(hidroximetil)aminometano (Tris), glicina y sulfato de sodio, que proporcionan un pH estable y óptimo para la separación de proteínas (Sambrook, J., & Russell, D. W. 2001).

El buffer TGS es especialmente útil para la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, ya que ayuda a mantener la estabilidad de las proteínas y a prevenir la degradación durante el proceso de electroforesis (Hames, B. D., & Rickwood, D. 1990).

Palabras Claves:

SDS-PAGE

Metodología:

Para obtener el Buffer de carga Laemmli SDS-PAGE 1x, se debe preparar 250 ml de Buffer TGS 10x, para ello se debe tomar 36.03 g de glicina, 7.57 g de Tris Base y 2.5 g de SDS, se debe disolver y se ajustar el pH a 8.4, tomar 100 ml del Buffer TGS 10x y aforar a 1 000 ml, se ajustó el pH a 8.3 y se obtuvo el Buffer de carga Laemmli SDS-PAGE 1x (Laemmli, 1970).

Observaciones:

- Por la naturaleza de las sustancias se forma espuma en exceso, dejar reposar.

