

COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

POSGRADO DE PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA PROTEOLÍTICO DE *Moniliophthora roreri*
(Cif.) Evans *et al.*, CAUSANTE DE LA MONILIASIS DEL CACAO

CLAUDIA GARCÍA HERNÁNDEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO

2007

La presente tesis, titulada: **Caracterización del sistema proteolítico de *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al., causante de la moniliasis del cacao**, realizada por la alumna: **Claudia García Hernández**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



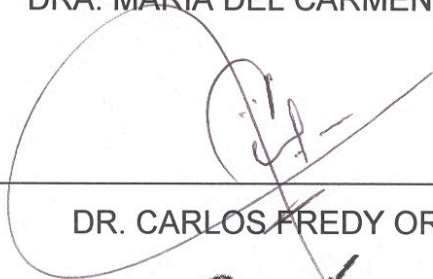
DRA. CONSUELO DEL CARMEN BAUTISTA MUÑOZ

ASESOR:



DRA. MARÍA DEL CARMEN RIVERA CRUZ

ASESOR:



DR. CARLOS FREDY ORTÍZ GARCÍA

ASESOR:



DRA. AÍDA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

H. Cárdenas, Tabasco, 11 de diciembre de 2007

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA PROTEOLÍTICO DE *Moniliophthora roreri*,
CAUSANTE DE LA MONILIASIS DEL CACAO.

Claudia García Hernández, MC.

Colegio de Postgraduados, 2007.

El presente trabajo constituye el primer reporte sobre el estudio del sistema proteolítico del hongo *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao. El trabajo inició con la identificación de la cepa aislada a partir de frutos de cacao infectados. La amplificación y secuenciación de un fragmento del gen 18S rDNA, permitió la identificación molecular de la cepa aislada como *M. roreri*, designada como MRO1. A continuación, se evaluó el crecimiento celular de *M. roreri* en los medios de cultivo líquidos mineral y V8 enriquecido, indicando que en este último se obtiene mayor peso seco en mg mL⁻¹. La determinación de los niveles de las actividades proteolíticas de aspartil proteasa (mrAP), aminopeptidasa (mrAPE), carboxipeptidasa (mrCP) y dipeptidil aminopeptidasa (mrDAP), fue evaluada siguiendo las cinéticas de producción de proteasas desde las 0 hasta las 144h de incubación. Dichas determinaciones se realizaron a partir de extractos enzimáticos obtenidos de la fracción intracelular y extracelular empleando sustratos específicos. En ambos medios ensayados, se encontró actividad enzimática intracelular y extracelular de mrAP, mrAPE, mrDAP y mrCP las cuales podrían participar en diversos eventos celulares, y en el caso específico de las proteasas extracelulares, podrían participar en la fitopatogénesis de *M. roreri*. Los ensayos con diferentes inhibidores específicos, indicaron que es probable que cada una de las actividades enzimáticas de mrAP, mrAPE, mrDAP y mrCP, sean codificadas por múltiples genes, como se ha descrito en otros hongos. Los ensayos de localización subcelular indicaron que a nivel intracelular las enzimas mrAPE y mrDAP se encuentran asociadas mayoritariamente a la fracción citoplásmica, mientras que la mrCP se encuentra asociada mayoritariamente a la fracción membranal, en ambos medios de cultivo.

Palabras clave: *Moniliophthora roreri*, moniliasis, proteasas, proteasas secretadas, metaloproteasas.

CHARACTERIZATION OF THE PROTEOLYTIC SYSTEM OF *Moniliophthora roreri*,
CAUSING FROSTY POD ROT OF COCOA (MONILIASIS DISEASE).

Claudia García Hernández, MC.
Colegio de Postgraduados, 2007.

The present work is the first report on the study of the proteolytic system of the phytopathogenic fungus *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease). The work beginning with the identification of the isolated strain from infected cocoa pods. The amplification and sequencing of a fragment of the gene 18S rDNA, allowed to the molecular identification of the isolated strain as *M. roreri*, designated as MRO1. Later, the cellular growth of *M. roreri* was evaluated in mineral and enriched V8 liquid medium, indicating that in this last, one greater dry weight in mg mL⁻¹ is obtained. The determination of the levels of the proteolytic activities of aspartil protease (mrAP), aminopeptidase (mrAPE), carboxypeptidase (mrCP) and dipeptidil aminopeptidase (mrDAP), was evaluated following the kinetic production of proteases from the 0 to 144 h of incubation. These determinations were made from enzymatic extracts obtained of the intracellular and extracellular fraction using specific substrates. In both tried media, was intracellular and extracellular enzymatic activity in mrDAP mrAP, mrAPE, mrDAP and mrCP, in *M. roreri* which could participate in diverse cellular events, and in the specific case of the extracellular proteases, could participate in the pathogenesis process. The tests with different specific inhibitors indicated that it is probable that each one of the enzymatic activities of mrAP, mrAPE, mrDAP and mrCP, are codified by multiple genes, since has been described in other fungi. The tests of subcellular location indicated that at intracellular level the enzymes mrAPE, mrDAP are associate mainly to the cytoplasmic fraction, whereas mrCP is associate mainly to the membranal fraction, in both means of culture.

Key words: *Moniliophthora roreri*, cocoa, frosty pod rot, proteases, secreted proteases, metalloproteases.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a:

A Dios porque sin él nada soy. Gracias por bendecirme tanto.

Mis tres grandes amores: Rubén, Rubencito y Ricardito, quienes son mi fuente de motivación, y mi alegría todos los días, ustedes me han permitido continuar por este sinuoso camino de la superación. Los amo más que a nadie en el mundo.

Mi amiga más querida: mi hermana Ángeles, mi apoyo incondicional.

Mi padre y mi madre, porque me dieron la vida.

Mi ejemplo en la vida: mi querida tía Lupita por su legado, cariño y por haberme acogido en su familia. Gracias a usted soy quien soy. A mi tío Wacho y mis primos Wicho, Faby, Gabriel y Hugo.

A mis hermanos: César y Jorge porque a pesar de la distancia, la sangre llama.

Mi suegro Dorilián por enseñarme que lo importante es la unidad, mi cuñada María quien me ha facilitado este paso al ayudarme con mis hijos. Mis cuñados: Rubelio, Ramón, Lety, Gina y Olga con quienes comparto mis buenos ratos.

A mis amigos de siempre: Sandra y César quienes a pesar de la distancia nuestra amistad continúa.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme financiado mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco (CP-T) por haberme otorgado un espacio en su recinto.

A todos los profesores que me impartieron cursos y asesoría durante mi estancia en el CP-T. A todos aquellos que me facilitaron el ingreso a sus laboratorios y el uso de sus respectivos equipos.

A la Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz, por su esfuerzo, dedicación, tiempo y el apoyo brindados para la realización de la presente tesis. Mil gracias.

A los integrantes de mi consejo particular: Dr. Carlos Fredy Ortiz García, Dra. María del Carmen Rivera Cruz y Dra. Aída Martínez Hernández por los apoyos brindados y por sus acertados comentarios para la mejora de este escrito.

Al Dr. Xavier M. Boldo por la asesoría prestada en múltiples ocasiones.

A mi esposo Rubén y a mis dos pequeños hijos Rubén y Ricardo por haberme regalado parte de su tiempo, porque solo así pude superar este reto. Mil gracias.

A la Generación 2005-2006 del PROPAT por haber caminado juntos este sendero, especialmente a Yoli, Bertha, Gonzálo, Héctor, Nalle y Manuel.

CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS.	v
INDICE DE FIGURAS.	vi
ABREVIATURAS.	vii
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.	1
I.1 Introducción general.	1
I.2 Objetivo general.	5
I.3 Hipótesis general.	5
I.4 Estructura de la tesis.	5
I.5 Literatura citada	6
CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA.	8
II.1. Generalidades de <i>M. roreri</i>	8
II.2. Técnicas moleculares en el estudio de la clasificación e identificación de hongos.	20
II.3. Generalidades de las proteasas.	24
II.4. Literatura citada.	32
CAPITULO III. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Moniliophthora roreri</i> CAUSANTE DE LA MONILIASIS DEL CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L).	38
III.1. Introducción.	38
III.2. Materiales y métodos.	39
III.3. Resultados y discusión.	43
III.4. Conclusión.	49
III.5. Literatura citada.	49

CAPITULO IV. PROTEASAS ESPECÍFICAS E INESPECÍFICAS DEL HONGO <i>M. royeri</i>: DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES ENZIMÁTICOS, LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y EFECTO DE INHIBIDORES ESPECÍFICOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO.	51
IV.1. Introducción.	51
IV.2. Materiales y métodos.	53
IV.3. Resultados y discusión.	61
IV.4 Conclusiones.	92
IV.5 Literatura citada.	93
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES.	99
V.1. Conclusiones.	99
V.2. Recomendaciones.	100
ANEXOS	101

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Proteasas producidas por hongos fitopatógenos.	29
Cuadro 2. Porcentaje de similitud de la secuencia antisentido de un fragmento del gen 18S rDNA de MRO1 con los parientes más próximos.	47
Cuadro 3. Inhibidores específicos de proteasas y las actividades proteolíticas de mrAPE, mrDAP, mrCP y mrAP de <i>M. royeri</i> ensayadas.	60
Cuadro 4. Inhibidores específicos de proteasas y las concentraciones utilizadas sobre las actividades proteolíticas de mrAPE, mrDAP, mrCP y mrAP de <i>M. royeri</i>	61
Cuadro 5. Actividad enzimática específica de proteinasa mrAP intracelular y extracelular en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.	63
Cuadro 6. Efecto de la pepstatina A sobre la actividad de proteinasa mrAP intracelular y extracelular de un cultivo de 144 h en medio mineral y V8 enriquecido.	65
Cuadro 7. Actividad enzimática específica de mrAPE intracelular y extracelular de <i>M. royeri</i> crecido en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.	66
Cuadro 8. Actividad enzimática específica de mrAPE en la fracción citoplásmica y membranal de <i>M. royeri</i> crecido en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.	68
Cuadro 9. Efecto de la bestatina, 1-10, fenantrolina y EDTA sobre la actividad de proteinasa mrAPE intracelular y extracelular de un cultivo de 144 h en medio mineral y V8 enriquecido.	71
Cuadro 10 Actividad enzimática específica de mrDAP intracelular y extracelular de <i>M. royeri</i> crecido en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.	72
Cuadro 11 Actividad enzimática específica de mrDAP en la fracción citoplásmica y membranal de <i>M. royeri</i> crecido en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.	74
Cuadro 12 Efecto del pefabloc, 1-10, fenantrolina y EDTA sobre la actividad de proteinasa mrDAP intracelular y extracelular de un cultivo de 144 h en medio mineral y V8 enriquecido.	77

Cuadro 13	Actividad enzimática específica de mrCP intracelular y extracelular de <i>M. roreri</i> crecido en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral. ...	78
Cuadro 14	Actividad enzimática específica de mrCP en la fracción citoplásmica y membranal de <i>M. roreri</i> crecido en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.	80
Cuadro 15	Efecto de inhibidores específicos de proteasas sobre la actividad enzimática específica de mrCP intracelular y extracelular de un cultivo de 144 h en medio mineral y V8.	82

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Proceso de infección de mazorcas de <i>Theobroma cacao</i> L. infectadas con <i>M. royeri</i>	13
Figura 2.	Síntomas internos: descomposición de tejidos.	14
Figura 3.	Amplificación por PCR del gen 18S rDNA de la cepa MRO1 de <i>M. royeri</i> , aislada de mazorcas infectadas.	44
Figura 4.	Secuencia nucleotídica de 254 pb del gen 18S rDNA de la cepa MRO1 de <i>M. royeri</i> , aislada de mazorcas infectadas.	45
Figura 5.	Secuencia nucleotídica de 441 pb del gen 18S rDNA de la cepa MRO1 de <i>M. royeri</i> , aislada de mazorcas infectadas.	45
Figura 6.	Relaciones de similitud de las secuencias nucleotídicas del gen 18S rDNA de la cepa MRO1 aislada de frutos de cacao y las secuencias nucleotídicas de los genes 18S rDNA de diferentes hongos.	48
Figura 7.	Crecimiento celular de <i>M. royeri</i> mediante la determinación de la proteína total del hongo cultivado en los medios V8 enriquecido y mineral.	62
Figura 8.	Crecimiento celular de <i>M. royeri</i> mediante la determinación de la biomasa del hongo cultivado en los medios V8 enriquecido y mineral..	62
Figura 9.	Cinética de producción de la proteínasa mrAP intracelular y extracelular de <i>M. royeri</i> en el medio de cultivo mineral. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en U mg ⁻¹ de Proteína total.	64
Figura 10.	Cinética de producción de la proteínasa mrAP intracelular y extracelular de <i>M. royeri</i> en el medio de cultivo V8 enriquecido. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en U mg ⁻¹ de Proteína total.	64
Figura 11.	Cinética de producción de mrAPE intracelular y extracelular de <i>M. royeri</i> en el medio de cultivo mineral. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en U mg ⁻¹ de Proteína total.	67
Figura 12.	Cinética de producción de mrAPE intracelular y extracelular de <i>M. royeri</i> en el medio de cultivo V8 enriquecido. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en U mg ⁻¹ de Proteína total.	67

Figura 13. Localización celular de la actividad enzimática específica de mrAPE en la fracción citoplásmica y membranal de <i>M. roreri</i> , cultivado en el medio de cultivo mineral a las 144 h de incubación. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en U mg ⁻¹ de Proteína total.	69
Figura 14. Localización celular de la actividad enzimática específica de mrAPE en la fracción citoplásmica y membranal de <i>M. roreri</i> , cultivado en el medio de cultivo V8 enriquecido a las 144 h de incubación. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en U mg ⁻¹ de Proteína total.	69
Figura 15. Cinética de producción de mrDAP intracelular y extracelular de <i>M. roreri</i> en el medio de cultivo V8 enriquecido. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en U mg ⁻¹ de Proteína total.	73
Figura 16. Cinética de producción de mrDAP intracelular y extracelular de <i>M. roreri</i> en el medio de cultivo mineral. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en U mg ⁻¹ de Proteína total.	73
Figura 17. Localización celular de la actividad enzimática específica de mrDAP en la fracción citoplásmica y membranal de <i>M. roreri</i> , cultivado en el medio de cultivo mineral a las 144 h de incubación. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en U mg ⁻¹ de Proteína total.	75
Figura 18. Localización celular de la actividad enzimática específica de mrDAP en la fracción citoplásmica y membranal de <i>M. roreri</i> , cultivado en el medio de cultivo V8 enriquecido a las 144 h de incubación. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en U mg ⁻¹ de Proteína total.	75
Figura 19. Gel de actividad enzimática de mrDAP, a partir de la fracción intracelular de <i>M. roreri</i> cultivado en el medio V8 enriquecido durante 144 h de incubación. La actividad enzimática de mrDAP fue detectada en condiciones nativas con el sustrato Ala-Pro-β-NphA y Fast Garnet para revelar la actividad.	76
Figura 20. Cinética de producción de mrCP intracelular y extracelular de <i>M. roreri</i> en el medio de cultivo V8 enriquecido. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en U mg ⁻¹ de Proteína total.	79
Figura 21. Cinética de producción de mrCP intracelular y extracelular de <i>M. roreri</i> en el medio de cultivo V8 enriquecido. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en U mg ⁻¹ de Proteína total.	79

Figura 22. Localización celular de la actividad enzimática específica de mrCP en la fracción citoplásmica y membranal de <i>M. roreri</i> , cultivado en el medio de cultivo mineral a las 144 h de incubación. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.	81
Figura 23. Localización celular de la actividad enzimática específica de mrCP en la fracción citoplásmica y membranal de <i>M. roreri</i> , cultivado en el medio de cultivo V8 enriquecido a las 144 h de incubación. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.	81
Figura 24. Cinéticas de producción de proteasas mrAP, mrAPE, mrDAP y mrCP intracelular y extracelular de <i>M. roreri</i> en el medio de cultivo V8 enriquecido. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.	83
Figura 25. Cinéticas de producción de proteasas mrAP, mrAPE, mrDAP y mrCP intracelular y extracelular de <i>M. roreri</i> en el medio de cultivo mineral. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.	84

ABREVIATURAS

A: Adenina.

Ala-Pro-p-NA: Alanina-Prolina-para-Nitroanilida.

C: Citosina.

EDTA: Ácido etilendiamino tetracético.

G: Guanina.

Lys-p-NA: Lisina-para-Nitroanilida.

kb: kilobase.

mrAP: Actividad proteolítica de *M. roreri* sobre el sustrato hemoglobina desnaturalizada a pH ácido.

mrAPE: Actividad proteolítica de *M. roreri* sobre el sustrato Lys-p-NA.

mrCP: Actividad proteolítica de *M. roreri* sobre el sustrato Ala-Pro-p-NA.

mrDAP: Actividad proteolítica de *M. roreri* sobre el sustrato N-Bz-L-Tir-p-NA.

Umg⁻¹: Actividad específica en unidades por miligramo de proteína.

mL: mililitro.

μL: microlitro.

N-Bz-L-Tir-p-NA: Benzoil-L-Tirosina-para-Nitroanilida.

pb: Pares de bases nucleotídicas del DNA.

SDS: Lauril sulfato de sodio.

T: Timina.

Tris-HCl: Trishidroximetil-aminometano-HCl.

YNB: Base nitrogenada de levaduras.

PMSF: Fenilmetanosulfonil fluoruro.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN.

I.1 INTRODUCCIÓN GENERAL.

El cacao (*Theobroma cacao* L.) pertenece a la familia Sterculaceae y es la única especie cultivada comercialmente; sus granos secos se emplean para la producción de chocolate y la extracción de manteca de cacao. Está ampliamente distribuido en 57 países de las regiones tropicales húmedas del mundo. La producción mundial de cacao para el ciclo 2005/2006 fue de 3.6 millones de toneladas con un aumento un 6% respecto al ciclo anterior. Los diez principales países productores son Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún en el oeste de África, Brasil, Ecuador y Colombia en América del Sur; además de Indonesia, Malasia y Papúa Nueva Guinea en el sureste Asiático (ICCO, 2007). El mercado de grano seco fermentado es un mercado libre regido por la ley de la oferta y la demanda, razón por la cual sufre de fuertes variaciones de precio de un año al otro.

La importancia actual del cacao en México se basa en que es el primer país que cultivó esta especie de *Theobroma*, ya que los Mayas lo introdujeron desde su centro de origen, en la selva tropical húmeda del alto Amazonas, a Mesoamérica antes de la llegada de los españoles (Cuatrecasas, 1964).

Existen diversos factores que limitan el cultivo del cacao, entre los cuales se encuentran: la edad avanzada de las plantaciones, la edad avanzada de los productores, el bajo manejo agronómico del cultivo y la presencia de plagas y enfermedades, las cuales provocan pérdidas consideradas de importancia económica (López, *et al.*, 1996). Entre las enfermedades presentes en Tabasco, actualmente la moniliasis del cacao causada por el hongo *Moniliophthora roreri* Cif. Evans *et al*, que es de reciente ingreso a México, está considerada como uno de los problemas fitosanitarios más destructivos del cual se tiene memoria en el agrosistema cacao. Su presencia en distintos países del Sur y Centro América, ha causado serios daños a la producción y ha propiciado el cambio del uso del suelo (Phillips-Mora, 2004).

El primer reporte de la moniliasis en México fue señalado en marzo de 2005, sin embargo, se cree que la llegada de la enfermedad se dio desde el año anterior (Phillips-Mora *et al.*, 2006). Esta enfermedad se encuentra distribuida en la mayoría de las comunidades productoras de cacao de los 10 municipios cacaoteros de Tabasco (Ortiz *et al.*, 2006) Algunos autores han informado que la moniliasis es dos veces más destructiva que la mazorca negra (*Phytophthora* spp.) (Desrosiers y Suárez, 1974), más dañina (Orellana, 1954) y más difícil de controlar que la escoba de bruja (Aránzazu, 2000). En Colombia, donde las tres enfermedades mencionadas están presentes en casi todas las áreas cacaoteras, Aránzazu (2000) indica que la moniliasis continúa siendo la enfermedad más importante en el país. Esta enfermedad bien manejada produce pérdidas del 30%, sin embargo, en condiciones favorable las pérdidas ascienden al 100% (Phillips-Mora, 2004).

El control de esta enfermedad se basa en dos estrategias fundamentales, una es la reducción del inóculo de la plantación realizada mediante podas fitosanitarias y el manejo de mazorcas enfermas eliminadas de la plantación, la otra es complementar esta con el manejo de condiciones ambientales con el fin de mantener en las plantaciones de cacao condiciones desfavorables para la presencia de la enfermedad (Mújica *et al.*, 2007). Para conseguir lo anterior, se realizan prácticas culturales de reducción de la altura de plantas, reducción del nivel de sombra, mantenimiento del drenaje y el control de la maleza, (Phillips-Mora, 2004; Arévalo *et al.*, 2000). El control químico como estrategia única de manejo no ha sido económicamente rentable; la resistencia genética y el control biológico requieren aún de estudios para tener alternativas viables para establecer un manejo integrado más eficiente (Phillips-Mora, 2004). Sin embargo, los resultados al término de la cosecha dependen de la oportunidad con que se realizó dicho manejo.

La moniliasis constituye un factor importante de infección en las plantaciones de cacao, debido a que los seres humanos son los agentes más efectivos de diseminación a largas distancias, dado que el hongo está muy bien adaptado a este método indirecto de diseminación (Evans, 1986), aunado a que sobre las plantaciones afectadas, existe

una presencia permanente de esporas de *M. rozeri*, flotando en el aire, por lo que la infección de los frutos puede ocurrir en cualquier momento mientras exista tejido susceptible y condiciones ambientales favorables. La regulación del microambiente ha sido una de las prácticas más recomendadas para el combate de la moniliasis (Phillips-Mora, 2004).

Los esfuerzos principales para evitar la dispersión de la infección hacia áreas nuevas, deben enfatizar la educación de la población sobre el reconocimiento de la enfermedad, así como los riesgos que tienen la movilización de materiales de cacao de un sitio a otro (Meléndez y Somarraba, 1999).

Caracterizar el sistema proteolítico de *M. rozeri* es de importancia debido al papel que juegan las proteasas, que son enzimas que hidrolizan proteínas y polipéptidos, lo que da como resultado la producción de péptidos más pequeños y aminoácidos. (Hirsch *et al.*, 1989). La proteólisis juega un papel clave en el control de diversas funciones fisiológicas, como la digestión de proteínas, maduración de hormonas, respuesta inmune, inflamación, coagulación, fertilización, germinación y otros procesos morfogénicos (Holzer y Heinrich, 1988). Algunas proteasas juegan un papel importante en la esporulación, la germinación, la patogenicidad de diversos microorganismos y pueden participar en la regulación post-traducciona (Yuan y Cole, 1989; Vartivarian, 1992; White y Agabian, 1995 y Suárez *et al.*, 1981).

Tomando en consideración la importancia de las proteínas como enzimas, así como constituyentes de las membranas celulares y como componentes estructurales de las células vegetales, su degradación por enzimas proteolíticas, que son secretadas por los fitopatógenos, afecta considerablemente la organización y el funcionamiento de las células hospedantes (Agrios, 1998). Así, el conocer las proteasas endógenas del hongo *M. rozeri*, permitirá inferir la participación de dichas proteasas durante la fitopatogénesis.

Por lo anterior, en el presente trabajo se planteo como objetivo general caracterizar al hongo *M. roreri* agente causal de la moniliasis en cacao, a través de su identificación molecular y de la caracterización bioquímica de sus proteasas, para lo cual, la investigación se inició con la identificación molecular de la cepa MRO1 del hongo aislado a partir de mazorcas de cacao con síntomas de moniliasis, provenientes de una plantación de cacao, localizada en Pichucalco, Chiapas.

Se comparó la secuencia de un fragmento del gen 18S rDNA de la cepa MRO1, con las secuencias de DNA de genes 18S rDNA de hongos relacionados depositadas en la base de datos de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Se realizaron cuatro ensayos en los medios mineral y V8 enriquecido, primero se determinó la producción de biomasa de *M. roreri*, para construir las curvas de crecimiento celular, el cual fue reportado como mg de peso seco mL⁻¹.

Posteriormente, en el segundo ensayo se siguieron las cinéticas de producción de proteasas a las 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h de incubación, para determinar los niveles de las actividades proteolíticas de aspartil proteasa (mrAP), aminopeptidasa (mrAPE), carboxipeptidasa (mrCP) y dipeptidil aminopeptidasa (mrDAP), en la fracción intracelular y extracelular, obteniéndose así la actividad enzimática específica.

En un tercer ensayo se determinó la localización subcelular de las proteasas, para lo cual se obtuvo un sobrenadante y precipitado que corresponden a la fracción soluble o citoplasma y la fracción membranal, respectivamente. Finalmente, en el cuarto ensayo, las actividades enzimáticas de mrAPE, mrDAP, mrCP y mrAP de *M. roreri*, fueron probadas con diferentes inhibidores de proteasas como el EDTA, pefabloc SC, 1-10, fenantrolina, pepstatina A, bestatina y PMSF.

La actividad enzimática específica (Umg⁻¹ de Proteína total), fue reportada en combinación con la proteína total, contenida en el extracto enzimático de los medios de cultivo.

I.2 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar al hongo *Moniliophthora roreri* agente causal de la moniliasis en cacao, a través de su identificación molecular y de la caracterización bioquímica de sus proteasas.

I.3 HIPÓTESIS GENERAL.

Moniliophthora roreri se encuentra infectando plantaciones de cacao y puede ser diagnosticado mediante pruebas moleculares. Debe haber proteasas porque se requieren para procesos biológicos fundamentales, y éstas pueden estar implicadas en su proceso de patogénesis.

1.4 ESTRUCTURA DE LA TESIS.

El presente trabajo está organizado en cinco capítulos, en el CAPITULO I se hace una introducción general y se describen los objetivos e hipótesis generales perseguidos en el trabajo. En el CAPITULO II se presenta la revisión de literatura presentando las generalidades de *M. roreri*, los principios de la PCR como herramienta de estudio en la clasificación e identificación de hongos y generalidades sobre las proteasas. En el CAPÍTULO III: Identificación molecular de *M. roreri* causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L), se describen las metodologías empleadas para la identificación molecular de *M. roreri*. En el CAPÍTULO IV: Proteasas específicas e inespecíficas del hongo *M. roreri*: determinación de los niveles enzimáticos, localización subcelular y efecto de inhibidores específicos bajo diferentes condiciones de crecimiento, se describen las metodologías empleadas para determinar la localización celular de las proteasas encontradas en los experimentos realizados, así como el efecto de los diferentes inhibidores ensayados. Por último, se muestran las conclusiones generales y las recomendaciones derivadas de los diferentes ensayos realizados en el presente trabajo.

I.5 LITERATURA CITADA.

- Agrios, G. N. 1998. Fitopatología. 3a edición. Editorial Limusa, México. 493-515.
- Aime, M. C. y Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot on cocoa (chocolate *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*. 97: 1012-1022.
- Arévalo, G. E., L. B. Zúñiga, C., C. E. Arévalo, A y J. Alcázar, A. 2004. Cacao: Manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la amazonia Peruana, ICT. Tarapoto, Perú. 184 pp.
- Aránzazu. F, 2000. La escoba de Bruja en Colombia su impacto y manejo. *In: Tecnologías para el mejoramiento del sistema de producción del cacao*. Mejía L.A. y C. Arguello (eds). Bucaramanga, Colombia. CORPOICA, 144 p.
- Cuatrecasas, J. 1964. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contr. U.S. National Herb.* 35: 379-614.
- Desrosiers, R. y C. Suarez. 1974. Monilia pod rot of cacao. *In* P.H. Gregory (ed.). *Phytophthora diseases of cacao*. Longman Group Ltd. London, UK. pp. 273-277.
- Evans, H. C. 1986. A reassessment of *Moniliophthora* (Monilia) pod rot of cocoa. *Cocoa Growers' Bulletin* 37: 34-43.
- Hirsch, H. H., P. Suárez-Rendueles, and D. H. Wolf. 1989. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) proteinases: Structure, characteristics and functions, p. 134-200. *In*: E. F. Walton, and G. T. Yarranton (ed), *The molecular and cell biology of yeasts*, Blackie & Sons Ltd., London.
- [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
- Holzer H y P. C. Heinrich. 1988. Control of proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 63-91.
- ICCO (International Cocoa Organization). 2007. Informe anual 2005/2006. *In*: http://www.icco.org/pdf/An_report/anrep0506spanish.pdf.
- Meléndez, L. y Somarraba, E. 1999. Microambiente y cantidad de esporas de *Moniliophthora roreri* en el aire bajo tres sistemas de sombra leguminosa en cacao. *Agroforestería de las Américas*.23:39-41.
- Mújica, J. J., U. Barón, D, Y. Cano, G. 2007. Manejo productivo del cacao con énfasis en el control de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif y Pa) Evans *et al.*) en el departamento de Santander. FEDECACAO-ICA. Colombia 24p.

- Ortiz G., C.F., V. Córdova A., P. A. López A., P. Ruíz B., R. Nuñez B., W. Méndez A., M. I. Zetina L., F. Zermeño D., S.P. Martínez S. 2006. Situación actual de la moniliasis del cacao en Tabasco a un año de su diagnóstico. *In: Memoria de la XX reunión científica tecnológica forestal y agropecuaria Tabasco.* (Báez Ruíz, U. A. D. C. Sánchez D., N. C. López A., F. A. Báez C. (eds.) Villahermosa, Tab., México. 16-17 de noviembre 2006. UACH (Ed.) pp 361-368.
- Orellana, RG. 1956. La moniliasis y otras enfermedades del cacao en el este de Panamá. *Boletín fitosanitario de la FAO.* 4: 168-169.
- Phillips-Mora, W. 2004. La moniliasis del cacao: una seria amenaza para el cacao en México. *In: Memoria del Simposio Nacional de Manejo Fitosanitario de Cultivos Tropicales.* Martínez B, L., Ortiz G, C.F. (eds.). Tabasco, México.2004. UACH. pp 91-99.
- Phillips-Mora, W., Castillo, J., Krauss, U., Rodríguez, E. y Wilkinson, J. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology.* 54: 483-490.
- Phillips-Mora, W., Coutiño, A. Ortiz, C. F., López, A. P., Hernández, J. y Aime, M. C. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology.* 55: 584.
- Suárez-Rendueles, M. P., J. Schwencke, N. García-Alvarez y S. Gascon. 1981. A new X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from yeast associated with a particulate fraction. *FEBS letters.* 131:296-300.
- Vartivarian S. E. 1992. Virulence properties and non immune pathogenic mechanism. *Clin. Infect. Dis.* 14: 30-36.
- White C. y N. Agabian. 1995. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by environmental factors. *J. Bacteriol.* 177: 5215-5221.
- Yuan L. y G. T. Cole. 1989. Characterization of proteinase inhibitors isolated from fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *J. Biochem.* 257: 729-736.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA.

II.1. Generalidades de *M. roreri*.

II.1.1. Descripción morfológica del cultivo de *M. roreri in vitro*.

M. roreri, crece lentamente sobre agar extracto de malta. Las colonias alcanzan un diámetro de 8-15 mm después de dos semanas, y muestran un borde levemente levantado. El crecimiento en forma de tapete de aspecto lanoso a fieltro, de color salmón pálido a rosa beige, finalmente se vuelve de color beige canela a arcilla, o localmente café lanoso a chabacano pálido. Ocasionalmente, el tapete es de inicio suave a farináceo, de color blanco a crema o con matices ocráceos. No produce olor. En la zona avanzada, la hifa es hialina, de pared delgada, septada y algunas veces es levemente irregular con hinchamientos de 1.5- 5 micras de ancho. La hifa aérea es de dos tipos: a) como en la zona avanzada, pero con paredes levemente engrosadas, y b) hialina densa de color parduzco pálido, no septado de 1-1.5 y 2-3 micras de ancho y el esqueleto raramente ramificado (Evans *et al.*, 1978).

Los conidióforos ramificados dan lugar a cadenas maduras de conidios. Los conidios son fácilmente separables, de paredes gruesas, color amarillo pálido y de color café en masa, típicamente globosa a subglobosa, de 6.5-8.0 y de 15-25 micras de diámetro, algunas veces elipsoides de 8-20 x 5-14 micras, paredes arriba de dos micras de grosor. Los conidios cilíndricos de paredes delgadas también están presentes y probablemente se derivan a partir de cadenas inmaduras. Las hifas se sumergen como en la zona avanzada pero con hinchamientos más frecuentes. El hongo también crece y esporula bien sobre tallos leñosos esterilizados con pérdidas significantes de peso del sustrato; grumos de color crema compactos, de micelio estéril con gotitas de exudado amarillo que se forman frecuentemente y los parches rojo púrpura compuestos de hifas rojas pesadamente incrustadas que están presentes en los cultivos viejos. Las temperaturas de crecimiento óptimas son de 25 a 26°C y máximo 33°C (Evans *et al.*, 1978).

II.1.2. Descripción morfológica del cultivo de *M. royeri* in vivo.

Los conidios en germinación, son capaces de penetrar la epidermis de las mazorcas (Figura 1-a) de cacao en alguna etapa del desarrollo. Estas hifas invaden el tejido intercelularmente creciendo entre las células del parénquima cortical en forma de características hifas hinchadas de 4-7 μ m de diámetro, enroscadas o grumosas. Las mazorcas jóvenes pueden desarrollar hinchamientos pronunciados (Figura 1-b), pero los síntomas pueden estar totalmente ausentes hasta la formación de la lesión, que va de 45-90 días después de la penetración (Figura 1-c). Esta puede ser considerada como la fase biotrófica (Evans *et al.*, 1977).

La fase necrotrófica (la cual puede ser precedida por maduración organoléptica prematura e irregular), desarrolla rápidamente lesiones irregulares de apariencia chocolate a café oscuro, mismas que se unen gradualmente hasta cubrir la superficie entera de las mazorcas infectadas. En una etapa tardía, predominan hundimientos limitados y lesiones de color café oscuro. Un pseudostroma de color blanco a crema, crece sobre la superficie de la mazorca de 3 a 8 días después del inicio de la lesión y pronto se cubre con una densa capa polvorienta de esporas florecientes, que gradualmente cambian a gris, canela o café (Figura 1-f)(Evans *et al.*, 1978). Este cambio de color, parece estar asociado con el engrosamiento de la pared conidial, capacitando a la espora para sobrevivir a la desecación y reteniendo a la infectividad por periodos prolongados (Evans *et al.*, 1977).

Los síntomas internos varían con la edad y variedad de la mazorca. Los tejidos en la cámara de los granos pueden ser recolocados y desorganizados por sustancias acuosas o gelatinosas (Figura 2), de aquí proviene el nombre de pudrición acuosa de la mazorca, pero en otros casos hay una sobreproducción o compactación de tejidos, resultando solamente en una pudrición húmeda o seca. A menudo, los granos se pegan unos a otros, así como a la pared interna de la mazorca, haciendo difícil su remoción. Un pseudostroma grueso de color crema, cubre los tejidos nuevamente expuesto en 2 o 3 días e imparte un olor de moho parecido al de los champiñones (Evans *et al.*, 1978).

II.1.3. Conidiogénesis y estructura septal.

Los intentos por observar la conidiogénesis del hongo, a través de estudios en diferentes lapsos de tiempo, fracasaron debido al lento crecimiento del hongo en cultivo. Sin embargo, observaciones en el microscopio de luz y microscopio electrónico de barrido, indican que la célula conidiógena, es inicialmente diferenciada a partir de una hifa vegetativa, iniciando por el hinchamiento del ápice y el desarrollo del conidio holoblástico primario. Después de la diferenciación del conidio primario, un segmento de la hifa fértil bajo su septum basal a menudo se engrosa y diferencia en el próximo propágalo (Evans *et al.*, 1978).

Todas las conidias son formadas de la misma manera, dando como resultado la formación de una cadena de conidios basipetalicamente madura. Con el tiempo, los conidios tienden a ser redondos por fuera y las paredes se engrosan. Las cadenas generalmente consisten de 4-10 conidias envueltas dentro de la pared de la célula conidiógena original. Las conidias son subsecuentemente liberadas por fractura de la pared celular. Después de la sucesión conidial, restos de paredes pueden estar adheridos a la conidia (Evans *et al.*, 1978). El micelio vegetativo, contiene septos con doliporos típicos como ha sido previamente reportado con hifas de basidiomicetos (Girbardt, 1958; Moore y McAlear 1962).

II.1.4. Nomenclatura y taxonomía.

El agente causal de la moniliasis fue identificado por Smith en 1918, como una especie del género *Monilia*. Ciferri y Parodi en 1933, revisaron la taxonomía del hongo y confirmaron la identificación temporal hecha por Smith, clasificando al hongo dentro de la clase Deuteromycetes, orden Hyphales, género *Monilia* y especie *roreri*. Evans *et al.*, (1978) observaron la presencia de características morfológicas típicas de los Basidiomicetes, por lo que propusieron su agrupación dentro de este grupo y crearon un nuevo nombre para denominar la especie: *Moniliophthora roreri* (Evans *et al.*, 1978).

La ausencia de estructuras sexuales en el hongo impidió una clasificación taxonómica más exhaustiva por casi 25 años. Usando técnicas moleculares, Phillips-Mora (2003), recientemente confirmó que el hongo es un Basidiomicete y determinó que pertenece al orden de los Agaricales y probablemente a la familia Tricholomataceae. Además, también demostró que este hongo es muy cercano genéticamente a *Crinipellis perniciososa*, agente causal de la escoba de bruja. Evans *et al.*, (2002) recientemente propusieron que el nombre *Moniliophthora roreri* debía ser cambiado a *Crinipellis roreri* (Evans *et al.*, 2002); sin embargo, es necesario realizar algunos estudios complementarios para confirmar la validez de este cambio.

En la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov), se encuentra disponible la clasificación taxonómica que se indica a continuación:

Súper reino:	Eukaryota
Reino:	Fungi/grupo Metazoa
Subreino:	Dikarya
Phylum:	Basidiomycota
Clase:	Agaricomycetes
Subclase:	Agaricomycetidae
Orden:	Agaricales
Familia:	Tricholomataceae
Género:	<i>Moniliophthora</i>
Especie:	<i>roreri</i>
Sinónimo:	<i>Crinipellis roreri</i> var. <i>roreri</i>

II.1.5. Síntomas de la infección.

Los frutos, son los únicos órganos que pueden ser infectados naturalmente por *M. roreri*. La infección, normalmente ocurre cuando estos son jóvenes, y se tornan más resistentes cuando maduran. Las esporas se depositan sobre el fruto, germinan si hay agua o mueren por la radiación/desecación. El período de incubación es largo, generalmente mayor a un mes. El daño se extiende internamente conforme los frutos

crecen, y posteriormente, el organismo emerge a la superficie para esporular. Algunos frutos que están muy dañados internamente, a veces no muestran evidencias externas de la enfermedad (infecciones ocultas) (Figura 1-e), pero pueden ser reconocidos porque pesan más, debido a que están llenos de agua por la descomposición interna que sufren (Phillips-Mora, 2004).

Los **síntomas externos** de la enfermedad (Figura 1), inician con la aparición de pequeños puntos aceitosos (Figura 1-c) sobre los frutos de 30-45 días de edad. Estos puntos usualmente no son detectados hasta que incrementan su tamaño, formando manchas necróticas (manchas chocolate) (Figura 1-d) aproximadamente a los 75 días después de la infección (Merchán, 1981). Otros síntomas iniciales son la deformación o la muerte de frutos pequeños, la cual en algunos casos se puede confundir con la muerte fisiológica de los mismos. También es frecuente que algunas mazorcas en diferentes estados de desarrollo, presentan una maduración prematura en toda o en parte de su superficie (Phillips-Mora, 2004).

Aproximadamente 4-5 días después de la aparición de las manchas chocolate, sobre estas se observan los signos del hongo que se caracterizan por la presencia de un micelio blancuzco que se va tornando un poco más oscuro conforme las esporas maduran. Durante las semanas siguientes, los frutos se deshidratan y momifican gradualmente (Figura 1-f) (Phillips-Mora, 2004).

En el caso de los **síntomas internos**, el hongo produce una necrosis progresiva de los tejidos internos (Figura 2). En los estados avanzados de la enfermedad, el interior de los frutos (los tejidos centrales, la pulpa, las semillas), forma una sola masa compacta acuosa que es difícil de distinguir en sus partes originales. Sin embargo, dependiendo del momento en que los frutos fueron infectados, las semillas podrían presentar un mayor o menor nivel de deterioro (Phillips-Mora, 2004).

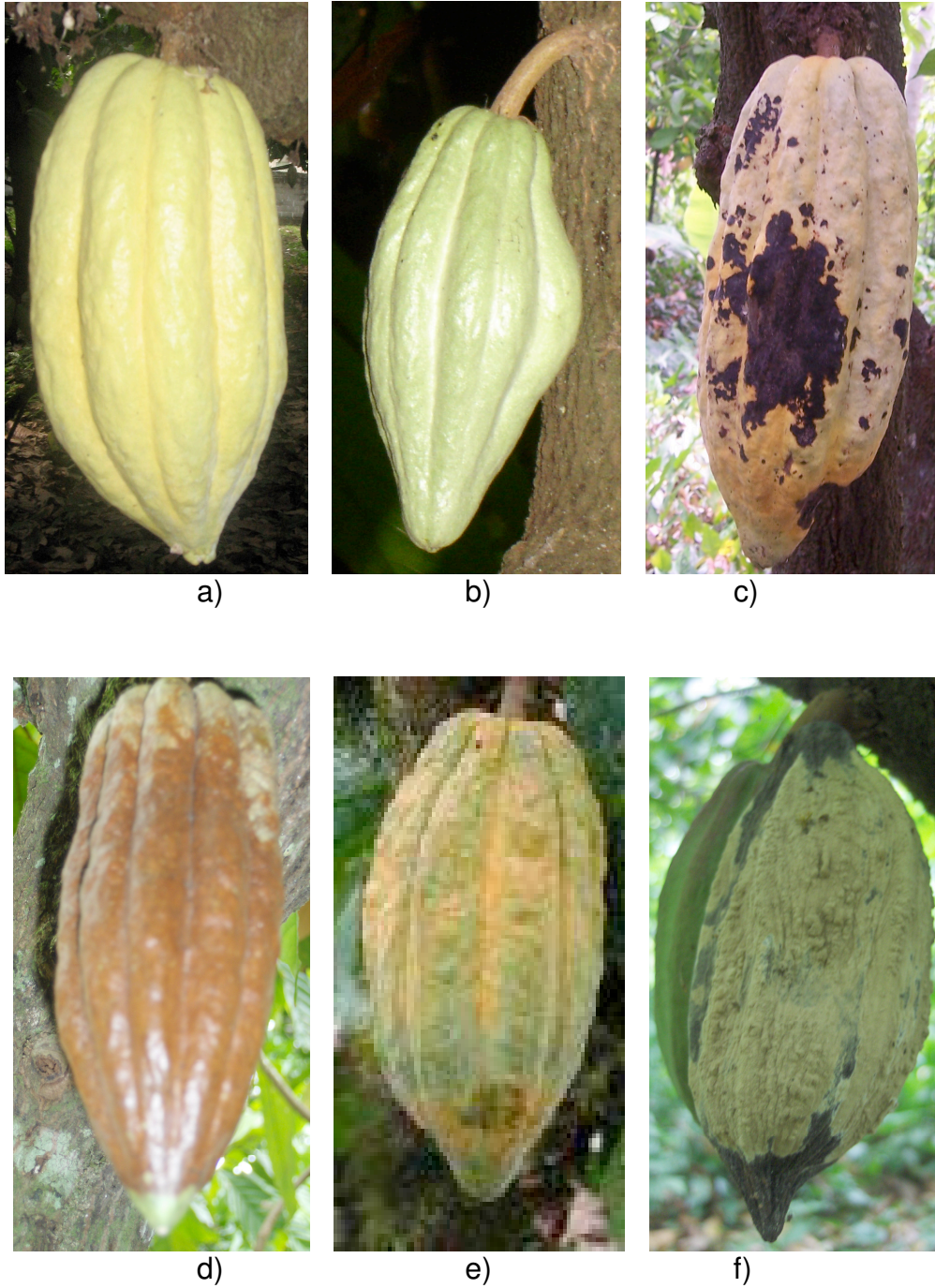


Figura 1. Proceso de infección de mazorcas de *Theobroma cacao* L. infectadas con *M. roreri*: a) Mazorca sana, b) Gibas o abultamientos sobre el fruto (infecciones tempranas). c) Puntos aceitosos pequeños que crecen hasta formar manchas de bordes irregulares. d) Madurez prematura (infecciones tardías). e) Manchas chocolate. f) Esporulación del hongo sobre las manchas.



Figura 2. Síntomas internos: descomposición de tejidos.

II.1.6. Disponibilidad de tejido susceptible.

El período de mayor susceptibilidad de los frutos a ser infectados por *M. roreri*, ocurre en las primeras cuatro quincenas de edad, cuando los frutos aún se encuentran tiernos; sin embargo, siguen susceptibles hasta cerca de los tres meses de edad. La incidencia de la infección, depende no solo de la cantidad de frutos jóvenes y sazones, sino que más bien esta cantidad depende, inversamente, de la incidencia previa de moniliasis y de otras enfermedades (Porrás y González, 1984).

II.1.7. Fuente de inóculo.

Las esporas son los únicos propágulos infectivos de *M. roreri*, y los frutos, los únicos órganos capaces de ser naturalmente infectados por ellas. Después de un período de aproximadamente tres meses, los frutos enfermos se secan pero permanecen unidos al tronco por largo tiempo. Estos frutos, conocidos como “momias”, son la principal fuente de inóculo y son las responsables de las nuevas infecciones entre los ciclos de producción del cacao (Phillips-Mora, 2004).

Las esporas se producen abundantemente sobre los frutos enfermos, en cantidades que alcanzan 44 millones de esporas/cm² (Campuzano, 1981, citados por Phillips-Mora, 2004). Así, un fruto de tamaño adulto, puede producir más de 7,000 millones de esporas. Los frutos infectados pueden producir varios ciclos de esporulación. Inclusive las momias en el árbol o sobre el suelo son capaces de esporular aún cuando estén muy cerca de su descomposición (Ram, 1989, citado por Phillips-Mora, 2004).

Después de su liberación, un considerable número de esporas se depositan sobre las copas de los árboles, el tronco, las yemas florales y aún las plantas epifitas, de donde pueden infectar a los frutos sanos (Ram, 1989, citado por Phillips-Mora, 2004). Los frutos infectados pueden producir varios ciclos de esporulación. Aparentemente las esporas en el suelo o sobre mazorcas en el suelo, no sobreviven más de tres meses debido a que son invadidos por microorganismos (González, 1981, citado por Phillips-Mora, 2004).

Porras y González (1984), reportaron que la infección de los frutos tiernos por *M. roleri*, está asociada con un clima húmedo, lluvia y un balance calórico (precipitación/brillo solar) de alto valor, y también por una alta población de conidios en el medio. Los análisis estadísticos indicaron una correlación altamente significativa y positiva de la incidencia mensual de la moniliasis con la humedad relativa mínima y general ($r=0.6958$ y $r=0.6117$, respectivamente), con el número de frutos removidos con síntomas ($r=0.5156$) y significativa con la precipitación ($r=0.3793$). Esto sugiere que el ambiente saturado, o la presencia de agua favorecen la germinación de los conidios y el proceso de infección (Porras y González, 1984).

II.1.8. Mecanismos de dispersión.

El viento es el principal modo de dispersión de las esporas, aunque también pueden ser diseminadas por el agua, insectos y otros animales. Las esporas secas, se desprenden fácilmente de las mazorcas mediante cualquier estímulo físico, y son llevadas por el viento, el cual puede moverlas a distancias considerables, mientras no existan importantes barreras naturales. Sin embargo, aunque el hongo está muy bien adaptado a la dispersión por el viento, debido a que poseen esporas que se secan con facilidad y tienen paredes gruesas, se ha sugerido que su movilización y sobrevivencia es limitada por el peso de las mismas y por su susceptibilidad a la radiación solar (Phillips-Mora, 2004).

Los seres humanos son los agentes más efectivos de diseminación de la moniliasis a largas distancias, dado que el hongo está muy bien adaptado a este método indirecto de diseminación. El largo periodo de colonización del fruto antes de la manifestación de síntomas visibles, hace posible que un fruto aparentemente sano, sea transportado para ser usado como material de siembra u otro propósito (Evans, 1986).

Se deduce que los esfuerzos principales para evitar la dispersión de la enfermedad hacia áreas nuevas, deben enfatizar la educación de la población sobre el reconocimiento de la enfermedad y sobre los riesgos que tiene la movilización de materiales de cacao, de un sitio a otro. La dispersión a largas distancias puede ocurrir en dos vías, dentro o sobre frutos enfermos o sobre varetas u otro material vegetativo. Las esporas pueden fácilmente adherirse a estos tejidos y permanecer viable por varios meses. Los vientos fuertes tales como huracanes y tornados pueden ser agentes de diseminación a largas distancias, sin embargo, este papel aún no ha sido esclarecido (Phillips-Mora, 2004).

Diferentes especies de animales como monos, ardillas, ratas, murciélagos, venados, pericos y otros tipos de aves, podrían tener un papel importante en la diseminación de la moniliasis. Estos animales, podrían favorecer la dispersión del hongo en dos vías: llevando las esporas sobre sus cuerpos o dentro de sus tractos digestivos o bien, transportando frutos enfermos o parte de ellos de un sitio a otro (Phillips-Mora, 2004).

El agua, ya sea como lluvia o como rocío, es efectiva para liberar pequeñas cantidades de esporas (Evans, 1981). Las esporas que están flotando en el aire pueden ser depositadas por la lluvia sobre las copas de los árboles y ser distribuidas a otras partes del árbol, particularmente al tronco de donde pueden infectar los frutos (Ram, 1989, citado por Phillips-Mora, 2004).

II.1.9. Epidemiología.

No se ha determinado experimentalmente el papel exacto que juega la lluvia, la humedad relativa y la temperatura en el desarrollo de la enfermedad. Se ha observado que las lluvias intensas y frecuentes, una humedad relativa alta y un ambiente húmedo en la plantación, proporcionado por sombra excesiva y poca aireación, favorecen la frecuencia e intensidad del ataque (Barros, 1977).

Estas condiciones no se pueden generalizar, pues los factores que favorecen la germinación y penetración del hongo (condiciones húmedas), son diferentes a los factores que favorecen la liberación y diseminación del inóculo (condiciones secas). Así, una condición de alta temperatura (mayor de 26°C) y baja humedad relativa (menor de 85%), favorecen la liberación de las esporas (Schmitz, 1985).

Sobre las plantaciones afectadas, existe una presencia permanente de esporas de *M. roleri*, flotando en el aire, por lo que la infección de los frutos puede ocurrir en cualquier momento mientras exista tejido susceptible y condiciones ambientales favorables. La cantidad de esporas en el aire está influenciada por la hora del día y la estación del año (Schmitz, 1985).

II.1.10. Control de la moniliasis del cacao.

Los esfuerzos principales para evitar la dispersión de la infección hacia áreas nuevas, deben enfatizar la educación de la población sobre el reconocimiento de la enfermedad, así como los riesgos que tienen la movilización de materiales de cacao de un sitio a otro. La regulación del microambiente ha sido una de las prácticas más recomendadas para el combate de la moniliasis. El crecimiento, el tipo de sombra producida y el manejo de los doseles de los árboles de sombra, influyen en el microambiente del cacaotal y probablemente en la incidencia de la moniliasis (Meléndez y Somarraba, 1999).

II.1.10.1. Control cultural.

La poda sanitaria consiste en eliminar los frutos enfermos, con el objetivo de disminuir las fuentes de inóculo. Esta práctica ha producido muy buenos resultados, para el combate de la enfermedad por tratarse de una práctica de carácter acumulativo. Su problema es que para garantizar su efectividad, debe realizarse semanalmente durante gran parte del año. Los frutos removidos deben dejarse sobre el suelo en donde, aparentemente, el hongo es inactivado por mecanismos biológicos. Sin embargo, se recomienda que para asegurar áreas de reciente infestación, es recomendable la incineración de los mismos para evitar su diseminación (Phillips-Mora, 2004).

Para asegurar la efectividad de la poda sanitaria, esta debe acompañarse de otras prácticas culturales, tales como, combate de maleza, podas y deschuponar el cacao, regulación de la sombra, fertilización, drenaje, cosecha oportuna y beneficio oportuno de los frutos. Con estas actividades, se busca producir un cambio en el microclima de la plantación que desfavorezca al patógeno y beneficie a la planta (Phillips-Mora, 2004).

II.1.10.2. Control químico.

En experimentos realizados en varios países, se ha determinado que el combate químico es usualmente antieconómico y en muchos casos ineficaz. Los fungicidas y su aplicación son de alto costo, sobre todo si se considera, el número de aplicaciones necesarias para lograr una cobertura adecuada de las mazorcas en los períodos de rápido crecimiento y de lluvias frecuentes. Phillips-Mora, (2004) ha reportado que en Colombia y Ecuador, se han obtenido resultados inconsistentes y variables, con la aplicación de químicos, y se ha informado incluso de disminución de la población y aumento de la marchites fisiológica (Phillips-Mora, 2004).

Por otro lado, Argüello (2000 y 2001), ha propuesto que en las plantaciones tecnificadas de alto rendimiento, las aplicaciones estratégicas de fungicidas, podrían ser de gran utilidad en la convivencia de la enfermedad, por lo que surge la necesidad de hallar alternativas químicas que permitan un manejo integral de la enfermedad.

Sin embargo, una de las principales limitantes para el uso de los fungicidas, se basa en el desconocimiento del momento más adecuado para la aplicación del producto, pudiendo esta, ser la explicación de la baja eficacia del producto, así como por el costo que representa hacer aplicaciones frecuentes para proteger la cosecha siguiente (Palacios, 1990).

Los productos a base de oxiclورو de cobre, han mostrado la mayor efectividad en el control de la enfermedad, pero los resultados, en la mayoría de los casos, son variables y antieconómicos, comparados con el control cultural. Sin embargo, en ensayos recientes, se encontró similitud al comparar ambas prácticas (Arguello, 2000).

Otro hecho que limita el uso de los fungicidas, es la baja rentabilidad del cultivo, debido al bajo precio que alcanza el producto en el mercado, lo cual dificulta realizar un programa de aspersiones programadas de agroquímicos. Otra alternativa para el control de la enfermedad, es la combinación de la poda de plantas a una altura de cuatro metros y tumar periódicamente las mazorcas, aún cuando presenten estadios incipientes de la enfermedad, la cual parece tener mayor probabilidad de adopción (Sánchez *et al.*, 2003).

II.1.10.3. Control genético.

El combate por resistencia a través del uso de material vegetativo tolerante, resulta para el agricultor, el método más barato, sencillo, duradero y eficaz. Su uso en cacao es factible, debido a que la gran diversidad genética del género *Theobroma*, incrementa la posibilidad de encontrar material con diversos grados de resistencia (Phillips-Mora, 2004).

Se han logrado algunos avances en la identificación de patrones de cacao con resistencia en campo, así mismo se han reportado algunos genotipos resistentes en varios países. Phillips-Mora *et al.*, (2005), reportaron la evaluación de cinco clones de cacao contra siete aislados colombianos de *M. royeri*, representativos de los cuatro grupo genéticos del patógeno (Phillips-Mora, 2003). Hubo considerable variación entre

los clones al evaluar la severidad interna y severidad externa, sin embargo, el clon cultivado ICS-95, mostró un nivel significativo de resistencia contra los siete aislados. Por lo anterior, se considera que este clon puede ser de mucha utilidad en los programas de mejoramiento genético del cacao para la resistencia a la moniliasis (Phillips-Mora *et al.*, 2005).

II.2. Técnicas moleculares en el estudio de la clasificación e identificación de hongos.

A partir de las investigaciones de Chang *et al.*, (1962), en *Neurospora* spp y de Clare (1963) en *Phytophthora* spp, ha habido un notable interés en aplicar análisis moleculares en la identificación y clasificación de los hongos. Los sistemas de clasificación de taxonomía morfológica, procuran colocar a los organismos en una disposición ordenada y conveniente, y se basan en general, en relaciones genéticas, constituyendo una clasificación natural, la cual está firmemente arraigada, y tiene sin duda, valores sobresalientes. Sin embargo, tiene algunas limitaciones entre las cuales, podemos mencionar las siguientes: no es posible diferenciar entre especies de un mismo género, ni entre géneros estrechamente emparentados, mayor lentitud para hacer la identificación, debido a que la identificación morfológica incluye el análisis de las estructuras reproductivas y vegetativas, mismas que en ocasiones requieren de muchos días (dependiendo del género y la especie) para su formación; así como la existencia de dimorfismo celular, entre otros. Ante esto, la caracterización molecular de los organismos ha avanzado rápidamente, esto es de particular valor en grupos críticos, donde existe la dificultad para la utilización de los métodos clásicos de la taxonomía tradicional (Dokmetzian y Ranalli, 2004).

Mediante las técnicas moleculares, es posible realizar estudios de diversidad genética, ciclos de vida, ecología, filogenia e identificación de hongos. La variabilidad genética en los organismos puede estudiarse a nivel del DNA, lo cual permite establecer marcadores moleculares que facilitan la separación y caracterización genética de los individuos (Valverde y Paredes, 1996). Un marcador molecular es “toda variabilidad de naturaleza bioquímica o molecular, susceptible de ser asociada con la variabilidad de

algún parámetro morfológico o agronómico” (Campos, 1995). Los marcadores moleculares se han utilizado para estudiar la variabilidad genética de muchos hongos, para detectar cambios en el genoma, o para determinar la estructura de las poblaciones (Bachmann, 1994).

Las técnicas moleculares han permitido la detección y caracterización molecular de organismos fitopatógenos como hongos, bacterias, virus, nematodos y fitoplasmas, principalmente. Estas técnicas no son un sustituto a las metodologías clásicas de micología para la identificación de especies fungosas, son una herramienta científica, que adicionalmente proporcionan, reafirman, o amplían la información de un hongo a nivel genético y se basan en el análisis del DNA, y su amplificación exponencial por PCR con iniciadores específicos (Yañez-Morales, 2001).

La técnica conocida como PCR-ITS (PCR- Internal Transcribed Spacer, por sus siglas en inglés) permite replicar *in vitro* miles de veces, la región interna de genes ribosomales de las especies fúngicas, para producir suficiente DNA para el análisis de su secuencia dada en pares de bases, misma que al ser comparada con la de otros, permita identificarlos y ubicarlos taxonómicamente. Los genes amplificados y comparados son los DNA ribosomales (rDNA) (18S, 5.8S y 28S), los cuales están altamente conservados (Foster *et al.*, 1993).

II.2.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

II.2.1.1. Generalidades de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Kary Mullis en 1985 descubrió la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés), esta técnica es una síntesis enzimática cíclica en donde las cadenas de DNA son copiadas *in vitro*. Para esto, la PCR involucra un par de iniciadores que rodean los segmentos de DNA que son amplificados por ciclos repetidos. El producto de la extensión del primer ciclo sirve de molde para el siguiente, de manera que el número de copias del DNA blanco se duplica exponencialmente en cada ciclo de polimerización (Williams *et al.*, 1990).

Los componentes requeridos para una reacción de PCR son: una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's), iones de magnesio, una enzima DNA polimerasa termoestable, una mezcla de iniciadores (oligonucleótidos), y el DNA molde. Si se colocan estos componentes en un tubo de reacción, la DNA polimerasa puede incorporar uno por uno los nucleótidos correspondientes, es decir, si en el templado o molde existe una A (adenina), el nucleótido a incorporar será T (timina), G (guanina) enfrente de C (citosina) y así sucesivamente, de manera que la cadena siempre estará creciendo hasta que se agote la mezcla de reactivos. Dicho procedimiento se realiza *in vitro* y en una serie de ciclos sucesivos en una reacción en cadena. Los oligos o bases sintéticos, debido a su capacidad de hibridarse con la molécula molde u original de ácido nucleico, definen el inicio del copiado de la cadena (Rojas, 1998).

Si se colocaran dos oligonucleótidos cuya secuencia define extremos de un segmento determinado de DNA, estos se hibridarán con las cadenas molde previamente separadas en el proceso de desnaturalización, cuando se encuentran con la DNA polimerasa en la reacción, resultando dos moléculas cuyos extremos están definidos por los oligonucleótidos que corren en sentido opuesto a lo largo de la cadena molde. Las cadenas resultantes son complementarias entre sí, y se encuentran el doble de moléculas con la secuencia de los oligonucleótidos que fueron adicionados en la mezcla de reacción, al repetirse este proceso en forma cíclica el resultado es un crecimiento exponencial. Al dar inicio el nuevo ciclo se obtendrán cuatro moléculas de la región entre los oligonucleótidos. Los ciclos subsecuentes formarán 8, 16, 32, 64 moléculas y así, sucesivamente.

Con la PCR se pueden obtener segmentos específicos de DNA para crear millones de moléculas a partir de unas cuantas, o incluso de una sola. Para esto se hace uso de una DNA polimerasa sintética que soporta temperaturas de 98 °C (Rojas, 1998).

La reacción de PCR requiere de varias etapas, las cuales se describen a continuación:

Desnaturalización. Para dar inicio a la reacción se requiere que el DNA molde se encuentre en forma de cadena sencilla, esto se logra aplicando temperaturas de 90 a 95 °C que producen la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios, y por lo tanto, la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra esta temperatura debe mantenerse unos minutos. Si el DNA sólo se desnaturaliza parcialmente, éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los iniciadores y una posterior extensión (Rojas, 1998).

Hibridación o alineamiento. Esta fase se denomina también “annealing” o de emparejamiento. Una vez que el DNA está desnaturalizado, se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y 60 °C para que se pueda producir la unión de los iniciadores a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La temperatura de fusión (T_m , “meeting temperature”) depende de varios factores y es relativamente específica para cada iniciador. La longitud de los iniciadores y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación, una fórmula simple para calcular la T_m es la siguiente: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. No obstante, cada iniciador exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de hibridación específica, ya que si la temperatura es muy baja, la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta, no se producirá una unión completa (Rojas, 1998).

Extensión. Durante este paso la polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del iniciador, utilizado como molde la cadena de DNA previamente desnaturalizado. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72 °C, debido a que es la temperatura a la que la polimerasa alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2 Kb. Un factor importante a considerar es el tiempo de “rampa”, el cual se define como el tiempo invertido en pasar de una

temperatura a otra, y depende del diseño y de las características del termociclador, aparato donde se realiza automáticamente este proceso (Rojas, 1998).

Iniciadores de PCR. Para el diseño de iniciadores con la finalidad de amplificar un fragmento de DNA, se tienen que considerar las características siguientes: a) Longitud de los iniciadores: esta debe estar comprendida entre 18 y 24 bases, debido que se ha comprobado que iniciadores de mayor longitud (30-35 bases), no aumentan el rendimiento; mientras que los iniciadores cortos, no tienen suficiente especificidad; b) La temperatura de fusión (T_m): ambos iniciadores deben tener una T_m similar (como mucho la diferencia entre ambas temperaturas debe ser de 5°C); c) La relación de bases: la relación bases púricas:bases pirimídicas, debe ser 1:1 (o como mucho 40:60%); d) la secuencia de los iniciadores debe iniciar y terminar con 1-2 bases púricas. Para evitar la formación de dímeros de iniciadores, es necesario comprobar que los iniciadores no contengan secuencias complementarias entre sí (Rojas, 1998).

La PCR, es una técnica que tiene muchas aplicaciones en todas áreas del conocimiento como agricultura, medicina, antropología, etc. Algunas de las variantes de esta técnica son: RT-PCR, para el estudios de expresión de genes; identificación viral y evaluación de cargas microbianas; RAPD, RFLP y AFLP, microsatélites, para realizar estudios de diversidad genética y evolución; así como la amplificación y secuenciación de genes ribosomales, misma que fue utilizada en este trabajo, para la identificación molecular del hongo *M. roreri* y diagnóstico de la moniliasis del cacao.

II.3. Generalidades de las proteasas.

II.3.1. La proteólisis.

La proteólisis se define como la hidrólisis de proteínas y polipéptidos, que da como resultados la producción de péptidos más pequeños y aminoácidos. En los seres vivos, estas reacciones son catalizadas por enzimas denominadas proteasas (Hirsch *et al.*, 1989).

Desde 1942, Schöenheimer, reconoció el papel central de las enzimas proteolíticas en el mantenimiento de los niveles proteicos intracelulares, estableciendo el "concepto dinámico de los componentes celulares", cuya concentración permanece constante como resultado del equilibrio entre las velocidades de síntesis y de degradación. De esta manera, la actividad proteolítica se convierte en un mecanismo regulador que mantiene los niveles de proteína en cada momento (Schimke y Doyle, 1970).

La proteólisis juega un papel clave, no solamente en el recambio de proteínas endógenas, sino también en el control de diversas funciones fisiológicas, como la digestión de proteínas, maduración de hormonas, respuesta inmune, inflamación, coagulación, fertilización, germinación y otros procesos morfogénicos (Holzer y Heinrich, 1988). Algunas proteasas juegan un papel importante en la esporulación, la germinación, la patogenicidad de diversos microorganismos y pueden participar en la regulación post-traducciona (Yuan y Cole, 1989; Vartivarian, 1992; White y Agabian, 1995 y Suárez *et al.*, 1981).

Tradicionalmente, se ha considerado que las proteasas extracelulares tienen la función de degradar macromoléculas para permitir su asimilación.

La proteólisis intracelular se puede clasificar en tres tipos, tomando en cuenta la especificidad por el sustrato:

a) Proteólisis inespecífica. Las enzimas que llevan a cabo este tipo de proteólisis, tienen una especificidad baja por el sustrato, y por lo tanto, son capaces de degradar una gran diversidad de proteínas. Por lo general, para evitar una proteólisis descontrolada, estas proteasas sólo se encuentran en compartimentos celulares o dentro de organelos como los lisosomas o vacuolas (Seglen y Bohley, 1992).

b) Proteólisis altamente inespecífica. Las proteasas involucradas en este proceso, reconocen proteínas blanco que portan alguna señal o modificación que es reconocida por la enzima, y esta degradación puede ocurrir en cualquier compartimento celular. Este tipo de proteólisis, está relacionada con la degradación selectiva de proteínas citoplasmáticas que presentan una vida media corta, esta característica está dada por el tipo de aminoácidos presentes en cada proteína (Bachmair *et al.*, 1986).

c) Proteólisis altamente específica. Este tipo de proteólisis, sólo afecta a un tipo de proteínas, tiene lugar en cualquier compartimento celular y está implicada en la activación, inactivación o modulación de procesos puntuales, es llevada a cabo por enzimas muy específicas que reconocen determinadas secuencias de aminoácidos o conformación estructural, o actúan sólo bajo ciertas condiciones de pH y fuerza iónica. La activación de zimógenos, la eliminación de la secuencia señal en proteínas extracelulares, la eliminación de la metionina del extremo N-terminal de proteínas nacientes y la activación selectiva de proteínas, son algunos ejemplos. De esta manera, queda claro que la proteólisis no es únicamente el mecanismo central post-traducciona l que permite activar y desactivar un gran número de funciones catalíticas celulares (Suárez y Wolf, 1988).

Las proteasas también pueden ser clasificadas de acuerdo al enlace a escindir en exopeptidasas y endopeptidasas, como lo hace la comisión de nomenclatura y clasificación de las enzimas. Las exopeptidasas, hidrolizan exclusivamente enlaces peptídicos situados en el extremo amino o carboxilo de la cadena polipeptídica, liberando los aminoácidos terminales de la proteína. Este grupo comprende:

- a) Las aminopeptidasas (L-aminoacil péptido hidrolasas EC 3.4.11.) que catalizan la reacción de liberación secuencial de aminoácidos del extremo amino terminal.
- b) Las carboxipeptidasas (Peptidil aminoácido hidrolasas EC 3.4.12) que catalizan la liberación secuencial de aminoácidos del extremo carboxilo terminal.
- c) Las dipeptidasas (Dipéptido hidrolasas EC 3.4.13) que hidrolizan dipéptidos con sus grupos amino y carboxilo libres.
- d) Las dipeptidilaminopeptidasas (Dipetidil péptido hidrolasas EC 3.4.15) que liberan dipéptidos en el extremo amino terminal. (Suárez y Wolf, 1988).

Las endopeptidasas, catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos situados preferentemente en el interior de la cadena polipeptídica. Debido a que las endoproteasas son capaces de degradar las proteínas hasta péptidos, se tiende a denominarlas proteinasas, término que no debe confundirse con proteasas ya que éste engloba a los dos grupos (Suárez y Wolf, 1988).

Por último, las proteasas se clasifican de acuerdo a su mecanismo catalítico en:

- a) Serin-proteasas (EC 3.4.21). Poseen un residuo de serina en su centro activo y son inhibidas específicamente por diisopropil-fluorofósforo y otros organofosforados.
- b) Tiol-proteasas (EC 3.4.22). Son enzimas que requieren de la presencia de un grupo -SH intacto en su sitio activo y son inhibidas por iones de metales pesados, agentes alquilantes y agentes oxidantes.
- c) Proteasas ácidas (EC 3.4.23). Poseen uno o más grupos carboxilo en su sitio activo.
- d) Metaloproteasas (EC 3.4.24). Requieren de cationes divalentes, a veces la diálisis o los agentes quelantes las inactivan (Suárez y Wolf, 1988).

II. 3. 2. Proteasas producidas por hongos fitopatógenos.

Recientemente, se han publicado muchos trabajos sobre el estudio de proteasas producidas por hongos fitopatógenos. Tradicionalmente se había dado más importancia a otro tipo de enzimas hidrolíticas producidas por estos microorganismos que afectan directamente a la célula hospedera. Se han mencionado las pectinasas, celulasas, quitinasas y hemicelulasas, como las enzimas responsables de la destrucción de la pared celular del hospedero durante la fitopatogénesis (Agris, 1998; Gherbawy, 1998).

Tomando en consideración la importancia de las proteínas como enzimas, así como constituyentes de las membranas celulares y como componentes estructurales de las células vegetales, su degradación por enzimas proteolíticas, que son secretadas por los fitopatógenos, afecta considerablemente la organización y el funcionamiento de las células hospedantes. Sin embargo, se ha investigado muy poco sobre la naturaleza y el alcance de estos efectos, y hasta ahora, se desconoce su importancia en el desarrollo de las enfermedades de plantas ocasionadas por microorganismos (Agris, 1998).

Entre lo reportado respecto al papel de algunas proteasas de hongos en el proceso de patogénesis podemos citar lo siguiente:

Aspergillus niger, ocasiona daños a granos y semillas mal almacenadas. Este hongo produce una proteínasa alcalina denominada aspergilopeptidasa que tiene actividad de colagenasa, una serin-carboxipeptidasa, y endopeptidasas ácidas A y B. Sin embargo,

estas proteasas no se han asociado como factores de fitopatogenicidad (Barthomeuf *et al.*, 1989; Hombergh *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1998).

En una cepa virulenta de *Botrytis cinerea* agente causal de la pudrición de la manzana, se encontró que este hongo produce una aspartil-proteasa y una carboxipeptidasa, ambas extracelulares, que son capaces de hidrolizar proteínas de una preparación de pared celular de manzana (Urbanek and Kaczmare, 1985).

Fusarium culmorum, causa la pudrición de frutos post-cosecha, así como el marchitamiento de numerosas plantas con interés económico (Agris, 1998). Este hongo produce una proteasa ácida capaz de hidrolizar varias proteínas de origen vegetal. Se ha propuesto que posiblemente esta enzima tiene un papel importante en la fitopatogénesis del hongo (Urbanek y Yirdaw, 1984).

Trichoderma harzianum es un hongo antagonista, se usa en el biocontrol de numerosos hongos fitopatógenos (*Rhizoctonia solani*). Las enzimas hidrolíticas secretadas por este micoparásito, se ven implicadas directamente en la lisis del hospedero al que infectan (Cortés *et al.*, 1998). En este organismo, se ha descrito una proteinasa básica, la cual se produce cuando se adiciona micelio o células del fitopatógeno al medio de cultivo, simulando el micoparasitismo (Geremia *et al.*, 1993; Flores *et al.*, 1997).

Endothia parasitica, (= *Cryphonectria parasitica*) causa el tizón del castaño, también ataca al roble, al arce rojo, al nogal americano y en ciertas ocasiones, ataca a otros árboles, pero no en forma tan severa como al castaño americano (Agris, 1998). Este fitopatógeno, produce una aspartil-proteasa secretada, la cual ya fue purificada y caracterizada, y que es codificada por el gen *epr-1*, (Choi *et al.*, 1993). En este mismo hongo se reportaron dos nuevas proteinasas secretadas denominadas EapB y EapC, las cuales ya fueron purificadas y se clonaron los genes que las codifican (Jara *et al.*, 1996).

Glomerella cingulata, produce antracnosis graves en numerosas plantas de ornato, canchales y la muerte descendente de plantas leñosas, la pudrición amarga de los manzanos y la pudrición madura de vid, peras, duraznos y otros frutos (Agrios, 1998). Este hongo sintetiza una proteínasa aspártica secretada denominada GcSAP, la cual ya fue purificada y se clonó el gen que la codifica. La expresión de esta enzima se induce por la presencia de proteína exógena y se reprime con sales de amonio (Clark *et al.*, 1997).

En el hongo fitopatógeno y dimórfico *Ustilago maydis* causante del carbón del maíz, se encontró la presencia de al menos cuatro proteasas, dos proteinasas yumA y yumB y al menos dos aminopeptidasas (yumAPE) solubles que se comportan como metalo-proteasas, dos dipeptidil aminopeptidasa (yumDAP) membranales que se comporta como serin-metalo-proteasa y cisteín-metalo-proteasa dipeptidil. La enzima yumA extracelular, pudiera estar involucrada en la regulación de los procesos dimórficos de este hongo. La actividad yumB intracelular, la cual es regulada por la presencia de un inhibidor endógeno, a diferencia de la yumB extracelular. Ambas enzimas (yumBi y yumBe) parecen estar reguladas por la fuente de nitrógeno y carbono, así como por la fase de crecimiento celular del hongo (Mercado *et al.*, 2003). En el Cuadro 1, se resumen las características de las proteasas producidas por hongos fitopatógenos.

Cuadro 1. Proteasas producidas por hongos fitopatógenos.

Proteasa	Hongo	Enfermedad que causa	Característica	Asociada a virulencia	Referencia
Aspergillopeptidasa	<i>Aspergillus niger</i>	Daños a granos y semillas mal almacenados	Metal-serín-endopeptidasa alcalina. Peso molecular 21 kDa. pH óptimo = 7.8.	No	Barthomeuf <i>et al.</i> , 1989.
Serín-carboxipeptidasa	<i>Aspergillus niger</i>	Daños a granos y semillas mal almacenados	Gen estructural <i>pepF</i> .	No	Hombergh <i>et al.</i> , 1994.

Cuadro 1 continuación.

Endopeptidasa ácida A	<i>Aspergillus niger</i>	Daños a granos y semillas mal almacenados	Extracelular	No	Rao <i>et al.</i> , 1998.
Endopeptidasa ácida B	<i>Aspergillus niger</i>	Daños a granos y semillas mal almacenados	Extracelular Aspartil-proteasa	No	Rao <i>et al.</i> , 1998.
Proteinasa ácida	<i>Botrytis cinerea</i>	Pudrición de la manzana	Aspartil-proteinasa extracelular. pH =2.5-3.0. Actúa sobre proteínas de origen vegetal	Probable	Urbanek y Kaczmare, 1985.
Carboxipeptidasa	<i>Botrytis cinerea</i>	Pudrición de la manzana	Serín-proteinasa ácida extracelular. pH óptimo =4.7-5.0. Actúa sobre proteínas de origen vegetal	Probable	Urbanek y Kaczmare, 1985.
Proteasa ácida	<i>Fusarium culmorum</i>	Pudrición de frutos post- cosecha y marchitez	Actúa sobre proteínas de origen vegetal	Probable	Urbanek y Yirdaw, 1984.
Proteinasa básica	<i>Trichoderma harzianum</i>	Antagonista de hongos	Gen estructural <i>prb1</i> . Serín-proteinasa extracelular. Peso molecular 31 kDa. pH=9.2.	No	Geremia <i>et al.</i> , 1993; Flores <i>et al.</i> , 1997
Endotiapepsina	<i>Endothia parasitica</i>	Tizón del castaño	Gen estructural <i>epn-1</i> . Aspartil-proteasa secretada (aspA)	No	Choi <i>et al.</i> , 1993.
Proteinasa EapB	<i>Endothia parasitica</i>	Tizón del castaño	Gen estructural <i>eapB</i> . Proteinasa ácida secretada.	No	Jara <i>et al.</i> , 1996.
Proteinasa EapC	<i>Endothia parasitica</i>	Tizón del castaño	Gen estructural <i>eapC</i> . Proteinasa ácida secretada.	No	Jara <i>et al.</i> , 1996.

Cuadro 1 continuación.

Proteinasa EapC	<i>Endothia parasitica</i>	Tizón del castaño	Gen estructural <i>eapC</i> . Proteinasa ácida secretada.	No	Jara <i>et al.</i> , 1996.
Proteinasa aspártica	<i>Glomerella cingulata</i>	Antracnosis y pudriciones	Gen estructural <i>gcsap</i> . Aspartil-proteinasa secretada (GcSAP). Peso molecular 36 kDa. pH óptimo=3.5-4.0.	Probable	Clark <i>et al.</i> , 1997.
Proteinasa pumA	<i>Ustilago maydis</i>	Carbón del maíz	Proteasa ácida Aspártil proteasa pH óptimo 3.5	No	Mercado <i>et al.</i> , 2003
Proteinasa pumB	<i>Ustilago maydis</i>	Carbón del maíz	Asociada a un inhibidor endógeno. pH óptimo 6.0	No	Mercado <i>et al.</i> , 2003
pumAPE	<i>Ustilago maydis</i>	Carbón del maíz	Metallo-proteasa	No	Mercado <i>et al.</i> , 2003
pumDAP	<i>Ustilago maydis</i>	Carbón del maíz	Serín-metallo- proteasa (membranal)	No	Mercado <i>et al.</i> , 2003
Proteinasa tipo tripsina	<i>Alternaria alternata</i>	Pudrición de plántulas y contaminante de semilla	Grupo de las serín proteasas	Probable	Dunaevskii, <i>et al.</i> , 2006
Proteinasa tipo tripsina	<i>Fusarium culmorum</i>	Pudrición de frutos post-cosecha y marchitez	pH óptimo: 9 inhibida por p-APMSF.	Probable	Pekkarinen y Jones, 2002.
Proteinasa tipo subtilisina	<i>Fusarium culmorum</i>	Pudrición de frutos post-cosecha y marchitez	30-60 kDa Serín proteasa	Probable	levleva, <i>et al.</i> , 2006.
Metaloproteinasa tipo tripsina y subtilisina	<i>Phytophthora infestans</i>	Tizón en solanáceas	Serín proteinasas	Probable	Gvozdeva <i>et al.</i> , 2004.

Al igual que Mercado-Flores *et al.*, (2003), en el presente trabajo se buscaron las siguientes proteasas: aminopeptidasa (APE), dipeptidil aminopeptidasa (DAP), carboxipeptidasa (CP) y aspartil proteasa (AP), por lo que esperamos obtener resultados similares. Posteriormente, los resultados de este trabajo nos permitirán establecer líneas de investigación enfocadas a dilucidar el papel funcional de cada una de estas proteasas en los diferentes aspectos celulares de la biología del hongo, incluyendo la fitopatogénesis.

II.4. LITERATURA CITADA.

- Agrios, G. N. 1998. Fitopatología. 3a edición. Editorial Limusa, México. 756 p.
- Aime, M. C. y Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot on cocoa (chocolate *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*. 97: 1012-1022.
- Argüello, O. 2000. Manejo Integrado de la monilia del cacao (*Theobroma cacao L*). En tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción de cacao. Bucaramanga. Colombia. Corpoica, Regional Siete. pp. 74-84.
- Argüello, O. 2001. Evaluación de materiales de cacao por resistencia a *Moniliophthora roreri* en Santander. www.cindor@corpoica.org.co.
- Bachmair, A., D. Finley y A. Varshavsky. 1986. In vivo half-life of a protein is a function of amino-terminal residue. *Science*. 234: 179-186.
- Bachmann, K. 1994. Transley markers. *Molecular markers in plant ecology. The new Phytologist*. 126: 403-418.
- Barros O. 1977. Investigaciones sobre el hongo *Monilia roreri* Cif y Par, causante de la pudrición acuosa de la mazorca del cacao: sus daños y su control. *El cacaotero Colombiano*. 3: 42-43.
- Barthomeuf, C., I. Pourrat y A. Pourrat. 1989. Properties of a new alkaline proteinase from *Aspergillus niger*. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 1333-1336.
- Campos, H. A. 1995. Marcadores Moleculares. Conceptos. Notas técnicas. *AGROSUR*. 23: 63-75.

- Campuzano, H. 1981. Fluctuaciones de población de esporas de *Monilia roreri* y su viabilidad durante un ciclo completo de afección. Proceedings of the Eighth International Cocoa Research Conference, 1981. Cartagena, Colombia: Cocoa Producers' Alliance pp 54-59.
- Chang, L.O., Srb A. M. y Steward, F. C. 1962. Electrophoretic separations of the soluble proteins of *Neurospora*. Nature.193: 756-759.
- Choi, G. H., D. M. Pawlyk, B. Rae, R. Shapira y D. L. Nuss. 1993. Molecular analysis and overexpression of the gene encoding endothiapepsin, an aspartic protease from *Cryphonectria parasitica*. Gene. 125: 135-141.
- Ciferri, R. y E. Parodi. 1933. Descrizione del fungo che causa la "moniliase" del cacao. Phytopathologische. Zeitschrift. 6: 539-542.
- Clare, B. G. 1963. Starch gel electrophoresis of proteins from species of *Phytophthora*. Comparison of six species. Nature. 200: 803-804.
- Clark, S. J., M. D. Templeton y P. A. Sullivan. 1997. A secreted aspartic proteinase from *Glomerella cingulata*: purification of enzyme and molecular cloning of the cDNA. Microbiology 143: 1395-1403.
- Cortes, C., A. Gutierrez, V. Olmedo, J. Inbar, I. Chet y E. A. Estrella. 1998. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. Mol. Gen. Genet. 260: 218-225.
- Desrosiers, R. y C. Suarez. 1974. Monilia pod rot of cacao. In P.H. Gregory (ed.). *Phytophthora diseases of cocoa*. Longman Group Ltd. London, UK. pp. 273-277.
- Dokmetzian, D. A. y Ranalli, M. E. 2004. Crecimiento de especies del género *Ascobolus*. II. (Pezizales-ascomycota). Rev Iberoam Micol. 21: 96-99.
- Dunaevskii, I. E., T. N. Gruban, G. A. Beliakova, M. A. Belozerskii. 2006. Extracellular proteinases of filamentous fungi as potential markers of phytopathogenesis. Mikrobiologiya. 75 (6): 747-751.
- Evans H., C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. London, UK: Commonwealth Micological Institute. Phytopatological papers no. 24. 44p.
- Evans, H. C. 1986. A reassessment of *Moniliophthora* (*Monilia*) pod rot of cocoa. Cocoa Growers' Bulletin 37: 34-43.
- Evans, H. C., D. F. Edwards y M. Rodriguez. 1977. Research on cocoa diseases in Ecuador: past and present. PANS (Pest Artic. News Summ.). 23: 68-80.

- Evans, H. C., J. A. Stalpers, R. A. Samson y G. L. Benny. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Can. J. Bot.* 56: 2528-2532.
- Evans, H. C., K. A. Holmes, W. Phillips y M. J. Wilkinson. 2002. What's in a name: *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa?. *Mycologist.* 16 (Part 4), 148-152.
- Foster, D. M., Kozak, K. R., Loftus, M. G., Stevens, J. J., and Ross, I. K. 1993. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. *Mycological Research.* 97: 769-781.
- Flores, A., H. Chet, A. E. Herrera. 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *pbr1*. *Curr. Genet.* 31: 30-37.
- Geremia, A. R., H. G. Golman, D. Jacobs, W. Ardiles, B. S. Vila, V. M. Montagu y E. A. Herrera. 1993. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *pbr1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* 8: 603-613.
- Gherbawy, Y. L. G. T. 1998. Effect to gamma irradiation on the production of cell wall degrading enzymes by *Aspergillus niger*. *Inter. J. of Food Microbiol.* 40: 127-131.
- Girbardt, M. 1958. Uber diesubstruktur von polystictus versicolor L. *Arch. Microbiol.* 28: 255-269.
- González L., C. 1981. Efecto de las Fuentes de inóculo sobre las posibilidades de combate de la moniliasis del cacao. *In: Proceedings of the Primera Jornada de Investigación, 1981.* San José, Costa Rica: Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, pp. 29-39.
- Hirsch, H. H., P. Suárez-Rendueles, and D. H. Wolf. 1989. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) proteinases: Structure, characteristics and functions, p. 134-200. *In: E. F. Walton, and G. T. Yarranton (ed), The molecular and cell biology of yeasts,* Blackie & Sons Ltd., London.
- Holzer H y P. C. Heinrich. 1988. Control of proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 63-91.
- Hombergh, J. P. T. W., G. Jarai, F. P. Buxton y J. Visser. 1994. Cloning, characterization and expression of *pepF*, a gene encoding a serine carboxipeptidase from *Aspergillus niger*. *Gene.* 151: 73-79.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

- levleva, E.V., T. A. Revina, N.N. kudnavtseva, A. V. Sofin, T. A. Valveva. 2006. Extracellular proteinases from the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. *PrinklBiokhim Mikrobiol.* 42(3): 338-344.
- Jara, P., S. Gilbert, P. Delmas, J. C. Guillemot, M. Kaghad, P. Ferrara y G. Loison. 1996. Cloning and characterization of the eapB y eapC genes of *Cryphonectria parasitica* encoding two new acid proteinases, and disruption of eapC. *Mol. Gen. Genet.* 250: 97-105.
- Jorgensen, H. 1970. Monilia pod rot of cacao in Ecuador. *Turrialba.* 15: 4-13.
- Meléndez, L. y Somarraba, E. 1999. Microambiente y cantidad de esporas de *Moniliophthora roreri* en el aire bajo tres sistemas de sombra leguminosa en cacao. *Agroforesteria de las Américas.*23:39-41.
- Mercado-Flores, Y., C. H. Hernandez-Rodríguez, H. J. Ruíz, L. Villa-Tanaca. 2003. Proteinases and exopeptidases from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia.* 95: 327-339.
- Moore, R. T. y J. H. McAlear. 1962. Fine structure of mycota. 7. Observations on septa of ascomycetes and basidiomycetes. *Am. J. Bot.* 49: 86-94.
- Palacios, P. 1990. Efecto de fungicidas y remoción de frutos enfermos, en el control de la moniliasis y mazorca negra del cacao, en la zona atlantica. Universidad de Costa Rica. Turrialba Tesis licenciatura p. 81.
- Pekkarinen, A. I. and B. L. Jones. 2002. Trypsin-like proteinase produced by *Fusarium culmorum* grown on grain protein. *J. Agric. Food. Chem.* 50 (13): 3849-3855.
- Phillips-Mora., W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.*, as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. PhD thesis. Department of Agricultural Botany, School of Plant Sciences. The University of Reading, RG6, UK. 349 p.
- Phillips-Mora., W. 2004. La moniliasis del cacao: una seria amenaza para el cacao en México. *In: Memoria del Simposio Nacional de Manejo Fitosanitario de Cultivos Tropicales.* Tabasco, México. 170 pp.
- Phillips-Mora, W., Castillo, J., Krauss, U., Rodríguez, E. y Wilkinson, J. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology.* 54: 483-490.

- Phillips-Mora, W., Coutiño, A. Ortiz, C. F., López, A. P., Hernández, J. y Aime, M. C. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology*. 55: 584.
- Porrás U., V. H. & González L.C. 1984. Epifitología de la moniliasis del cacao (*Monilia roreri*) y su relación con el ciclo de producción en la zona de Matina, costa Rica. *Fitopatología*. 19(2): 78-84.
- Ram A. 1989. Biology, epidemiology and control of moniliasis (*Moniliophthora roreri*) of cacao. Thesis PhD.: University of London. London, UK. p 286.
- Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge y V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 597-635.
- Rojas, M. R. I. 1998. Identificación del fitoplasma de la filodia del cempazúchil (*Tagetes erecta* L.) mediante PCR y RFLP's y alteraciones fisiológicas en plantas sintomáticas. Tesis de Doctor en Ciencias. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Montecillo. Estado de México. p 97.
- Sánchez, F., E. Gamboa y J. Rincón. 2003. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L.) en el estado de Barinas. *Rev. Fac. Agro. (LUZ)*. 20: 188-194.
- Schimke, R. T. y D. Doyle. 1970. Control of enzyme levels in animal tissues. *Ann. Rev. Microbiol.* 26: 103-126.
- Seglen, R. y P. Bohley. 1992. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanism. *Experimentia*. 48: 158-172.
- Suárez-Rendueles P. y D. H. Wolf. 1988. Proteinase function in yeast: biochemical and genetic approaches to a central mechanism of post-translational control in the eukariotic cell. *FEMS Microbiol. Lett.* 54: 17-46.
- Suárez-Rendueles, M. P., J. Schwencke, N. García-Alvarez y S. Gascon. 1981. A new X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from yeast associated with a particulate fraction. *FEBS letters*. 131:296-300.
- Thurston, H. D. 1973. Threatening plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 11: 27-52.
- Urbanek, H., A. Kaczmarek. 1985. Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and role in phytopatogenesis. *Acta Microbiol. Pol.* 33: 131-136.
- Urbanek, H., G. Yirdaw. 1984. Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and role in phytopatogenesis. *Acta Microbiol. Pol.* 33: 131-136.

- Valverde, M. E. y Paredes, L. O. 1996. El uso de marcadores moleculares en el estudio de la biodiversidad, el caso de los hongos. *Ciencia y Desarrollo*. 22: 37-39.
- Vartivarian S. E. 1992. Virulence properties and non immune pathogenic mechanism. *Clin. Infect. Dis.* 14: 30-36.
- White C. y N. Agabian. 1995. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by environmental factors. *J. Bacteriol.* 177: 5215-5221.
- Williams, J. G. K. Kubelic, R. A. Livak, J. K., Rafalski, A. J. and Tingey, V. S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research.* 18: 6531-6535.
- Yañez-Morales, M. J. 2001. Molecular and morphological analyses of *Alternaria* and *Stemphylium* from oion. Ph. D. Tesis Doctoral. Cornell University. Ithaca, NY. USA. p 261.
- Yuan L. y G. T. Cole. 1989. Characterization of proteinase inhibitors isolated from fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *J. Biochem.* 257: 729-736.

CAPITULO III

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Moniliophthora roreri* CAUSANTE DE LA MONILIASIS DEL CACAO (*Theobroma cacao* L).

III.1. INTRODUCCIÓN.

En Tabasco, la actividad cacaotera es muy importante por su aportación al valor de la producción agrícola estatal, ocupando el primer lugar en producción a nivel nacional (López *et al.*, 1996). La actividad cacaotera en el estado, se encuentra amenazada por la moniliasis del cacao, enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora roreri*. Este hongo, solo ataca frutos de especies pertenecientes a los géneros *Theobroma* y *Herrania*, destruyendo parcial o totalmente las semillas, convirtiéndose en una enfermedad muy destructiva en la mayoría de los países donde se presenta (Phillips-Mora *et al.*, 2006; Porras y González, 1984).

En México, la presencia de este hongo fue reportada por primera vez en el norte de Chiapas en marzo de 2005, iniciando con la observación de mazorcas de cacao con deformaciones y madurez prematura. La presencia de puntos aceitosos, manchas de color chocolate y la aparición de micelio cremoso, momificación de las mazorcas y la necrosis interna, fueron los síntomas distintivos que sugirieron que se trataba de la moniliasis del cacao ocasionada por el hongo *M. roreri*. La identificación del hongo fue confirmada por morfología colonial y la posterior amplificación y secuenciación del DNA (Phillips-Mora *et al.*, 2006).

Las secuencias de DNA analizadas fueron el espaciador interno transcrito (ITS) y la subunidad larga 28S rDNA. Las regiones mencionadas fueron amplificadas por PCR y secuenciadas con los oligonucleótidos específicos de hongos ITS1-F/ITS4 (ITS) y LSU4-B/LR6 (LSU) (Aime y Phillips-Mora, 2005). Las secuencias obtenidas (Números de acceso DQ222923-26 del GenBank), fueron 100% homólogas a las secuencias de otras cepas de *M. roreri* aisladas en Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras y Belice (Phillips-Mora *et al.*, 2006).

El presente trabajo fue realizado con una cepa de *M. royeri* aislada a partir de mazorcas infectadas, de una plantación de cacao, localizada en Pichucalco, Chiapas, debido a que fue ahí donde se encontró por primera vez. Por lo anterior, surgió la necesidad de confirmar la identificación del hongo, por lo que se planteo como objetivo particular:

Implementar una prueba molecular basada en la amplificación del gen 18S rDNA, para la identificación del hongo *M. royeri*, causante de la moniliasis del cacao y así tener la certeza de que se trataba de este hongo para posteriormente realizar los ensayos correspondientes.

La hipótesis del presente ensayo plantea que: Las pruebas moleculares basadas en la amplificación y secuenciación del gen 18S rDNA son útiles para la identificación del hongo *M. royeri*. Una vez confirmada la identidad de la cepa MRO1, se procedió a continuar con los ensayos restantes.

III.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

III.2.1. Aislamiento de *M. royeri*.

Se trabajó con la cepa MRO1 aislada de frutos enfermos de cacao, colectada en la Ranchería Platanal Abajo Segunda Sección, Pichucalco, Chiapas. El aislamiento fue realizado por el Dr. Carlos Fredy Ortiz García.

III. 2.2. Extracción de DNA cromosómico.

La cepa de *M. royeri* se creció en medio líquido V8 enriquecido. La extracción de DNA se realizó siguiendo la metodología descrita por Ausebel *et al.*, (1989). En todos los casos, la centrifugación se llevó a cabo en una microcentrífuga Eppendorff, a 14 000 rpm, durante cinco minutos, a temperatura ambiente.

Las cepas de *M. royeri* se crecieron en cajas Petri, hasta alcanzar 8.5 cm de diámetro (15-21 días). A continuación, se preparó una suspensión de esporas, agregando 5 mL de medio a cada caja Petri, y removiendo cuidadosamente los conidios con un pincel.

La suspensión fue transferida a un matraz de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo y se incubando a 25 °C, en un agitador orbital a 150 rpm durante 24 horas (Phillips-Mora, 2003). Posteriormente, las esporas germinadas fueron contadas y los matraces fueron inoculados con una concentración de 1×10^6 esporas germinadas mL^{-1} .

La biomasa de *M. royeri* se obtuvo a partir de la inoculación de 3 matraces de 125 mL con 25 mL de medio líquido V8 enriquecido. Los matraces se incubaron durante 96 h a temperatura ambiente, en agitación orbital a 150 rpm. Las células fueron cosechadas a partir de 3 mL de cultivo, en un microtubo de 1.5 mL.

Para la extracción del DNA cromosómico se siguió el protocolo descrito por Sambrook, *et al.*, (1989), para lo cual, el medio de cultivo fue decantado y las células fueron sometidas a lisis mecánica, agregando 0.3 g de perlas de vidrio (Ballotini 0.5 μ diámetro), 200 μ L de regulador de lisis (Tritón X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM) y 200 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). La muestra se agitó vigorosamente en vortex durante 20 min que comprendieron 20 ciclos con pulsos de 30 seg en agitación y 30 seg en baño de hielo. Se adicionaron 200 μ L de regulador TE (Tris 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM) y se sometió a centrifugación.

La fase acuosa se transfirió a otro tubo de 1.5 mL al que se le agregaron 200 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), nuevamente se agitó en vortex por 30 segundos y se centrifugó. El sobrenadante se recuperó y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto, enfriado a -20 °C. La muestra se incubó a -20 °C durante 2 h, se centrifugó y eliminó el etanol residual se dejó evaporar a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en 400 μ L de regulador TE y se trató con 10 μ g RNAsa (Gibco BRL) a partir de una solución patrón de 10 mg mL^{-1} en Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5 y NaCl 0.015 M. La mezcla fue incubada a 37 °C, durante 15 min, posteriormente, el DNA fue precipitado con 10 μ L de acetato de amonio 4 M y dos volúmenes de etanol absoluto, a continuación se mezcló por inversión y se incubó a -20 °C durante 2 h, el etanol absoluto fue decantado y la pastilla de DNA fue lavada con 500 μ L de etanol al 75%.

Finalmente, el DNA fue resuspendido en 20 μL de agua ultra pura e incubado a 50°C durante 10 min. El DNA se almacenó a -20°C. La concentración y pureza del DNA se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y considerando que 1U A_{260} equivale a 50 g mL^{-1} de DNA de doble cadena. La calidad del DNA se determinó por la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} .

III.2.3. Amplificación del gen 18S rDNA por PCR.

La amplificación del gen 18S rDNA se usó como gen blanco para la identificación molecular de la cepa aislada. La amplificación fue realizada empleando los iniciadores universales LV1 (oligo sentido; diseñado a partir de la secuencia de la cadena 5'-3') y LV2 (oligo antisentido; diseñado a partir de la secuencia de la cadena 3'-5') diseñados por Bautista-Muñoz *et al.*, 2005:

- 1) LV-1: 5' CCT GCC AGT AGT CAT ATG CTT GTC T 3'
- 2) LV-2: 5' CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC GAC T 3'

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo con 10 ng del DNA molde, en un volumen final de 25 μL bajo la siguiente formulación: 16.3 μL de agua grado PCR, regulador de reacción 1X, MgCl_2 2mM, dNTPs 200 mM, iniciadores 0.4 mM y 1U de Taq DNA polimerasa. El DNA fue amplificado en un termociclador Techgene® con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de una desnaturalización a 94 °C por 1 min; alineamiento a 67°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 5 min (Bautista-Muñoz *et al.*, 2005).

III.2.4. Electroforesis en geles de agarosa.

Los fragmentos de DNA amplificados fueron sometidos a electroforesis convencional en geles de agarosa, siguiendo el método descrito por Meyers *et al.*, (1976). Se prepararon geles horizontales de agarosa al 1% en regulador TAE 1X (Tris Base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM). El corrimiento electroforético fue llevado a cabo a 100 V, durante 1 h. El gel fue teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en regulador TAE 1X, durante 15 min. Finalmente los geles fueron expuestos a luz UV en un transiluminador UV/Vis (MiniBis, Bio Imaging Systems), para

visualizar los fragmentos de DNA amplificados. El tamaño de los fragmentos de DNA amplificados fue calculado por comparación con un marcador de DNA de talla molecular de 1000 pb (Invitrogen) y con la ayuda del programa Sigma Gel Versión 1.0 (Jandel Scientific Co., 1995).

III.2.5. Purificación de los fragmentos de DNA amplificados.

Los fragmentos de DNA amplificados fueron purificados empleando el kit Ultraclean™ Gel Spin™ DNA Purification, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El DNA fue eluído con 50 µL de agua grado PCR.

III.2.6. Secuenciación del DNA purificado.

El producto de PCR purificado fue enviado a secuenciar al Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos. Las secuencias de DNA fueron analizadas con el software Chromas Versión 2.31 (Technelysium Pty Ltd.) y alineadas con las secuencias depositadas en la base de datos de la NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov).

III.2.7. Alineamiento múltiple de secuencias de genes 18S rDNA descritas.

Las secuencias nucleotídicas codificantes de genes 18S rDNA de hongos descritas y depositadas en la base de datos de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), fueron alineadas con las secuencias de los fragmentos amplificados de la cepa MRO1 aislada. Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas se realizaron con el programa CLUSTAL X versión 1.8 (Thompson, *et al.*, 1997). La edición de los alineamientos se realizó con el programa GeneDoc versión 2.3 (Nicholas, *et al.*, 1997). El alineamiento gráfico mostró las regiones con un alto grado de identidad.

III.2.8. Relaciones de similitud entre las secuencias de genes 18S rDNA descritas.

Los alineamientos múltiples de secuencias de nucleótidos de genes 18S rDNA de especies del género *Moniliophthora* y otros hongos se realizaron con el programa CLUSTAL X versión 1.8.

Se efectuaron cinco alineamientos múltiples consecutivos y el último alineamiento fue usado para establecer un árbol de similitud con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) utilizando el método de agrupamiento de Neighbour-joining con el índice Poisson (P). Para valorarlo estadísticamente se hicieron 1000 aleatorizaciones tipo “bootstrap”.

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

III.3.1. Identificación molecular de la cepa MRO1.

III.3.1.1. Amplificación y secuencia nucleotídica del gen 18S rDNA.

Los iniciadores LV1 y LV2 específicos, fueron diseñados para amplificar el gen 18S del rDNA de hongos (Bautista-Muñoz *et al.*, 2005). Dichos iniciadores permitieron la amplificación de un fragmento de 3723 pb aproximadamente, a partir del DNA de la cepa MRO1 aislada (Figura 3).

El fragmento de DNA fue purificado y enviado a secuenciar por ambos lados utilizando los mismos iniciadores LV1 y LV2. La secuencia obtenida con el iniciador LV1 (sentido) fue de 254 pb (Figura 4) localizados hacía el extremo 5' del gen 18S rDNA; mientras que la secuencia obtenida con el iniciador LV2 (antisentido) fue de 441 pb, localizados hacia el extremo 3' del gen 18S rDNA (Figura 5).

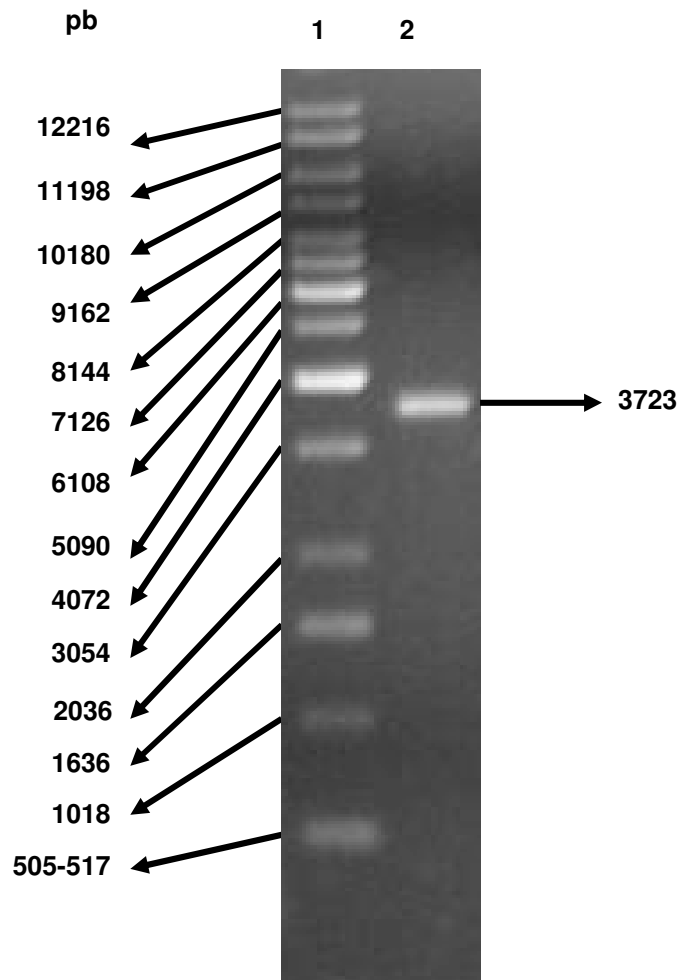


Figura 3. Amplificación por PCR del gen18S rDNA de la cepa MRO1 de *M. roveri*, aislada de mazorcas infectadas. 1. Marcador de talla molecular de DNA de 1 kb, 2. Fragmento de PCR.

```

1  CCAAAGATTA CGCATGCATG TCTAAGATCT CAGAGAGATA GTGAAACTGC GAATCTCCTC
61  ATTAGAGAGA TATAGTTTAT TTGATGATAC CTTGCTACAT GGATAACTGT GTCACCTCTA
121 GAGCTAATAC ATGCATTAAG GCCCCGACTT CTGGGAGGGG TGTATTTATT AGATAAAAAA
181 CCAACGCGGC TCGCCGCTCA CTTGGTGATT CATAATAACT TCACGAATCG AATGGCCTTG
241 TGCCGGCGAT GCTT

```

Figura 4. Secuencia nucleotídica de 254 pb localizadas hacia el extremo 5' del gen 18S rDNA de la cepa MRO1 de *M. roreri*, aislada de mazorcas infectadas. La numeración del lado izquierdo indica el número de bases nucleotídicas por línea.

```

1  TTTACTTCCT CTAATGACC AAGTTTGAAC CAACTTCTAC AAAAGACAGG GTGCCGTTGC
61  CCGCTCCCCG AAGCCAATCC GGAGACCTCA CTAAGCCATT CAATCGGTAG TAGCGACGGG
121 CGGTGGGGAC AAAGGGCAGG GACGTAATCA ACGCAAGCTG ATGACTTGCG CTTACTAGGT
181 ATTCTCGTT GAAGAGCAAT AATTGCAATG CTCTATCCCC AGCACGACAG AGTTTCACAA
241 GATTACCCAG ACCTTTCGGC CAAGGTGGAC ACTCGCTGGC TCTGTCAGTG TAGCGCGCGT
301 GCGGCCAGCA ACATCTAATG TTTTCACAGA CCTGTTATTG CCTCAAACCTT CCGTCAGCTA
361 GACGCTGACA GTCCCTCTAA GAAGACGGAG GCCAACCAAAA GTCGGCCTGT CTATTTACAG
421 GTTAAGGTCT CGTTCGTTAT C

```

Figura 5. Secuencia nucleotídica de 441 pb localizadas hacia el extremo 3' gen 18S rDNA de la cepa MRO1 de *M. roreri*, aislada de mazorcas infectadas. La numeración del lado izquierdo indica el número de bases nucleotídicas por línea.

III.3.1.2. Relaciones de similitud entre secuencias de genes 18S rDNA descritos.

El filograma (Figura 6), muestra las relaciones de similitud de las secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen 18S rDNA, amplificado a partir del DNA cromosómico de la cepa MRO1, aislada de mazorcas de cacao, con las secuencias nucleotídicas de los genes 18S rDNA descritas en *Cypellopsis anomala*, *Agaricales* sp., *Tricholomataceae* sp., *Tricholoma saponaceum*, *Exidia uvapsassa*, *Chlorophyllum agaricoides*, *Coprinus comatus*, *Flammulina velutipes*, *Macrolepiota dolichaula*, *Marasmius* sp. cepa MCA1577, *Marasmius* sp. cepa MCA1708, *Marasmius* sp. cepa MCA1611, *Marasmius* sp. cepa MCA1506, *M. alliaceus*, *M. rotula*, *M. oreades*, *Campanella* sp., *Chaetocalthus liliputianus*, *C. cf. columellifer*, *Crinipellis* sp., *C. zonata*, *Clitocybe subvelosa*, *Anthracophyllum archeri*, *Agrocybe erebia*, *Gymnopus contrarius*,

Omphalotus olearius, *O. olivascens*, *Xeromphalina campanella*, *Moniliophthora* sp. cepa MCA2500, *M. pernicioso* y *M. roreri* (Número de acceso de las secuencias en la base de datos de la NCBI: AF426949, AY445116, AY445117, AY654883, AY654890, AY657010, AY665772, AY665781, AY771602, AY916710, AY916719, AY916724, AY916732, AY787214, DQ113912, DQ457644, AY916669, AY916681, AY916685, AY916697, AY916691, DQ092913, DQ092915, DQ440631, DQ440643, DQ459374, DQ851577, DQ465344, AY916753, AY916739 y AY916745, respectivamente) (Figura 6).

El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó utilizando el índice P (Poisson) para medir las distancias genéticas. El método de agrupamiento para visualizar la relación entre las secuencias fue el de Neighbor-joining (Tamura *et al.*, 2007). La consistencia de las relaciones del filograma se efectuó realizando 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap. El árbol mostrado en la Figura 6, resultó ser el más consistente de 1000 árboles contruidos al azar.

Este árbol muestra que la secuencia nucleotídica del fragmento del gen 18S rDNA de la cepa MRO1, se agrupa con las secuencias nucleotídicas de las cepas del género *Moniliophthora*, y más estrechamente con la cepa de *Moniliophthora roreri* (No. de acceso AY916745), depositadas en la base de datos del GeneBank de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Las secuencias sentido y antisentido obtenidas con los iniciadores LV1 (oligo sentido) y LV2 (oligo antisentido) respectivamente, se alinearon con la secuencia del gen 18S rDNA de *M. roreri* (Número de acceso AY916745) con un porcentaje de similitud de 90% y 96%, respectivamente, mismo que se muestra en el Cuadro 2. Los porcentajes de similitud se refieren al número de bases idénticas entre el total de las bases comparadas cuando se analizan dos secuencias (secuencia a comparar y secuencia de referencia).

Cuadro 2. Porcentaje de similitud de las secuencias sentido y antisentido de un fragmento del gen 18S rDNA de MRO1 con las secuencias de referencia de los parientes más próximos.

Secuencia a comparar	Bases idénticas/ total de bases comparadas.	Identidad de las bases secuenciadas (%).	Parientes más próximos.
LV1 sentido	236/261	90	<i>Moniliophthora roreri</i> cepa C21
	232/259	89	<i>Raspinatus alboniger</i> RV/JM
	234/261	89	<i>Marasmius rotula</i> cepa AFTOL-ID 1505
	234/261	89	<i>Moniliophthora</i> sp. MCA2500
	234/261	89	<i>Crinipellis</i> sp. MCA 1527
	231/258	89	<i>Armillaria tabescens</i> cepa D290
	233/261	89	<i>Marasmius oreades</i> cepa AFTOL-ID 1559
	233/261	89	<i>Marasmius alliaceus</i> cepa AFTOL-ID 556
LV2 antisentido	428/442	96	<i>Moniliophthora roreri</i> cepa C21
	424/442	95	<i>Moniliophthora perniciosa</i> cepa DI571
	423/442	95	<i>Moniliophthora</i> sp. MCA2500
	422/442	95	<i>Crinipellis zonata</i> cepa OKM 25450
	419/442	94	<i>Marasmius oreades</i> cepa AFTOL-ID 1559
	419/442	94	<i>Marasmius</i> sp. MCA1708
	420/443	94	<i>Crinipellis</i> sp. VPI4021
	418/442	94	<i>Marasmius</i> sp. MCA 1506

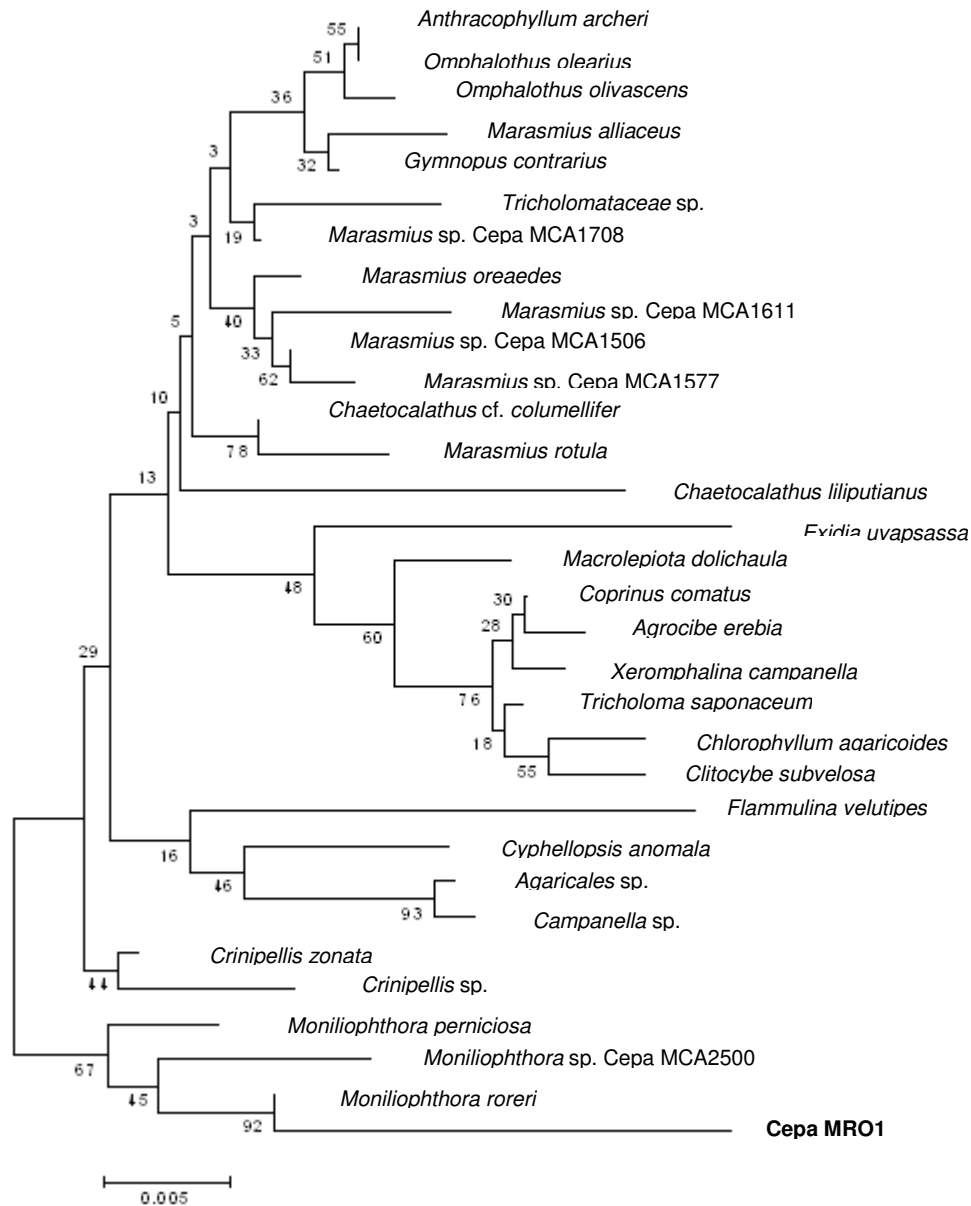


Figura 6. Relaciones de similitud de las secuencias nucleotídicas del gen 18S rDNA de la cepa MRO1 aislada de frutos de cacao y las secuencias nucleotídicas de los genes 18S rDNA de *Cypellopsis anomala*, *Agaricales* sp., *Tricholomataceae* sp., *Tricholoma saponaceum*, *Exidia uvapsassa*, *Chlorophyllum agaricoides*, *Coprinus comatus*, *Flammulina velutipes*, *Macrolepiota dolichaula*, *Marasmius* sp. cepa MCA1577, *Marasmius* sp. cepa MCA1708, *Marasmius* sp. cepa MCA1611, *Marasmius* sp. cepa MCA1506, *M. alliaceus*, *M. rotula*, *M. oreades*, *Campanella* sp., *Chaetocalthus liliputianus*, *C. cf. columellifer*, *Crinipellis* sp., *C. zonata*, *Clitocybe subvelosa*, *Anthracophyllum archeri*, *Agrocibe erebia*, *Gymnopus contrarius*, *Omphalotus olearius*, *O. olivascens*, *Xeromphalina campanella*, *Moniliophthora* sp. cepa MCA2500, *M. perniciosa* y *M. roreri* fueron comparados filogenéticamente con un análisis basado en los datos de sus secuencias nucleotídicas con 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap, por medio de métodos de distancia y usando el índice P (Poisson) y el método de agrupamiento de Neighbor-joining. La barra indica el número de cambios por cada 100 nucleótidos.

III.4. CONCLUSIÓN

Después de comparar la secuencia de un fragmento del gen 18S rDNA de la cepa MRO1 aislada, con las secuencias de DNA de genes 18S rDNA de hongos depositadas en la base de datos de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se logró identificar a la cepa MRO1 como *Moniliophthora roreri*.

III.5. LITERATURA CITADA

Aime M.C, Phillips-Mora W. 2005. The causal agents of witch's broom and frosty pod rot of cocoa (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*. 97: 1012-1022.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl. 1989. Current protocols in molecular biology. Greene publishing associates and Wiley-Interscience.

Bautista-Muñoz, C., Hernández-Rodríguez, C. y Villa-Tanaca, L. 2005. Analysis and expression of *STE13ca* gene encoding a putative X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Candida albicans*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 45:459-469.

Foster, D. M., Kozak, K. R., Loftus, M. G., Stevens, J. J., and Ross, I. K. 1993. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. *Mycological Research*. 97:769-781.

[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

López, A. P. A., V. H. Delgado N. y A. Azpeitia M. 1996. El cacao *Theobroma cacao* L. en Tabasco. INIFAP. Campo Experimental Huimanguillo. p 270.

Meyers, J. A., D. Sanchez, L. P. Elwell y S. Falkow. (1976). Simple agarose gel electroforetic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127:1529-1537.

Nicholas, KB., H. B. Nicholas, Derfield DW. II. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW NEWS*. 4:14.

- Phillips-Mora., W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.*, as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. PhD thesis. Department of Agricultural Botany, School of Plant Sciences. The University of Reading, RG6, UK.
- Phillips, M. W., A. Coutiño, C. F. Ortíz, A. P. López, J. Hernández and M. C. Aime. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in México. *Plant Pathology*. 55:584.
- Porrás U., V. H. y González L.C. 1984. Epifitiología de la moniliasis del cacao (*Monilia roreri*) y su relación con el ciclo de producción en la zona de Matina, Costa Rica. *Fitopatología*.19:78-84.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. 2a Edición. New York N. Y.
- Tamura K, Dudley J, Nei M y Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.
- Thompson, J. D., T. J.Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.

CAPITULO IV.
PROTEASAS ESPECÍFICAS E INESPECÍFICAS DEL HONGO *M. royeri*:
DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES ENZIMÁTICOS, LOCALIZACIÓN
SUBCELULAR Y EFECTO DE INHIBIDORES ESPECÍFICOS BAJO DIFERENTES
CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

IV.1. INTRODUCCIÓN.

Los hongos fitopatógenos, emplean diversas estrategias para infectar a su huésped. Se ha propuesto que el nivel de proteasas, refleja la adaptación de los hongos saprofitos o patógenos a los requerimientos de sus nichos ecológicos (St Leger *et al.*, 1997). Se ha investigado poco sobre la producción y función de las proteasas extracelulares en los hongos fitopatógenos. Algunos de los sistemas estudiados incluyen a *B. cinerea*, con la producción de una aspartil proteasa que es requerida para iniciar el crecimiento del hongo en el huésped (Movahedi y Heale, 1990). También se ha reportado, que el hongo *Pyrenopeziza brassicae*, produce una cisteín proteasa que es determinante para la patogenicidad de este hongo (Ball *et al.*, 1991).

Así mismo, se sabe que *F. culmorum*, produce una proteasa ácida, la cual, puede hidrolizar diversas proteínas vegetales (Urbanek y Yirdaw, 1984). En *S. sclerotiorum*, los genes *acp1* y *asps*, codifican una proteasa ácida y una aspartil proteasa, respectivamente, y se ha comprobado que dichas enzimas son expresadas durante el proceso de infección (Poussereau *et al.*, 2001a y 2001b). De igual forma, en *U. maydis*, se ha reportado la presencia de una proteasa ácida (*pumAe*) y una aminopetidasa (*pumAPE*), con probables implicaciones en la patogenicidad del hongo, interacción planta-patógeno, así como, la respuesta de adaptación al ambiente (Mercado-Flores, 2003 y 2004).

A la fecha, se conoce muy poco sobre la biología celular de *M. royeri*, el sistema proteolítico que lo conforma y los factores de patogenicidad y virulencia. En algunos hongos patógenos de humanos y plantas, las proteasas han sido descritas como factores de patogenicidad y virulencia (Cutler, 1991; Bordallo, *et al.*, 1984, Marits *et al.*,

1999, Zhang *et al.*, 1999, Urbanek y Kaczmare, 1985, Urbanek y Yirdaw, 1984, Clark *et al.*, 1997, Magee *et al.*, 1993, Monod *et al.*, 1984, Homberg, 1994, Mercado-Flores *et al.*, 2003b). Hasta el momento no existen reportes sobre proteasas producidas por *M. royeri*; las cuáles hipotetizamos que podrían estar involucradas en su proceso de patogénesis de forma similar a otros hongos (García-Alvarez *et al.*, 1985, Magazanik *et al.*, 2002, Hirsch *et al.*, 1989, Homberg, 1994, Mercado-Flores *et al.*, 2003b y 2004). Este fitopatógeno es de fácil crecimiento y accesible para trabajar con técnicas bioquímicas y de biología molecular.

Con el fin de eventualmente determinar si la producción de proteasas está asociada con el proceso de patogénesis de *M. royeri* en cacao, en este trabajo se realiza la búsqueda de las enzimas proteolíticas producidas por cepas de *M. royeri* aisladas a partir de mazorcas de cacao infectadas y se caracterizan bioquímicamente, para posteriormente asignar a las proteasas como las aspartil proteasas, un posible papel en la patogenicidad y las funciones celulares importantes para este hongo.

Para ello se plantearon como objetivos particulares:

- a) Evaluar el crecimiento celular de *M. royeri*, para con ello, relacionar la actividad específica de las actividades proteolíticas encontradas en los diferentes tiempos evaluados, es decir, si se presenta un incremento en la actividad proteolítica, poder descartar que dicho incremento se debe a un aumento en el número de células debido al crecimiento;
- b) Determinar la presencia y los niveles de las actividades proteolíticas de aspartil proteasa (mrAP), aminopeptidasa (mrAPE), carboxipeptidasa (mrCP), dipeptidil aminopeptidasa (mrDAP) del hongo *M. royeri*, bajo diferentes condiciones de crecimiento;
- c) Probar el efecto de diferentes inhibidores específicos para identificar las proteasas encontradas, y

d) Determinar la localización subcelular de las proteasas identificadas en *M. roreri* cultivado bajo diferentes condiciones de crecimiento para poder asignar una posible función en el proceso de patogénesis.

Las hipótesis planteadas fueron:

a) El crecimiento celular de *M. roreri* puede ser medido bajo diferentes condiciones de crecimiento y con ello obtener cinéticas de crecimiento celular;

b) El hongo *M. roreri*, puede expresar actividades proteolíticas de aspartil proteasa (mrAP), aminopeptidasa (mrAPE), carboxipeptidasa (mrCP) y dipeptidil aminopeptidasa (mrDAP), bajo diferentes condiciones de crecimiento, ya que estas se requieren para diversos procesos biológicos;

c) Las actividades proteolíticas intracelulares de aspartil proteasa (mrAP), aminopeptidasa (mrAPE), carboxipeptidasa (mrCP) y dipeptidil aminopeptidasa (mrDAP), producidas por *M. roreri*, pueden ser inhibidas por inhibidores específicos, y

d) Las actividades proteolíticas de aspartil proteasa (mrAP), aminopeptidasa (mrAPE), carboxipeptidasa (mrCP) y dipeptidil aminopeptidasa (mrDAP) detectadas en el hongo *M. roreri*, se localizan a nivel intracelular (en la fracción citoplásmica y membranal) y extracelular (en el medio de cultivo).

IV.2. MATERIALES Y METODOS.

IV.2.1. Microorganismos.

Este trabajo se realizó con la cepa de MRO1 de *Moniliophthora roreri*, aislada de un fruto enfermo de cacao, colectado en la Ranchería Platanal, Pichucalco, Chiapas y las siguientes cepas de referencia:

Candida albicans ATCC 10231.

Saccharomyces cerevisiae DBY (Universidad de Oviedo, España). Como controles positivos de los ensayos realizados.

IV.2.2. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo empleados a lo largo de este trabajo para la conservación y purificación específica de cepas de *M. roreri* fueron los siguientes:

Medio V8 enriquecido: Jugo V8 centrifugado 20%, CaCO_3 0.45%, asparagina 0.1%, Maltosa 2%, agua destilada para aforar a 1000 mL.

Medio mineral: buffer de fosfatos ($1.54 \text{ gL}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0.26 \text{ gL}^{-1} \text{ HPO}_4$), sales minerales y microelementos ($2.0 \text{ gL}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$, $0.4 \text{ gL}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$, $0.15 \text{ gL}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.02 \text{ gL}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.02 \text{ gL}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0.02 \text{ gL}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), dilución de hierro ($0.15 \text{ gL}^{-1} \text{ Fe}(\text{NH}_4)_2 \text{ SO}_4$), dilución de calcio ($1.10 \text{ gL}^{-1} \text{ CaCl}_2$), 30 g L^{-1} glucosa, 2 g L^{-1} extracto de levadura y 2 g L^{-1} peptona.

El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 6.0 con HCl. Los medios sólidos, fueron preparados agregando 2% de agar bacteriológico. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min.

IV.2.3. Conservación de cepas.

La cepa MRO1 de *M. roreri*, fue conservada a corto plazo a 4°C en placas de agar V8 enriquecido y mineral; y a largo plazo en glicerol al 25 % a -70°C , a partir de los medio líquidos de V8 enriquecido y mineral.

IV.2.4. Determinación del crecimiento celular de *M. roreri*.

IV.2.4.1 Preparación del pre-inoculo.

Las cepas de *M. roreri* se crecieron en cajas Petri, hasta alcanzar 8.5 cm de diámetro (15-21 días). Con la finalidad de propiciar la germinación de las esporas y el crecimiento micelial del hongo, se prepararon cultivos pre-inóculos a partir de una suspensión de esporas, agregando 5 mL de medio a cada caja Petri, y removiendo cuidadosamente los conidios con un pincel. La suspensión de esporas, fue transferida a un matraz de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo e incubada a 25°C , en un agitador orbital a 150 rpm durante 24 horas (Phillips-Mora, 2003). Posteriormente, las

esporas germinadas fueron contadas y los matraces fueron inoculados con una concentración de 1×10^6 esporas germinadas mL^{-1} (Lipa y Slizynki, 1973). Finalmente, los matraces fueron incubados a 25°C en agitación continua a 150 rpm bajo condiciones naturales de luz-oscuridad.

IV.2.4.2 Determinación de la proteína total de *M. royeri*.

El crecimiento celular de *M. royeri* fue estimado mediante la determinación de la proteína total en células lisadas (Mercado-Flores *et al.*, 2003b), según el método descrito por Lowry *et al.*, (1951). El hongo fue cultivado en matraces de 50 mL con 10 mL de medio de cultivo y el micelio fue cosechado a las 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h de incubación, por filtración al vacío con un sistema Millipore y papel Whatman número 3. Posteriormente, el paquete celular fue lavado dos veces con agua desionizada estéril y resuspendido en 5 mL de NaOH 1M, y llevado a un volumen final de 10 mL con agua desionizada estéril. La suspensión celular fue sometida a rompimiento mecánico en frío, utilizando un homogenizador Omni TH, realizando cuatro ciclos a baja velocidad y ocho ciclos a alta velocidad durante 30 seg cada uno, con intervalo de 30 seg en hielo. La suspensión celular fue sometida a ebullición durante 10 min, para finalmente realizar las determinaciones de proteína total. Las lecturas se hicieron a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer y se interpolaron en una curva de albúmina-sérica-bovina.

IV.2.4.3. Determinación de la biomasa de *M. royeri*.

La producción de biomasa de *M. royeri*, fue determinada inoculando matraces de 125 mL con 50 mL de medio de cultivo, y el micelio fue cosechado a las 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 144 y 168 h de incubación. El micelio fue cosechado por filtración al vacío con un sistema Millipore y papel Whatman número 3, secado en un horno Scorpion Cientific a 65°C durante 72 h. Finalmente, las muestras fueron pesadas en una balanza analítica.

IV.2.6. Cinéticas de producción de proteasas.

La preparación de los pre-inóculos se realizó como se describe en la sección II.2.4.1. Las cinéticas de producción de proteasas se siguieron a las 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas de incubación en los medios de cultivo mencionados, empleando matraces de 125 mL con 50 mL de medio de cultivo.

IV.2.7. Obtención de las fracciones extracelular e intracelular de *M. roreri*.

Dado que las proteasas producidas por los hongos pueden ser excretadas o localizarse intracelularmente, decidimos ensayar en los extractos intracelulares y extracelulares para determinar si las enzimas son intracelulares o secretadas al medio de cultivo. Para ello, las cepas se cosecharon a los tiempos indicados en cinética poblacional, para determinar el nivel de actividad en cada tiempo evaluado. La fracción extracelular correspondió al sobrenadante del medio de cultivo, el cual se obtuvo al filtrar el medio de cultivo con un sistema Millipore® y papel Whatman® número 3.

A continuación, las células se lavaron dos veces con 5 mL de regulador Tris-HCl 0.1 M pH 7.0 frío, y por cada gramo de peso húmedo se adicionó 2.5 mL de regulador Tris-HCl 0.1 M pH7.0 y se sometió a rompimiento mecánico en frío utilizando un homogenizador Omni TH International durante cuatro períodos de 30 seg a velocidad baja y cuatro periodos a velocidad alta, con 30 segundos de intervalo entre ellos en hielo. Posteriormente, la suspensión celular se sometió a un segundo evento de rompimiento mecánico, con 7.0 g de perlas de vidrio (Ballotini 0.45-0.50 m de diámetro) por cada gramo de peso húmedo inicial.

Nuevamente, la suspensión celular se sometió a rompimiento mecánico en vortex, mezclando vigorosamente durante ocho periodos de 30 seg, con 30 seg de intervalo en hielo entre ellos. A continuación, el extracto crudo se centrifugó durante 10 min a 10 000 rpm para obtener el extracto libre de células o fracción intracelular (S12,000 x g).

IV.2.8. Determinación de las proteasas de *M. royeri*.

IV.2.8.1. Determinación de la actividad enzimática de aspartil proteínasa (mrAP).

La actividad enzimática de aspartil proteínasa (mrAP), se determinó en microtubos de 1.5 mL, empleando 100 μ L de extracto enzimático y 400 μ L de albúmina sérica bovina al 0.5% (preparada en regulador de fosfatos-ácido cítrico 0.1 M pH 3.2), la mezcla se incubó a 37°C en baño de agua durante 30 minutos y se le adicionó 500 μ L de ácido tricloroacético al 10% frío, y posteriormente los tubos fueron centrifugados a 14 000 x g. La liberación de péptidos se determinó en el sobrenadante utilizando el método descrito por Lowry *et al.*, (1951) y se leyó a una λ de 660 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 1A. Las lecturas se interpolaron en una curva de tirosina (Saheki y Holzer, 1975).

Una unidad de actividad enzimática de mrAP, se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación del equivalente a un μ g de tirosina por minuto bajo las condiciones de ensayos descrita (Milewski *et al.*, 1994).

IV.2.8.2. Determinación de péptidos liberados por la técnica de Micro-Lowry.

Se adicionaron 200 μ L de muestra en tubos de vidrio, en agitación constante, 200 μ L de una solución de reactivo A ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%, Na_2CO_3 24%, NaOH 1 M, tartrato de sodio y potasio 2.7%). Los tubos fueron incubados por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron 1 000 μ l del reactivo B (Folín-agua en una proporción de 1:20) Lowry *et al.*, (1951). La mezcla se incubó durante 45 minutos a 37°C en baño de agua y los péptidos liberados se leyeron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 a una λ de 660 nm.

IV.2.8.3. Determinación de la actividad enzimática de dipeptidil aminopeptidasa (mrDAP) y aminopeptidasa (mrAPE).

En microtubos de 1.5 mL se mezclaron 100 μ L extractos enzimáticos, 120 μ L de agua destilada, 250 μ l de Tris-HCl 0.1 M pH 7 y 30 μ l de los sustratos: Lys-p-Nitroanilida 10 mM disuelto en agua destilada para la determinación de la actividad enzimática de

mrAPE o Ala-Pro-p-Nitroanilida 10 mM disuelto en agua destilada para la determinación de la actividad enzimática de mrDAP. Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C, en baño de agua durante 15 min y se les adicionaron 400 µL de ZnSO₄ al 5% y 100 µL de Ba(OH)₂ al 7.5% para detener la reacción. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante que contenía la p-Nitroanilina liberada, fue leído en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25, a una λ de 405 nm. Las absorbencias obtenidas fueron interpoladas en una curva de p-Nitroanilina (Hirsch *et al.*, 1988).

Una unidad de actividad enzimática de mrDAP y mrAPE, fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de p-Nitroanilina por min a 37°C y pH 7.0.

IV.2.8.4. Determinación de la actividad de carboxipeptidasa (mrCP).

En microtubos de 1.5 mL se mezclaron 100 µL de extractos enzimáticos, 250 µL de Tris-HCl 0.1 M pH 7.6, 25 µL de N-Bz-L-Tir- p-NA 25 mM como sustrato y 60 µL de SDS al 5%. Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C, en baño de agua durante 15 min y se les adicionaron 500 µL de ZnSO₄ al 5% y 100 µL de Ba(OH)₂ al 7.5% para detener la reacción. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante que contenía la p-Nitroanilina liberada, se leyó en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25, a una λ de 405 nm. Las absorbencias obtenidas fueron interpoladas en una curva de p-nitroanilina (Hirsch *et al.*, 1988).

Una unidad de actividad enzimática de mrCP, se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de p-Nitroanilina por min a 37°C y pH 7.0.

IV.2.8.5. Determinación de la proteína total.

La concentración de proteína total fue determinada por la técnica de Micro Markwell, siguiendo el protocolo de Lowry *et al.*, 1951, para lo cual se colocaron 300 µL de muestra en tubos de vidrio y posteriormente, se adicionaron en agitación constante, 1000 µL del reactivo A+B en una proporción 100:1 (Reactivo A: Na₂CO₃ 2%, NaOH 0.4% SDS 1%, Tartrato de sodio y potasio 0.16%; reactivo B: CuSO₄·5H₂O 4%). La

mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron 100 μ L de reactivo de Folín-agua en una proporción 1:1. La mezcla se incubó a 37°C en baño de agua tibia durante 45 minutos y los péptidos liberados se leyeron a una longitud de onda de 660 nm.

IV.2.9. Fraccionamiento y localización subcelular de las proteasas de *M. royeri* en las fracciones soluble y membranal.

Para el realizar fraccionamiento y determinar la localización celular de las proteasas en estudio, se siguió el protocolo descrito por Suárez *et al.*, (1981).

A partir de cultivos de 144h de incubación, se obtuvieron las fracciones extracelular (sobrenadante) e intracelular (extracto libre de células), tal y como se describe en el apartado II.2.7. A continuación, el extracto libre de células fue ultracentrifugado a 100 000 x *g* durante 2 h, obteniendo así, un sobrenadante y precipitado que corresponden a la fracción soluble o citoplasma y la fracción membranal, respectivamente (Mercado-Flores *et al.*, 2003b).

Finalmente, las diferentes actividades enzimáticas de mrAP, mrDAP, mrAPE y mrCP, fueron determinadas en ambas fracciones citoplásmica y membranal, siguiendo los métodos descritos en la sección II.2.8.

IV.2.10. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida para revelar la actividad enzimática de mrAPE, mrDAP y mrCP de *M. royeri*.

Las fracciones extracelular (sobrenadante) e intracelular (extracto libre de células) de *M. royeri* en donde se obtuvieron los mejores niveles de actividad enzimática de mrAPE, mrDAP y mrCP, fueron preparadas tal y como se describe en el apartado II.2.7. Las fracciones fueron sometidas a un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones no desnaturizantes, usando como regulador de corrimiento Tris-glicina (3g de Trizma base, 14.4g de glicina por litro de agua). La separación electroforética de las proteínas, se llevó a cabo a 200 Volts durante 1h.

La actividad enzimática de mrAPE, mrDAP y mrCP, se puso de manifiesto adicionando sobre el gel, una mezcla cromogénica preparada con 15 mL de regulador de fosfatos de potasio 10 mM pH 6.5, 0.75 ml del sustrato Ala-Pro-β-Naftilamida (10 mM), Lys-β-Naftilamida (10 mM) y N-Bz-L-Tir-β-Naftilamida, respectivamente, disuelto en dimetil sulfóxido al 30% y 0.758 ml de colorante Fast Garnet GBC (11 mg mL⁻¹) disuelto en dimetil sulfóxido al 50%.

El gel se incubó a 37°C hasta la aparición de bandas de color rojo intenso (aproximadamente de 2-4h), las cuales indican la presencia de la actividad enzimática de DAP (Suárez y Wolf, 1988).

IV.2.11. Ensayos de inhibición con inhibidores específicos de proteasas.

Las actividades enzimáticas de mrAPE, mrDAP, mrCP y mrAP de *M. roreri*, fueron ensayadas con diferentes inhibidores específicos de proteasas para determinar el tipo de proteasa encontrada (Cuadro 3) a las concentraciones indicadas (Cuadro 4).

Cuadro 3. Inhibidores específicos de proteasas y las actividades proteolíticas de mrAPE, mrDAP, mrCP y mrAP de *M. roreri* ensayadas.

Inhibidor	Actividad enzimática a inhibir
EDTA	mrAPE, mrDAP y mrCP
Pefabloc SC	mrDAP
1-10, fenantrolina	mrAPE, mrDAP y mrCP
Pepstatina A	mrAP
Bestatina	mrAPE
PMSF	mrCP

Cuadro 4. Inhibidores específicos de proteasas y las concentraciones utilizadas sobre las actividades proteolíticas de mrAPE, mrDAP, mrCP y mrAP de *M. royeri*.

Inhibidor	Tipo de proteasa que inhibe	Concentraciones utilizadas			
EDTA	Metalo-proteasas	0.0 mM	1.0 mM	10.0 mM	15.0 mM
Pefabloc SC	Serín-proteasas	0.0 mM	2.0 mM	4.0 mM	6.0 mM
1-10, fenantrolina	Metalo-proteasas	0.0 mM	1.0 mM	10.0 mM	15.0 mM
Pepstatina A	Aspartil-proteasas	0.0 μ M	0.5 μ M	1.0 μ M	2.0 μ M
Bestatina	Aspartil-proteasas	0.0 μ M	100 μ M	130 μ M	200 μ M
PMSF	Carboxipeptidasas	0.0 mM	0.5 mM	1.0 mM	5.0 mM

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los niveles de actividad enzimática específica de las proteasas intracelulares y extracelulares con actividad de mrAP, mrDAP, mrAPE y mrCP, fueron reportados como actividad enzimática específica en Umg^{-1} de Proteína total. Cabe mencionar que los datos reportados para cada una de las determinaciones, son el promedio de tres cinéticas de producción de proteasas, con tres repeticiones cada cinética.

IV.3.1. Crecimiento celular de *M. royeri*.

El crecimiento celular de *M. royeri* fue medido en los medios mencionados siguiendo dos metodologías diferentes basadas en la cuantificación de la proteína total reportada en mg mL^{-1} (Figura 7), así como la producción de biomasa medida en mg mL^{-1} de medio de cultivo, misma que se muestra en la Figura 8. Los datos mostrados indican que el mejor método para evaluar el crecimiento celular del hongo, fue a través de la cuantificación de la biomasa producida, siendo el medio de cultivo de V8 enriquecido, el medio en el cual se obtuvo la mayor concentración de biomasa.

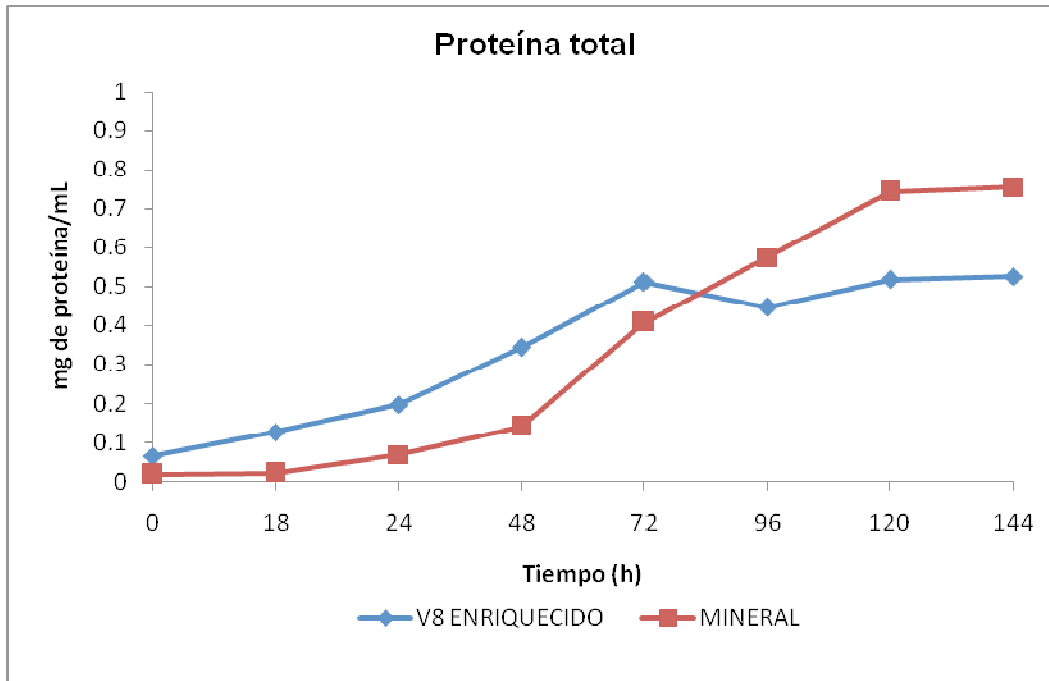


Figura 7. Crecimiento celular de *M. royeri* mediante la determinación de la proteína total del hongo cultivado en los medios V8 enriquecido y mineral.

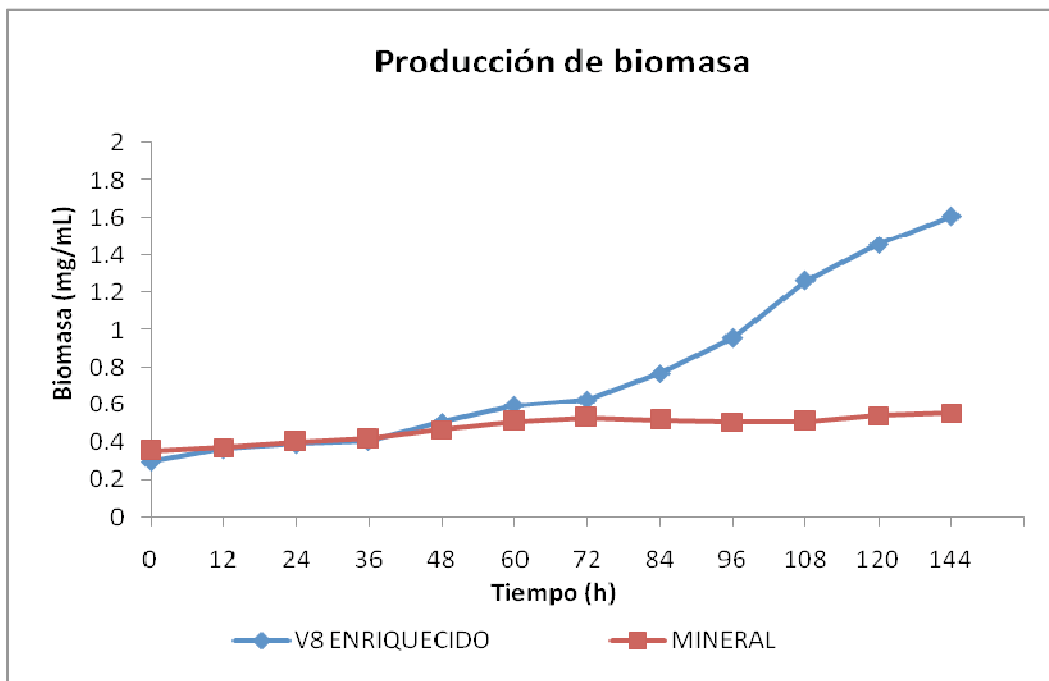


Figura 8. Crecimiento celular de *M. royeri* mediante la determinación de la biomasa del hongo cultivado en los medios V8 enriquecido y mineral.

IV.3.2. Actividad enzimática de mrAP.

IV.3.2.1. Determinación de la actividad enzimática intracelular y extracelular de mrAP.

La actividad enzimática de mrAP, fue encontrada en las fracciones intracelular y extracelular de *M. roreri* cultivado en los medios mencionados. Es importante mencionar que el mejor medio de cultivo para la síntesis de esta proteasa, fue el medio de cultivo mineral, siendo mayoritaria en la fracción extracelular, en donde alcanzó niveles de actividad enzimática específica de 34.23 Umg^{-1} de proteína total a las 144 h de incubación (Cuadro 5, Figuras 9 y 10), misma que correspondió a la fase estacionaria temprana del ciclo de crecimiento celular.

Con respecto al medio de cultivo V8 enriquecido, los niveles de actividad enzimática específica también fueron mayoritarios en la fracción extracelular, alcanzando niveles de 22.58 Umg^{-1} de proteína total, a las 144 h de incubación.

Cuadro 5. Actividad enzimática específica de proteinasa mrAP intracelular y extracelular en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.

Tiempo de incubación (h)	Actividad específica en Umg^{-1} de proteína			
	Medio mineral		Medio V8	
	Extracelular	Intracelular	Extracelular	Intracelular
0	3.73	4.11	8.06	2.38
24	5.42	2.83	8.27	2.93
48	7.08	15.00	11.41	3.34
72	1.03	3.33	19.33	4.37
96	24.82	6.55	4.49	1.86
120	29.42	8.44	17.01	1.68
144	34.23	3.42	22.58	1.73

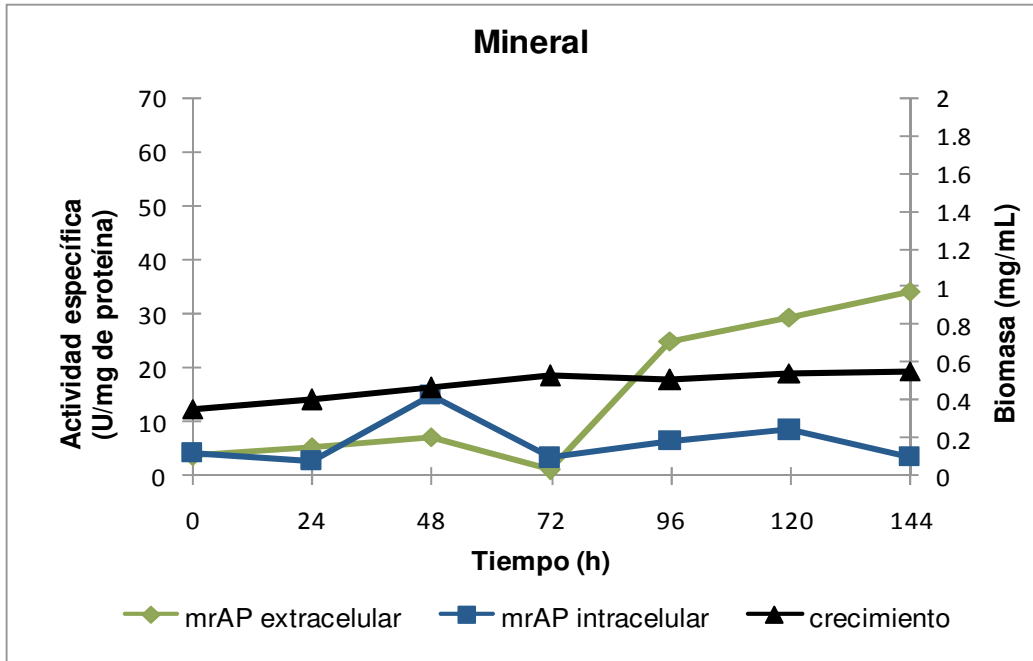


Figura 9. Cinética de producción de la proteinasa mrAP intracelular y extracelular de *M. roreri* en el medio de cultivo mineral. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

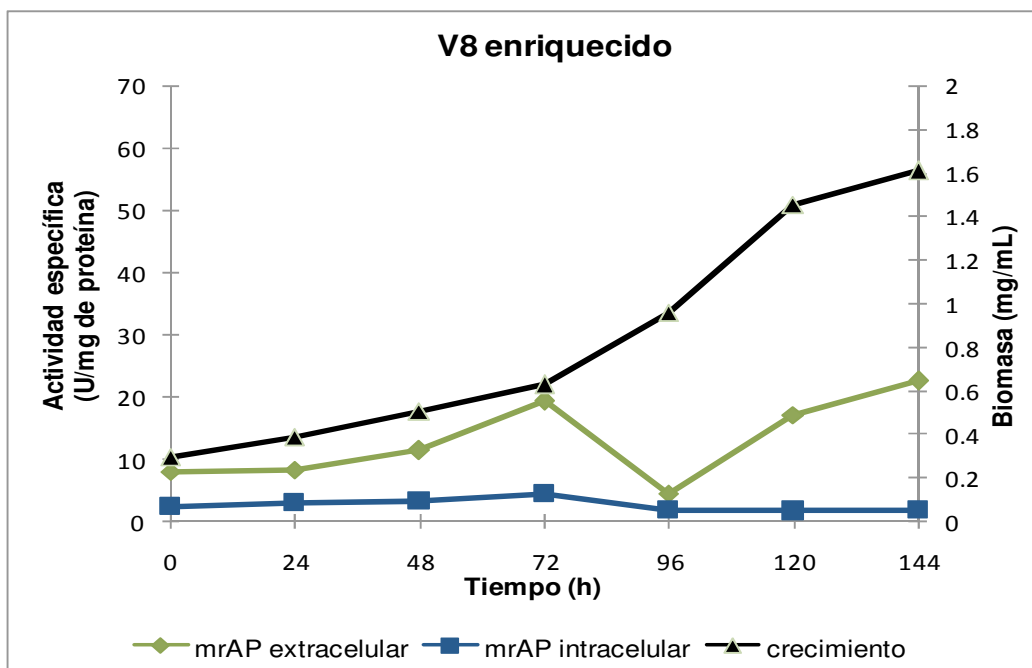


Figura 10. Cinética de producción de la proteinasa mrAP intracelular y extracelular de *M. roreri* en el medio de cultivo V8 enriquecido. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

IV.3.2.2. Ensayos de inhibición con inhibidor específico de proteasas mrAP.

La pepstatina A es un inhibidor específico de aspartil proteinasa, por lo cual se probó el efecto de este inhibidor sobre la actividad enzimática de mrAP intracelular y extracelular (Cuadro 6) ensayo que demuestra que la actividad enzimática de mrAP extracelular producida en ambos medios de cultivo, fue inhibida en un 99% (1% de actividad enzimática específica residual). Con respecto a la actividad enzimática de mrAP intracelular sintetizada en ambos medios de cultivo, hubo un porcentaje de inhibición del 66 y 63% (34 y 37% de actividad específica residual), respectivamente. Como es un inhibidor específico esto demuestra que la proteasa mrAP es una aspartil proteinasa. La curva dosis/respuesta es útil para calcular la concentración mínima de inhibidor necesaria para causar un efecto inhibitorio de la actividad enzimática de cada una de las proteasas ensayadas.

Cuadro 6. Actividad enzimática específica¹ de proteinasa mrAP intracelular y extracelular en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.

Inhibidor	Concentración del inhibidor	Mineral				V8 enriquecido			
		Intracelular		Extracelular		Intracelular		Extracelular	
		Actividad específica	% actividad residual	Actividad específica	% actividad residual	Actividad específica	% actividad residual	Actividad específica	% actividad residual
Sin inhibidor		18.48	100	40.52	100	13.56	100	72.58	100
Pepstatina A	0.5 µM	14.48	78	12.66	31	6.78	50	3.47	5
	1.0 µM	14.01	75	1.417	3	6.6	49	2.05	2
	2.0 µM	6.4	34	0.037	1	5.1	37	1.26	1

¹ Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

IV.3.3. Actividad enzimática de mrAPE.

IV.3.3.1. Determinación de la actividad enzimática intracelular y extracelular de mrAPE.

La actividad enzimática de mrAPE fue encontrada en las fracciones intracelular y extracelular de *M. royeri* cultivado en los medios de cultivo mencionados; sin embargo, el mejor medio de cultivo para la síntesis de esta proteasa, fue el medio de cultivo V8 enriquecido, siendo mayoritaria en la fracción extracelular a las 144 h de incubación, alcanzando niveles de actividad enzimática específica de 38.76 U mg^{-1} de proteína total.

Los niveles de actividad enzimática específica de mrAPE intracelular y extracelular en el medio de cultivo mineral, fueron casi idénticos en todos los puntos de la cinética de producción evaluada, alcanzando niveles de 30.73 y 29.07 U mg^{-1} de proteína total a las 144 h de incubación (Cuadro 7, Figuras 11 y 12).

Cuadro 7. Actividad enzimática específica de mrAPE intracelular y extracelular de *M. royeri* crecido en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.

Tiempo de incubación (h)	Actividad específica en U mg^{-1} de proteína			
	Medio mineral		Medio V8	
	Extracelular	Intracelular	Extracelular	Intracelular
0	1.48	3.52	11.41	3.93
24	4.14	6.33	27.25	6.19
48	6.15	9.65	37.14	17.26
72	12.10	13.96	29.36	9.73
96	14.45	11.45	23.89	8.16
120	24.53	17.70	30.12	11.56
144	30.73	29.07	38.76	12.91

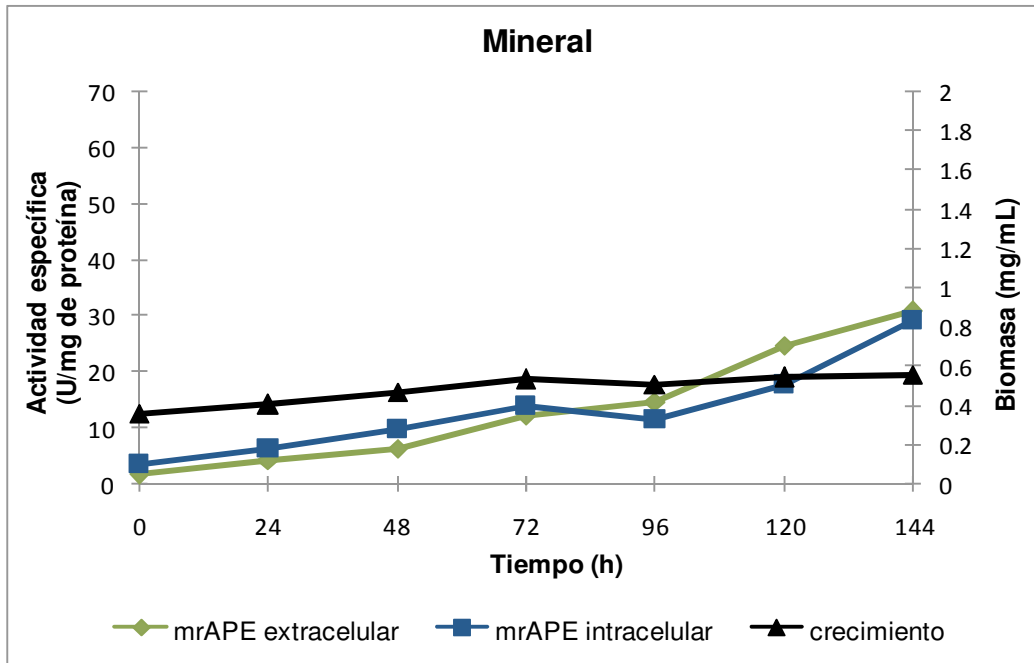


Figura 11. Cinética de producción de mrAPE intracelular y extracelular de *M. roleri* en el medio de cultivo mineral. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

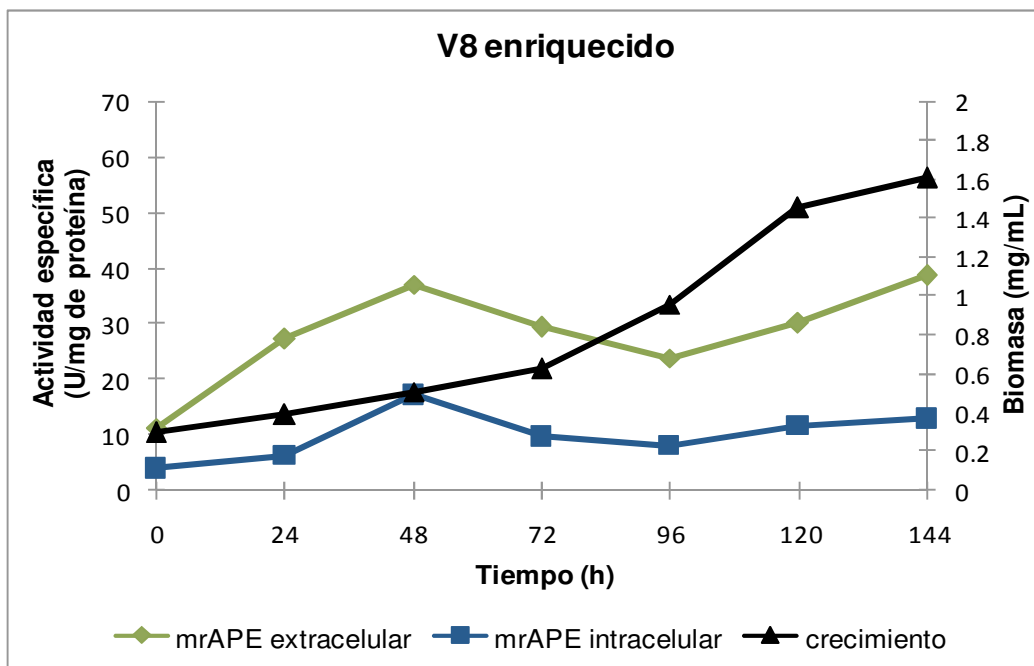


Figura 12. Cinética de producción de mrAPE intracelular y extracelular de *M. roleri* en el medio de cultivo V8 enriquecido. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

IV.3.3.2. Localización celular.

La localización celular de la actividad enzimática de mrAPE fue determinada en las fracciones citoplásmica y membranal del hongo cultivado en los medios mencionados, a las 144 h de incubación. Los resultados nos indican que esta enzima se expresa mayoritariamente en la fracción citoplásmica del hongo cultivado en el medio mineral, con niveles de 21.06 Umg^{-1} de proteína total (Cuadro 8, Figuras 13 y 14).

Cuadro 8. Actividad enzimática específica de mrAPE en la fracción citoplásmica y membranal de *M. roreri* crecido en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.

Medio de cultivo	Fracción celular	
	Membranal*	Citoplásmica*
V8 enriquecido	4.53	5.06
Mineral	10.66	21.60

*Los niveles de actividad enzimática específica de mrAPE en las fracciones citoplásmica y membranal, son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

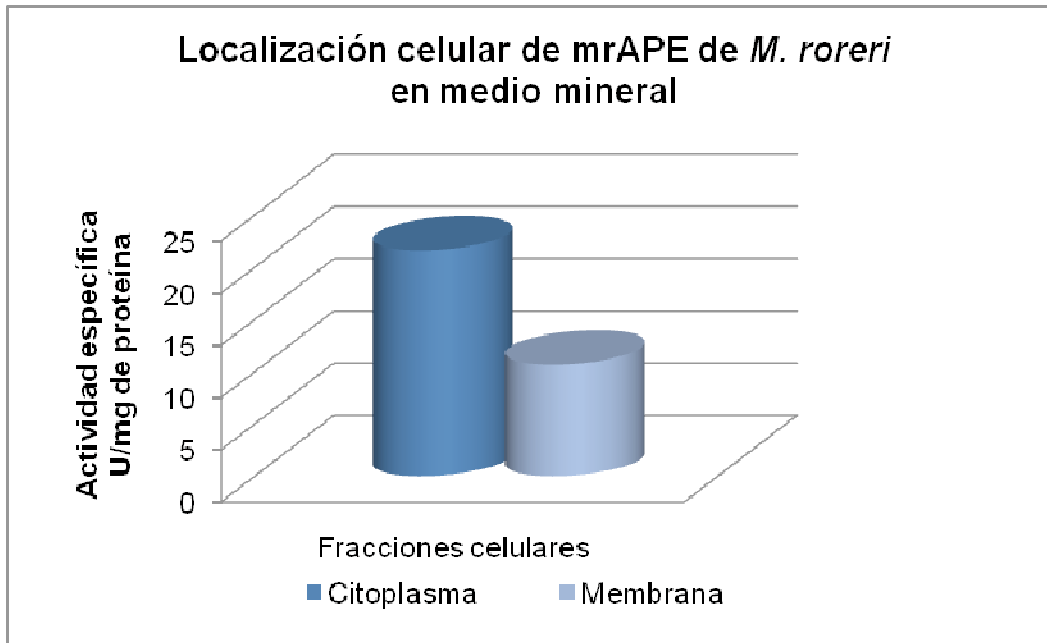


Figura 13. Localización celular de la actividad enzimática específica de mrAPE en la fracción citoplásmica y membranal de *M. roreri*, cultivado en el medio de cultivo mineral a las 144 h de incubación. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

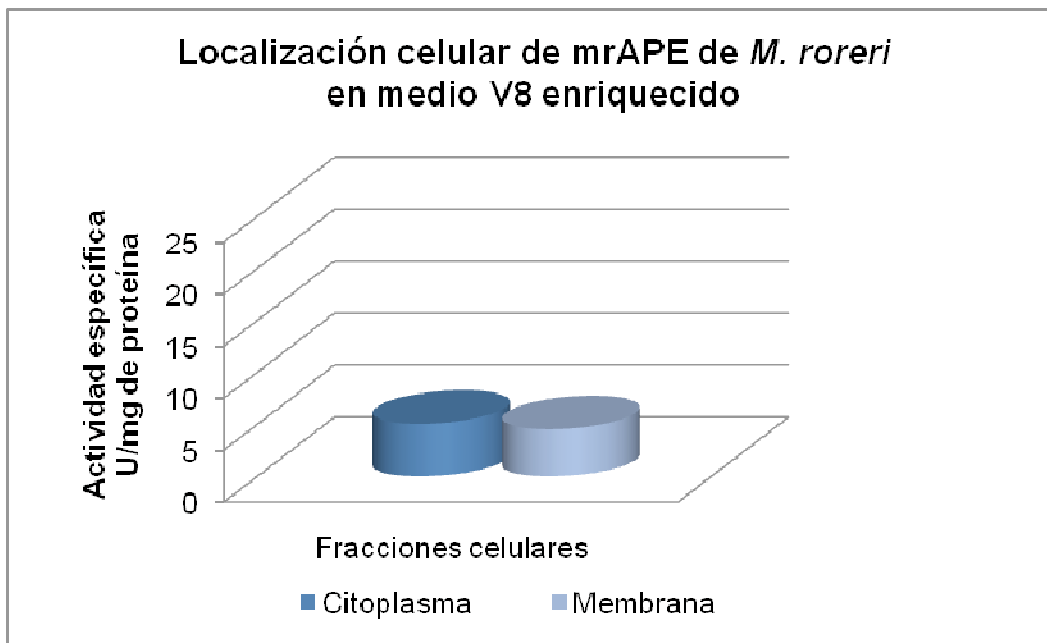


Figura 14. Localización celular de la actividad enzimática específica de mrAPE en la fracción citoplásmica y membranal de *M. roreri*, cultivado en el medio de cultivo V8 enriquecido a las 144 h de incubación. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

IV.3.3.3. Ensayos de inhibición con inhibidor específico de mrAPE.

La bestatina esta descrita como un inhibidor importante, pero no exclusivo de aminopeptidasas (Mercado-Flores *et al.*, 2003b). Los resultados mostrados en el Cuadro 9, indican que la actividad enzimática de mrAPE fue inhibida totalmente con bestatina en las fracciones extracelulares (0% de actividad enzimática específica residual), mientras que en la fracción intracelular se detecto un porcentaje de actividad enzimática específica residual del 5 y 2%, en los medios de cultivo mineral y V8 enriquecido, respectivamente (Cuadro 9).

El 1-10, fenantrolina, inhibió casi en su totalidad la actividad enzimática intracelular de mrAPE, detectándose un 7 % de actividad enzimática específica residual en ambos medios de cultivo (Cuadro 9).

El EDTA es un agente quelante que aunque inhibe la actividad enzimática, no es un inhibidor específico. Este quelante inhibió totalmente la actividad enzimática de mrAPE en la fracción extracelular del medio V8 enriquecido, y parcialmente en la fracción intracelular del mismo medio, con un 0% y 34% de actividad enzimática específica residual, respectivamente. Sin embargo, la actividad enzimática de mrAPE extracelular e intracelular en el medio mineral, sólo fue inhibida parcialmente, detectándose un 23 y 22% de actividad enzimática específica residual, respectivamente (Cuadro 9).

Los resultados mostrados en el Cuadro 9 indican que tanto el EDTA como 1-10, fenantrolina (agentes quelantes de iones metálicos divalentes) aumentaron la actividad de mrAPE extracelular obtenida en el medio V8 enriquecido. Los porcentajes de actividad obtenida fluctuaron desde 102% hasta 433%, pudiendo observar que a menor concentración de inhibidor mayor actividad enzimática de mrAPE. Una probable explicación de este efecto es discutido más adelante.

Cuadro 9. Efecto de la bestatina, 1-10, fenantrolina y EDTA sobre la actividad enzimática específica¹ de mrAPE intracelular y extracelular de un cultivo de 144h en medio mineral y V8 enriquecido.

Inhibidor	Concentración del inhibidor	Mineral				V8 enriquecido			
		Intracelular		Extracelular		Intracelular		Extracelular	
		Actividad específica	% actividad residual	Actividad específica	% actividad residual	Actividad específica	% actividad residual	Actividad específica	% actividad residual
Sin inhibidor		214.2750	100	123.4090	100	176.1700	100	7.35842	100
Bestatina	100 µM	43.4677	20	7.6271	6	87.7498	50	1.72811	23
	130 µM	26.5120	12	6.7408	5	29.2421	17	1.90185	26
	200 µM	11.3604	5	0	0	4.3539	2	0	0
1-10, fenantrolina	1.0 mM	43.5927	20	41.3804	34	222.6750	126	31.8679	433
	10.0 mM	22.7743	11	18.5688	15	31.2657	18	7.5071	102
	15.0 mM	15.0757	7	17.3267	14	11.5484	7	13.7877	187
EDTA	1.0 mM	111.0400	52	52.0849	42	151.1660	86	9.62541	131
	10.0 mM	62.9554	29	32.7345	27	94.3015	54	0.16724	2
	15.0 mM	47.2009	22	27.9475	23	69.1660	39	0	0

¹ Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

IV.3.4. Actividad enzimática de mrDAP.

IV.3.4.1. Determinación de la actividad enzimática intracelular y extracelular de mrDAP.

La actividad enzimática de mrDAP fue encontrada tanto en la fracción intracelular como extracelular del hongo cultivado en ambos medios de cultivo analizados. Es importante resaltar que los niveles detectados de actividad enzimática de mrDAP, fueron similares tanto en la fracción intracelular como extracelular de cada medio de cultivo. Sin embargo, los valores más altos de actividad enzimática de mrDAP, fueron detectados en el medio de cultivo V8 enriquecido, a las 96 h de incubación, alcanzando niveles de 64.57 Umg^{-1} de proteína total (Cuadro 10, Figuras 15 y 16).

Cuadro 10. Actividad enzimática específica de mrDAP intracelular y extracelular de *M. roreri* crecido en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.

Tiempo de incubación (h)	Actividad específica en Umg^{-1} de proteína			
	Medio mineral		Medio V8	
	Extracelular	Intracelular	Extracelular	Intracelular
0	4.52	1.53	11.43	31.39
24	7.97	10.10	37.78	30.08
48	7.30	18.96	27.75	26.33
72	12.19	19.85	38.67	31.09
96	15.61	18.78	27.89	64.57
120	21.83	24.43	49.73	59.62
144	23.29	40.93	57.81	43.11

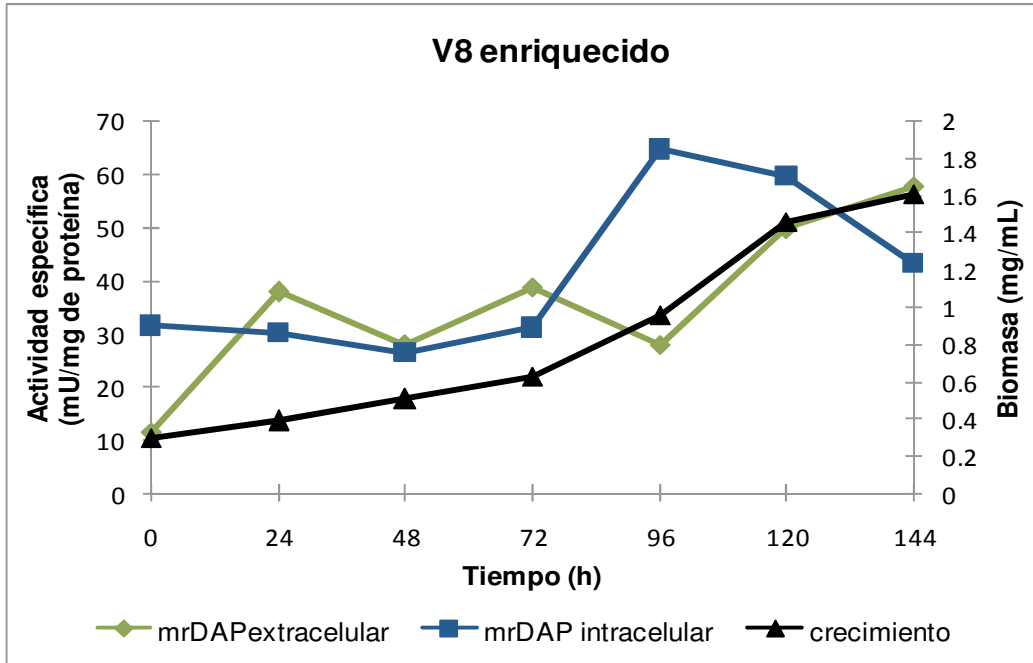


Figura 15. Cinética de producción de mrDAP intracelular y extracelular de *M. roreri* en el medio de cultivo V8 enriquecido. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Um^{-1} de Proteína total.

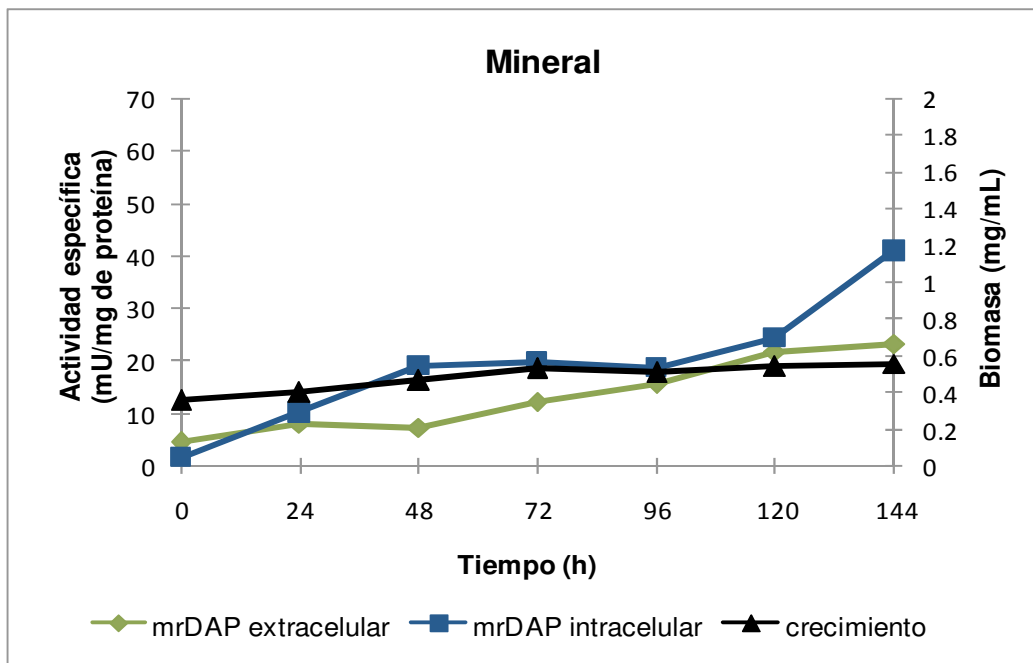


Figura 16. Cinética de producción de mrDAP intracelular y extracelular de *M. roreri* en el medio de cultivo mineral. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Um^{-1} de Proteína total.

IV.3.4.2. Localización celular y geles de actividad.

La localización celular de la actividad enzimática de mrDAP fue determinada en las fracciones citoplásmica y membranal del hongo cultivado en los medios mencionados, a las 144 h de incubación. Los resultados señalan que la actividad enzimática de mrDAP, se localizó tanto en la fracción membranal como en la citoplásmica, aunque la mayor actividad enzimática específica se obtuvo en ésta última. El mejor medio de cultivo para la expresión de dicha enzima, fue el medio mineral, en donde se encontraron los niveles más altos de actividad enzimática específica, alcanzando niveles de 19.16 Umg^{-1} de proteína total (Cuadro 11, Figuras 17 y 18).

Cuadro 11. Actividad enzimática específica de mrDAP en la fracción citoplásmica y membranal de *M. royeri* crecido en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.

Medio de cultivo	Fracción celular	
	Membranal*	Citoplásmica*
V8 enriquecido	1.91	2.64
Mineral	4.27	19.16

*Los niveles de actividad enzimática específica de mrAPE en las fracciones citoplásmica y membranal, son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

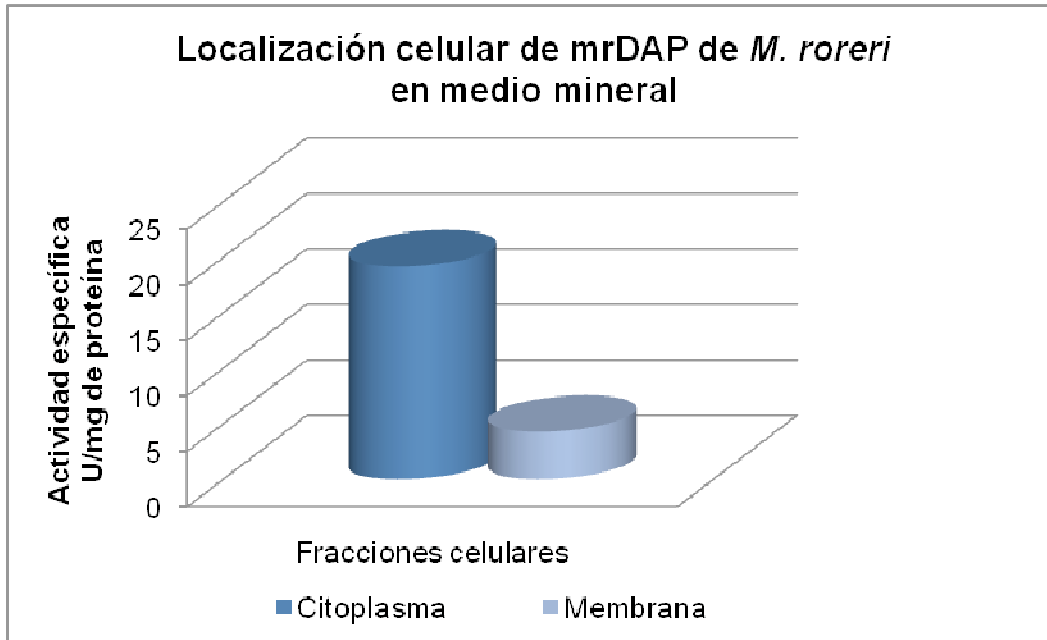


Figura 17. Localización celular de la actividad enzimática específica de mrDAP en la fracción citoplásmica y membranal de *M. roreri*, cultivado en el medio de cultivo mineral a las 144 h de incubación. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

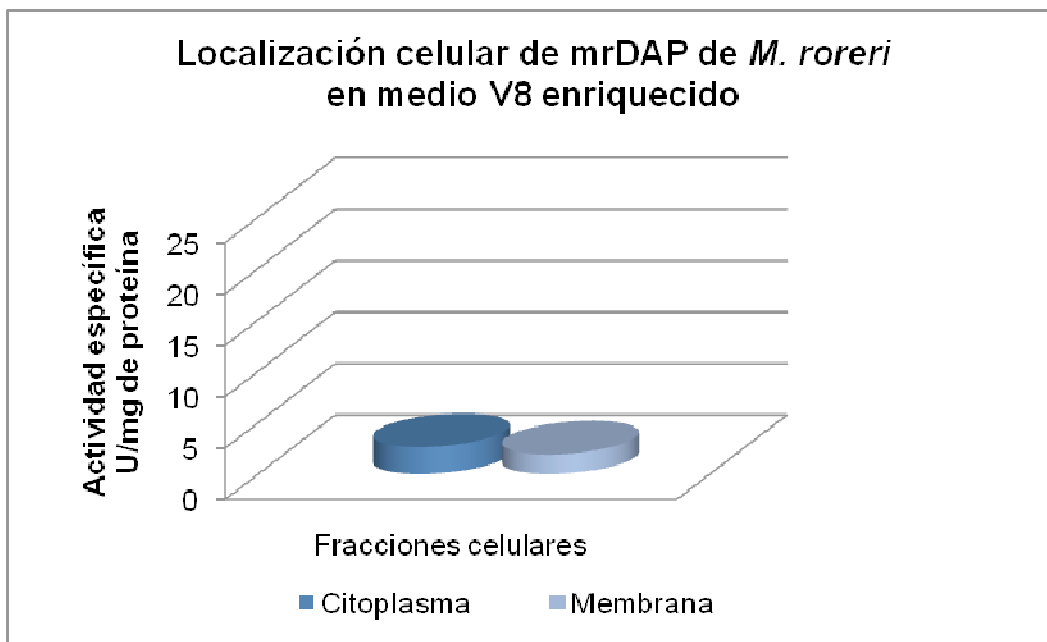


Figura 18. Localización celular de la actividad enzimática específica de mrDAP en la fracción citoplásmica y membranal de *M. roreri*, cultivado en el medio de cultivo V8 enriquecido a las 144 h de incubación. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

Ambas fracciones intracelular y extracelular de *M. roreri* cultivado en el medio V8 enriquecido durante 144 h de incubación, fueron sometidas a PAGE en condiciones nativas y teñidos con el sustrato Ala-Pro- β -NphA. Este ensayo reveló la presencia de una banda de actividad enzimática de mrDAP en la fracción intracelular (Figura 19).



Figura 19. Gel de actividad enzimática de mrDAP, a partir de la fracción intracelular de *M. roreri* cultivado en el medio V8 enriquecido durante 144 h de incubación. La actividad enzimática de mrDAP fue detectada con el condiciones nativas con el sustrato Ala-Pro- β -NphA y Fast Garnet para revelar la actividad.

IV.3.4.3. Ensayos de inhibición con inhibidor específico de mrDAP.

El Pefabloc, esta descrito como un inhibidor específico de serín-proteasas (Mercado-Flores *et al.*, 2003b). Los resultados mostrados, indican que la actividad enzimática de mrDAP intracelular y extracelular obtenida en el medio V8 enriquecido, se inhibió completamente con Pefabloc (0% de actividad enzimática residual), mientras que la actividad enzimática de mrDAP intracelular obtenida en el medio mineral fue inhibida en un 87% (13% de actividad enzimática residual) (Cuadro 12).

El 1-10, fenantrolina, inhibió casi en su totalidad la actividad enzimática intracelular de mrDAP (6% de actividad enzimática específica residual) sintetizada en el medio de cultivo V8 enriquecido. Sin embargo, la actividad enzimática extracelular de mrDAP fue sobre-expresada, alcanzando un porcentaje de actividad específica residual de 135% (Cuadro 12).

El EDTA, no causó efectos inhibitorios importantes sobre la actividad enzimática de mrDAP intracelular en ambos medios de cultivo, sin embargo, en la fracción extracelular fue aumentada, alcanzando un 311% de actividad residual en el medio V8 enriquecido (Cuadro 12).

Cuadro 12. Efecto del EDTA, pefabloc SC y 1-10, fenantrolina sobre la actividad enzimática específica¹ de mrDAP intracelular y extracelular de un cultivo de 144h en medio mineral y V8 enriquecido.

Inhibidor	Concentración del inhibidor	Mineral				V8 enriquecido			
		Intracelular		Extracelular		Intracelular		Extracelular	
		Actividad específica	% actividad residual	Actividad específica	% actividad residual	Actividad específica	% actividad residual	Actividad específica	% actividad residual
Sin inhibidor		127.6260	100	34.9535	100	50.2158	100	7.5070	100
EDTA	1.0 mM	108.9420	85	33.4253	96	40.4712	81	7.3398	98
	10.0 mM	112.2550	88	36.7330	105	31.8116	63	9.5325	127
	15.0 mM	112.6840	88	47.5700	136	30.3811	61	23.357	311
Pefabloc	2.0 mM	38.7521	30	13.7469	39	11.7004	23	2.8244	38
	4.0 mM	32.5271	25	10.2997	29	6.5655	13	0	0
	6.0 mM	16.3439	13	13.3876	38	0	0	0	0
1-10, fenantrolina	1.0 mM	51.9612	41	14.2354	41	8.8530	18	10.117	135
	10.0 mM	47.9422	38	10.7463	31	6.8937	14	0	0
	15.0 mM	37.4660	29	9.4135	27	3.1721	6	0	0

¹ Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

IV.3.5. Actividad enzimática de mrCP.

II.3.5.1. Determinación de la actividad enzimática intracelular y extracelular de mrCP.

La actividad enzimática de mrCP fue encontrada en las fracciones intracelular y extracelular de *M. roreri* cultivado en los medio mencionados; sin embargo, el mejor medio para la síntesis de esta proteasa, fue el medio de cultivo V8 enriquecido, siendo mayoritaria en la fracción intracelular, alcanzando niveles de actividad enzimática específica desde 9.53 a 30.75 Umg^{-1} de proteína total a las 0 a 144 h de incubación, respectivamente (Cuadro 13, Figuras 20 y 21).

Los niveles de actividad enzimática de mrCP en el medio de cultivo mineral, fueron mayoritarios en la fracción intracelular, alcanzo niveles de 29.07 Umg^{-1} de proteína total a las 144 h de incubación (Cuadro 13, Figuras. 20 y 21).

Cuadro 13. Actividad enzimática específica de mrCP intracelular y extracelular de *M. roreri* crecido en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.

Tiempo de incubación (h)	Actividad específica en Umg^{-1} de proteína			
	Medio mineral		Medio V8	
	Extracelular	Intracelular	Extracelular	Intracelular
0	2.03	3.09	14.90	9.53
24	7.05	5.81	7.64	27.80
48	5.93	6.77	9.78	15.03
72	7.73	13.58	12.93	13.26
96	15.81	9.89	5.97	18.89
120	17.60	14.34	17.11	30.75
144	16.50	29.07	17.60	16.10

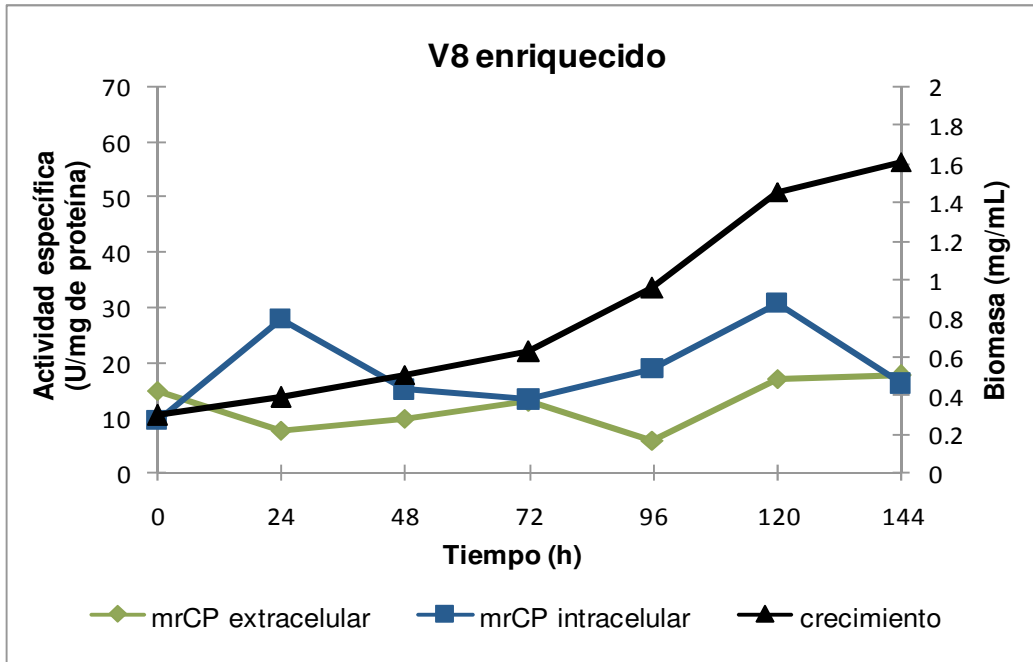


Figura 20. Cinética de producción de mrCP intracelular y extracelular de *M. royeri* en el medio de cultivo V8 enriquecido. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

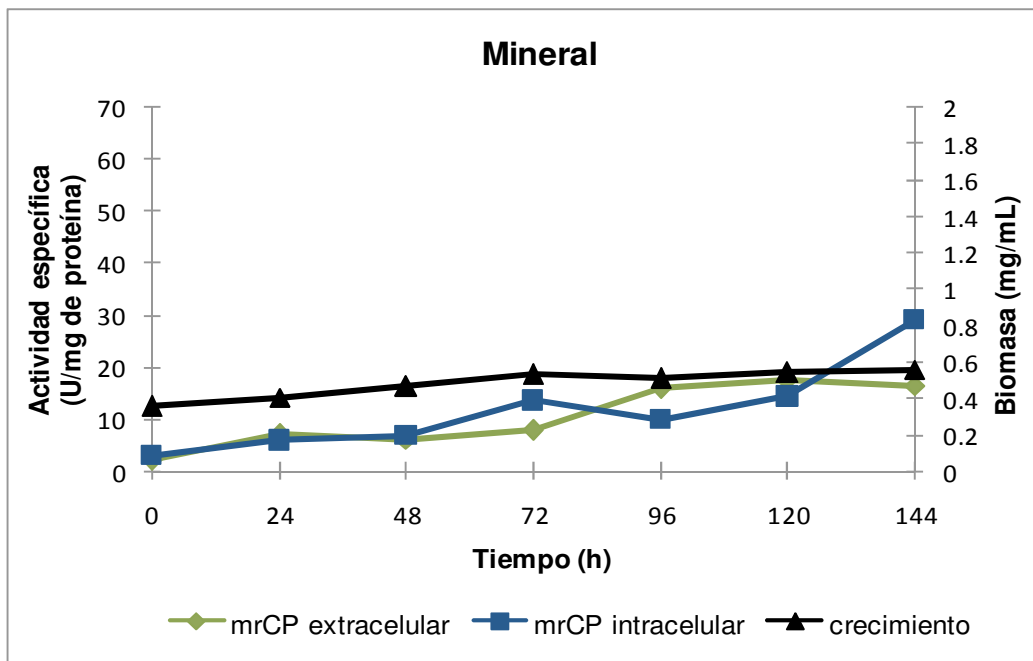


Figura 21. Cinética de producción de mrCP intracelular y extracelular de *M. royeri* en el medio de cultivo V8 enriquecido. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

IV.3.5.2. Localización celular.

La localización celular de la actividad enzimática de mrCP fue determinada en las fracciones citoplásmica y membranal del hongo cultivado en los medios mencionados, a las 144 h de incubación. Los resultados nos indican que los niveles de expresión de esta enzima, son muy similares en ambas fracciones del hongo, cultivado en el medio mineral, con niveles de 3.94 y 3.62 Umg^{-1} de proteína total. Sin embargo, en el medio V8 enriquecido, los niveles mayoritarios fueron en la fracción membranal en donde alcanzó niveles de 2.95 Umg^{-1} de proteína total, mientras que en la fracción citoplásmica los niveles alcanzaron 1.32 Umg^{-1} de proteína total (44.75% del nivel alcanzado en la fracción membranal (Cuadro 14, Figuras 22 y 23).

Cuadro 14. Actividad enzimática específica de mrCP en la fracción citoplásmica y membranal de *M. royeri* crecido en los medios de cultivo V8 enriquecido y mineral.

Medio de cultivo	Fracción celular	
	Membranal	Citoplásmica
V8 enriquecido	2.95	1.32
Mineral	3.94	3.62

*Los niveles de actividad enzimática específica de mrAPE en las fracciones citoplásmica y membranal, son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

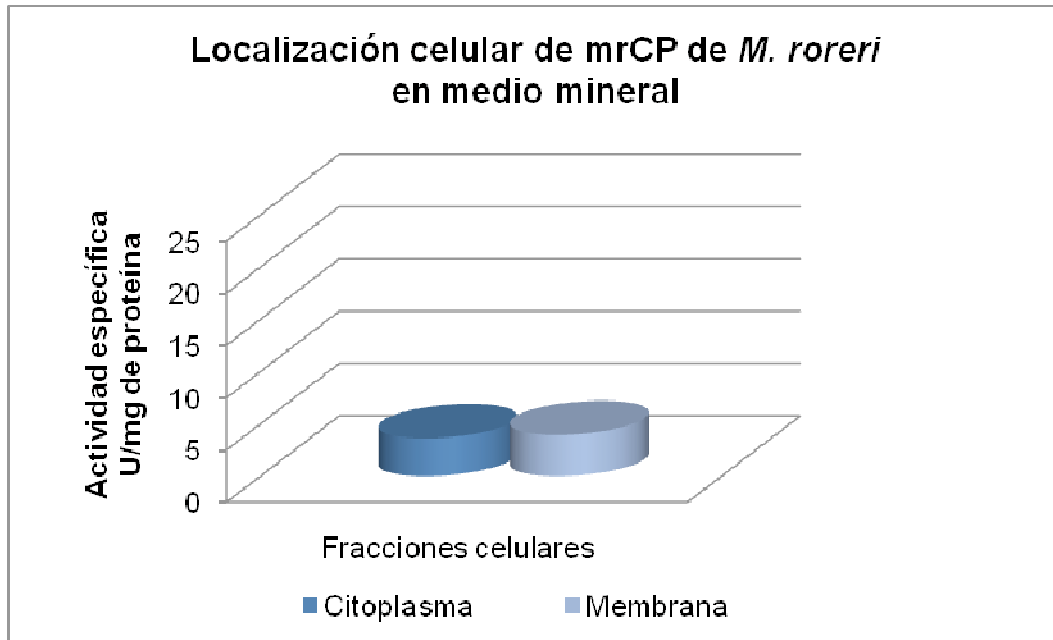


Figura 22. Localización celular de la actividad enzimática específica de mrCP en la fracción citoplásmica y membranal de *M. royeri*, cultivado en el medio de cultivo mineral a las 144 h de incubación. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

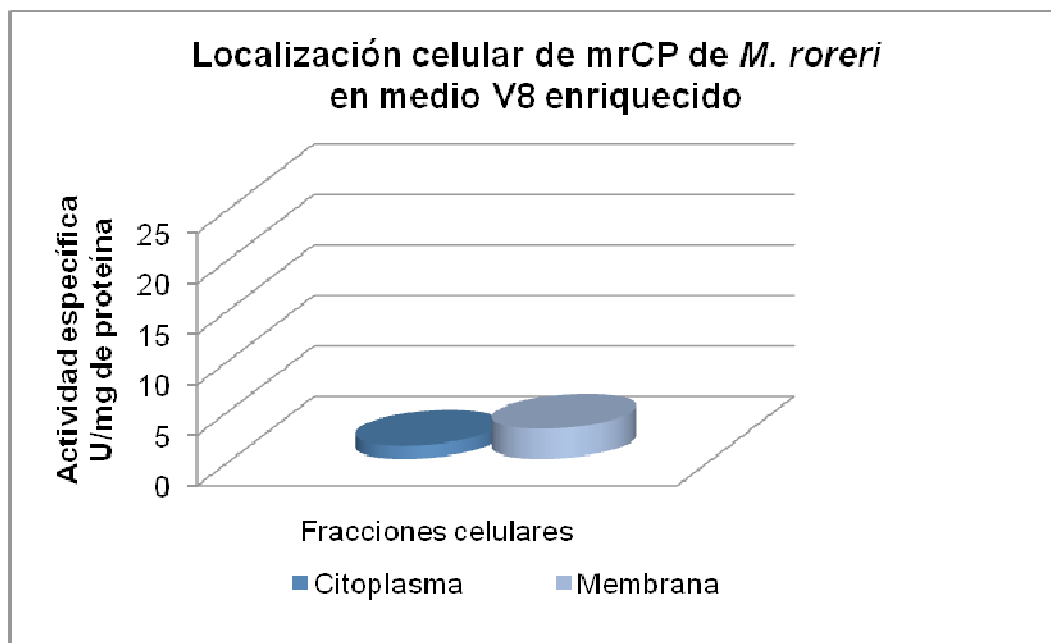


Figura 23. Localización celular de la actividad enzimática específica de mrCP en la fracción citoplásmica y membranal de *M. royeri*, cultivado en el medio de cultivo V8 enriquecido a las 144 h de incubación. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

IV.3.5.3. Ensayos de inhibición con inhibidor específico de mrCP.

El PMSF, esta descrito como un inhibidor de serín proteasas y algunas cisteín proteasas, pero no inhibe metaloproteasas (Mercado-Flores *et al.*, 2003b). Los resultados mostrados, indican que la actividad enzimática de mrCP intracelular obtenida en el medio V8 enriquecido, fue inhibida completamente por el PMSF (1% de actividad enzimática específica residual), mientras que la actividad enzimática de mrCP extracelular fue inhibida parcialmente% (70% de actividad enzimática específica residual).

Tanto el 1-10, fenantrolina, así como, el EDTA, inhibieron totalmente la actividad enzimática de mrCP intracelular obtenida en el medio V8 enriquecido (1% de actividad enzimática específica residual), mientras que la actividad enzimática de mrCP extracelular fue aumentada, alcanzando 325 y 308% de actividad enzimática específica residual. En el medio mineral, la actividad enzimática de mrCP extracelular e intracelular, fue inhibida parcialmente (Cuadro 15).

Cuadro 15. Efecto de inhibidores específicos de proteasas sobre la actividad enzimática específica¹ de mrCP intracelular y extracelular de un cultivo de 144h en medio mineral y V8.

Inhibidor	Concentración del inhibidor	Mineral				V8 enriquecido			
		Intracelular		Extracelular		Intracelular		Extracelular	
		Actividad específica	% actividad residual	Actividad específica	% actividad residual	Actividad específica	% actividad residual	Actividad específica	% actividad residual
Sin inhibidor		22.5600	100	26.7682	100	585.2153	100	3.4283	100
PMSF	0.5 mM	14.7542	65	22.3580	84	97.3424	17	5.7139	167
	1.0 mM	13.1823	58	16.0846	60	19.8209	3	4.9149	143
	5.0 mM	8.9132	40	15.2542	57	8.6181	1	2.4156	70
EDTA	1.0 mM	15.2186	67	19.2248	72	8.1620	1	5.5745	163
	10.0 mM	14.6961	65	12.0652	45	7.2704	1	5.2122	152
	15.0 mM	12.2847	54	11.7966	44	5.6498	1	11.1305	325
1-10, fenantrolina	1.0 mM	30.6426	136	36.7190	137	7.1322	1	10.5359	307
	10.0 mM	23.0780	102	32.1623	120	6.7590	1	7.1447	208
	15.0 mM	17.8845	79	25.7842	96	4.5544	1	3.7349	109

¹ Los niveles de actividad enzimática específica son dados en Umg^{-1} de Proteína total.

IV.3.6. Comparación de las actividades enzimáticas mrAP, mrAPE, mrDAP y mrCP producidas por *M. royeri*.

La comparación de los niveles de actividad enzimática de mrAP, mrAPE, mrDAP y mrCP intracelular (mrAP IC, mrAPE IC, mrDAP IC y mrCP IC) y extracelular (mrAP EC, mrAPE EC, mrDAP EC y mrCP EC) producida en los medios de cultivo mencionados, nos indica las actividades enzimáticas mayoritarias fueron mrDAP IC y mrDAP EC, así como mrCP EC, expresadas a lo largo del ciclo de crecimiento celular (Figura 24).

Con respecto a las proteasas producidas en el medio mineral, los mayores niveles de actividad enzimática fueron mrDAP IC, mrAP EC y mrAPE EC, exclusivamente durante la fase estacionaria temprana del ciclo de crecimiento celular (144 h de incubación) (Figura 25).

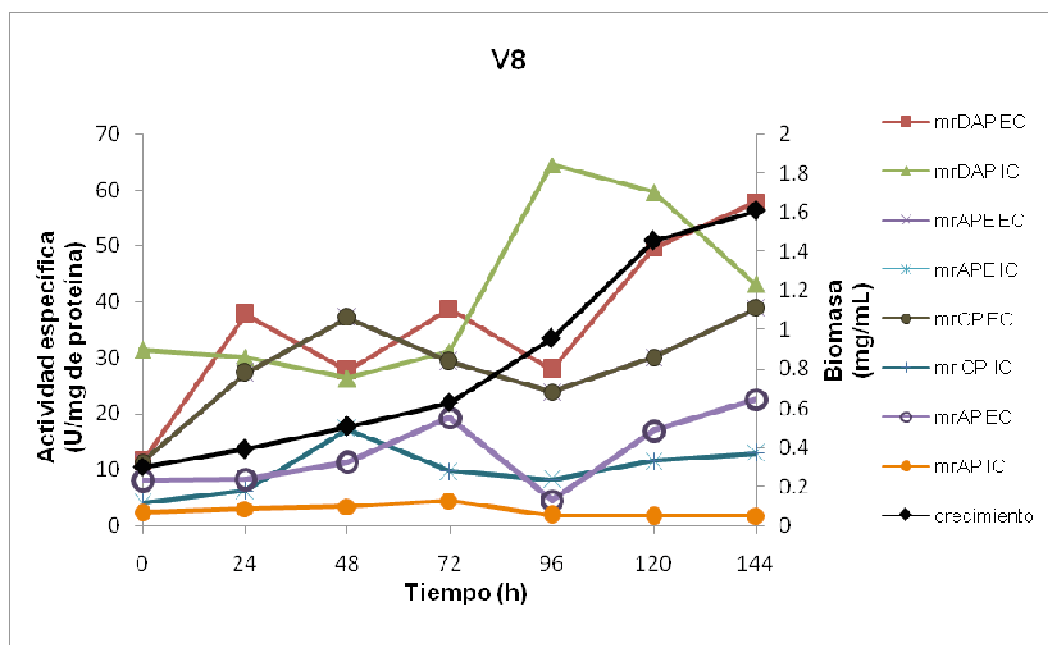


Figura 24. Cinéticas de producción de proteasas mrAP IC, mrAP EC, mrAPE IC, mrAPE EC, mrDAP IC, mrDAP EC, mrCP IC y mrCP EC de *M. royeri* en el medio de cultivo V8 enriquecido. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en $U \cdot mg^{-1}$ de Proteína total.

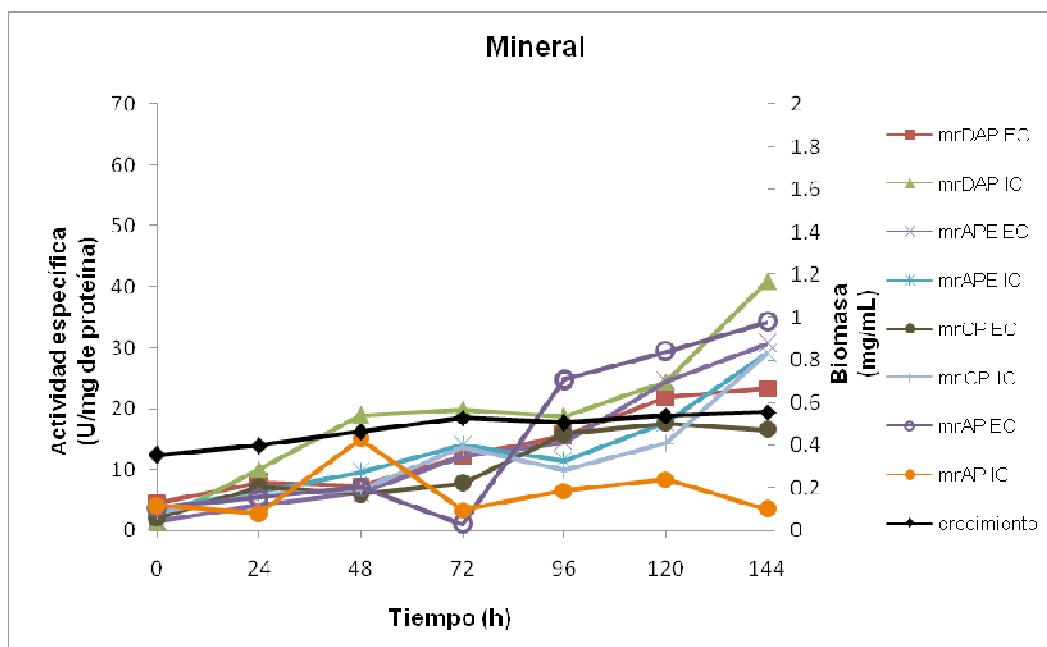


Figura 25. Cinéticas de producción de proteasas mrAP IC, mrAP EC, mrAPE IC, mrAPE EC, mrDAP IC, mrDAP EC, mrCP IC y mrCP EC de *M. royeri* en el medio de cultivo mineral. Los niveles de actividad enzimática específica son dados en $U\text{mg}^{-1}$ de Proteína total.

La moniliasis del cacao, es una enfermedad de reciente introducción a las regiones cacaoteras del sureste mexicano (Phillips-Mora *et al.*, 2006); y pese a que existen reportes desde 1918, se conoce muy poco sobre fitopatogenicidad del hongo y su planta hospedera, así como las actividades enzimáticas involucradas en la patogénesis, incluidas las proteasas producidas por este hongo. En general, el estudio de enzimas proteolíticas en hongos fitopatogénicos ha sido poco estudiado, y solamente algunos reportes sobre el tema, han aparecido en la literatura reciente (Mercado-Flores *et al.*, 2003a y 2003b; Poussereau N. *et al.*, 2001; Clark Sj *et al.*, 1997). Considerando la importancia del papel de las proteasas en múltiples aspectos biológicos de los hongos (Jones, 1991; Knop *et al.*, 1993; van den Hazle *et al.*, 1996, Rao *et al.*, 1988), y su posible papel en el proceso de patogénesis, en este trabajo, se analizaron algunas proteasas producidas por *M. royeri*, bajo diferentes condiciones de crecimiento, localización celular, así como el efecto de diferentes inhibidores específicos sobre las actividades ensayadas con la finalidad de determinar que tipo de proteasa está presente.

Nuestros esfuerzos iniciales por detectar las proteasas extracelulares e intracelulares de *M. royeri*, nos llevaron a investigar las actividades similares a éstas descritas en *S. cerevisiae*. El estudio de las proteasas de este trabajo, reveló que *M. royeri* presenta actividades proteolíticas similares a las reportadas en *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. tropicales* y *U. maydis*, entre otros (Monod *et al.*, 1994 y 2002; Hirsch *et al.*, 1988; Suarez-Rendueles *et al.*, 1991; Mercado-Flores *et al.*, 2003a, 2003b y 2004). De este modo, fue posible determinar la presencia y los niveles de las actividades enzimáticas extracelulares e intracelulares de mrDAP, mrAPE, mrCP y mrAP, presentes en *M. royeri*.

Con respecto a la actividad enzimática de mrAP, en *M. royeri* se encontró tanto actividad enzimática intracelular como extracelular. Los mayores niveles de actividad se encontraron en la fracción extracelular y durante en la fase estacionaria temprana de la curva de crecimiento celular, en ambos medios de cultivo. Por otro lado, actividad enzimática extracelular fue inhibida totalmente con pepstatina A (inhibidor específico de aspartil-proteasas), mientras que la actividad enzimática intracelular fue inhibida en un 65 y 62%. Lo anterior, nos puede indicar la presencia de una mezcla de enzimas con la misma actividad catalítica, es decir, activas a pH ácido, pero de tipo no aspartil proteasas. Es probable que *M. royeri* pudiera sintetizar más de una proteasa ácida secretada al medio, ya que como se mencionó anteriormente no hubo inhibición total con la Pepstatina A. Estos datos coinciden con lo encontrado en la proteinasa yumA de *U. maydis* (Mercado-Flores *et al.*, 2003b).

Probablemente, la actividad enzimática de mrAP intracelular, sea semejante a la yscA descrita en *S. cerevisiae*, la cual es una endopeptidasa soluble vacuolar que participa en la degradación de proteínas, en el metabolismo nitrogenado, como hidrolasa vacuolar y en procesamiento de los precursores (Suárez y Wolf, 1988). La actividad de proteínasa A intracelular también ha sido encontrada en levaduras, como *C. albicans*, *S. pombe* y *K. lactis* (Portillo y Gacedo, 1986, Suárez *et al.*, 1981 y Flores *et al.*, 1999).

La actividad enzimática de mrAPE se encontró en las fracciones intracelular y extracelular en los dos medios de cultivo estudiados. Los valores más altos de actividad específica se encontraron en la fracción extracelular producida en el medio V8. La localización celular de la actividad enzimática de mrAPE, nos indicó que esta enzima esta mayoritariamente asociada a la fracción citoplásmica.

La actividad enzimática extracelular de mrAPE producida en ambos medios de cultivo, fue totalmente inhibida con bestatina, 1-10, fenantrolina y EDTA, lo que nos confirma que la actividad enzimática detectada con el sustrato H-Lys-pNA, es realizada por enzimas APE y que son metaloproteasas. Por otro lado, la actividad enzimática extracelular de mrAPE producida en ambos medios de cultivo, fue inhibida parcialmente. Lo anterior indica que en la fracción intracelular del hongo, se sintetizan enzimas con actividad enzimática de APE y en menor proporción, también se sintetizan enzimas no APE pero que actúan sobre el sustrato ensayado.

Es importante señalar que tanto el EDTA como 1-10, fenantrolina no tuvieron efectos inhibitorios sobre la actividad extracelular de mrAPE obtenida en el medio V8 enriquecido. Por el contrario, la adición de estos agentes quelantes de iones metálicos divalentes, aumento la actividad enzimática de mrAPE extracelular hasta un 433%. Lo anterior sugiere, la existencia de otras proteasas que podrían estar participando en la regulación de esta enzima, mismas que podrían ser inhibidas por el EDTA y 1-10, fenantrolina (Mercado-Flores *et al.*, 2003b).

En un estudio reciente, realizado por Mercado-Flores *et al.*, 2003b), se reporto que *U. maydis* presenta al menos dos actividades yumAPE solubles (45 y 48 kDa), las cuales están asociadas únicamente a la fase exponencial de crecimiento y que son inhibidas con EDTA y 1-10, fenantrolina.

En *S. cerevisiae*, se ha descrito al menos 15 aminopeptidasas, entre las cuales se encuentran las metalo-sulfidril-proteasas APE ysc1 y APE yscCo dependientes de Zn^{+2} y Co^{+1} , respectivamente, cuyos niveles de actividad se incrementan cuando las células

entran en la fase estacionaria de crecimiento. De manera similar, a las APE's de *S. cerevisiae* reportadas, los datos encontrados para la actividad enzimática de APE de *M. roreri* en este trabajo, indican que dichas enzimas son metaloproteasas, que posiblemente haya más de una enzima APE y los niveles de actividad enzimática también se incrementan cuando las células entran en la fase estacionaria de crecimiento (Suárez y Wolf, 1988).

A diferencia de *S. cerevisiae*, en *S. pombe* se ha descrito una actividad enzimática de APE denominada yspl que está reportada como una enzima que presenta una gran actividad sobre aminoácidos básicos como la lisina (Suárez *et al.*, 1991). Nuestros ensayos fueron realizados con el sustrato cromogénico H-Lys-pNA, derivado de la lisina, sin embargo, es necesario realizar la purificación y caracterización bioquímica de las enzimas mrAPE's para saber cuáles son aminoácidos sobre los que actúan preferentemente.

Con respecto a la actividad enzimática de mrDAP, fue sorprendente encontrar actividad enzimática extracelular en *M. roreri*, debido a que en otros hongos como *C. albicans*, esta enzima solamente ha sido detectada en la fracción intracelular y asociada a las membranas vacuolares y del aparato de Golgi (Bautista-Muñoz *et al.*, 2005).

En *S. cerevisiae* se han encontrado al menos cinco dipeptidilaminopeptidasas, de las cuales las DAPs yscIV y yscV han sido caracterizadas (Suárez y Wolf, 1988). Sin embargo, la secuencia completa del genoma de esta levadura solo muestra la presencia de dos genes (*DAP2* y *STE13*) con actividad enzimática de DAP predicha (Bautista-Muñoz *et al.*, 2005; <http://www.sequence.stanford.edu/group/candida>).

A diferencia de *S. cerevisiae*, *S. pombe* produce sólo una dipeptidilaminopeptidasa termosensible y de igual manera, la secuencia del genoma completo de esta levadura, solo indica la existencia de un gen con función de dipeptidil aminopeptidasa (Suárez *et al.*, 1981; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Sin embargo, nuestros datos de inhibición sugieren que la actividad enzimática de mrDAP puede ser codificada por más de un gen.

Dado que la actividad enzimática intracelular de mrDAP detectada en el medio V8 enriquecido, fue totalmente inhibida con Pefabloc (inhibidor específico de serín-proteasas), podemos afirmar que la(s) enzima(s) DAP intracelular(es), son serín proteasas. Estos datos coinciden con lo reportado para *C. albicans* y *S. cerevisiae* (Bautista-Muñoz *et al.*, 2005; Bordallo *et al.*, 1984; Suárez y Wolf, 1988). Por otro lado, el resto de las actividades enzimáticas de mrDAP detectadas fueron parcialmente inhibidas.

Esta inhibición parcial probablemente se deba al efecto de estos inhibidores sobre una mezcla de enzimas con la misma actividad catalítica, de las cuales algunas podrían ser serín-metalo-proteasas y las otras cisteín-metalo-proteasas. Sin embargo, dado que no se realizaron ensayos con los inhibidores PMSF (inhibidor de serín proteasas y algunas cisteín proteasas, pero no inhibe metaloproteasas) y E-64 (inhibe cisteín proteasas), no se puede afirmar la existencia de cisteín proteasas. En *U. maydis*, esta reportado que las actividades enzimáticas yumDAP detectadas, son una mezcla serín-metalo-proteasas y cisteín-metalo-proteasas, debido a que los ensayos fueron realizados con los inhibidores PMSF y E-64 (Flores-Mercado *et al.*, 2003b).

Es importante mencionar que tanto el EDTA como 1,10, fenantrolina, son agentes quelantes de iones metálicos divalentes, por lo que son inhibidores no específicos de metaloproteasas. Dado que el uso del EDTA y 1,10, fenantrolina, no tuvieron efectos inhibitorios sobre la actividad extracelular de mrDAP obtenida en el medio V8 enriquecido, se sugiere la existencia de otras proteasas que podrían estar participando en la regulación de las enzimas mrDAP extracelulares sintetizadas en el medio V8 enriquecido, mismas que podrían estar siendo inhibidas por el EDTA y 1-10, fenantrolina (Mercado-Flores *et al.*, 2003b).

De manera contraria a los datos reportados para *U. maydis* y *C. dubliniensis* (Loaiza-Loeza, 2007; Mercado-Flores *et al.*, 2003b), en *M. roseri*, si pudimos detectar actividad enzimática de mrCP intracelular y extracelular en ambos medios de cultivo ensayados.

Los ensayos de inhibición con PMSF, 1-10, fenantrolina y EDTA, indicaron que las enzimas mrCP intracelulares y extracelulares detectadas en el medio de cultivo V8 enriquecido, podrían ser del tipo cisteín-metalo-proteasas. Sin embargo, faltaría probar el efecto del inhibidor E-64 (inhibidor específico de cisteín proteasas. Por otro lado, se ha descrito que en *S. cerevisiae*, la actividad enzimática de CP, está regulada por la presencia de un inhibidor endógeno (Lenney, 1975).

Dado que los ensayos enzimáticos preliminares resultaban nulos, se decidió agregar un agente desacoplante (desoxicolato de sodio) a la mezcla de reacción. Los resultados obtenidos nos indicaron que al igual que en *S. cerevisiae* y *C. dubliniensis* (Lenney, 1975; Loaiza-Loeza *et al.*, 2007), en *M. roseri*, existe un sistema enzima inhibidor para la CP de este hongo.

En *S. cerevisiae* y *C. albicans*, la enzima CP ha sido implicada en la maduración del factor sexual α (Achstetter y Wolf, 1985). Además, Se ha descrito que la levadura *C. albicans*, lleva a cabo un ciclo sexual durante la patogénesis (Magee y Magee, 2000; Hull *et al.*, 2000) por lo que sería importante realizar estudios dirigidos hacia la dilucidación de un ciclo sexual en *M. roseri*.

Los resultados indican que producción de las enzimas mrAP, mrAPE, mrDAP y mrCP, se ve afectada por el tipo de medio de cultivo empleado. Al respecto, se ha reportado que muchas especies fúngicas secretan proteasas cuando crecen en un medio conteniendo proteína como única fuente de nitrógeno (Reichard *et al.*, 1990; Togni *et al.*, 1991; Hube *et al.*, 1994; Mignon *et al.*, 1998b; Brouta *et al.*, 2001). Pequeñas moléculas tales como iones amonio y aminoácidos, reprimen los genes que codifican para estas proteasas. Sin embargo, muchas proteasas semejantes a varias proteasas aspárticas de *Candida* son secretadas en otras condiciones (Borg-von Zepelin *et al.*,

1998). Como se mencionó anteriormente, las proteasas mrAPE y mrDAP extracelulares, fueron mayoritariamente expresadas en el medio V8, el cual contiene jugo de verduras V8, CaCO₃, asparagina y maltosa. La proteasa mrCP extracelular fue igualmente expresada en los medios de cultivos V8 y mineral; mientras que la proteasa mrAP fue mayoritariamente expresada en el medio mineral. El medio mineral contiene buffer de fosfatos, algunas sales minerales y microelementos (NH₄NO₃ entre ellos), hierro, calcio, glucosa, extracto de levadura y peptona, y contrariamente a lo descrito, la actividad enzimática de mrAP no fue inhibida en los medios mencionados. La diferencia en los niveles de expresión obtenida en los medios de cultivo ensayos, nos sugiere que los genes codificantes de enzimas mrAP, mrAPE, mrDAP y mrCP en *M. royeri*, son regulados por las diferentes fuentes de nitrógeno y carbono probadas.

Sobre las proteasas secretadas por hongos patógenos, se ha descrito que muchas especies de hongos patógenos secretan proteasas “*in vitro*” o durante su infección. Las endoproteasas secretadas pertenecen a las aspartil proteasas de la familia de las pepsinas (familia A1), serin proteasas de la subfamilia subtilisina (S8A), y metaloproteasas de dos familias diferentes (M35 y M36). La proteasa aspártica no tipo pepsina de *Aspergillus niger*, y la proteasa única de *Coccidioides immitis*, han sido asignadas a este tipo de proteasas. Los hongos patógenos también secretan aminopeptidasas, carboxipeptidasas y dipeptidilpeptidasas (Monod *et al.*, 2002).

La función de las proteasas secretadas fúngicas y su importancia en las infecciones varía. Es evidente que las proteasas secretadas son importantes para la virulencia de los dermatofitos debido a que estos hongos crecen exclusivamente en el estrato corneo, uñas o cabellos, los cuales constituyen su fuente de carbono y nitrógeno (Simon y Green, 1985; Hohl *et al.*, 1995; Steinert y Marekow, 1995; 1997). Durante los últimos años, las actividades proteolíticas secretadas han atraído mucha atención como factores de virulencia potenciales de los hongos. Sin embargo, muchas de las investigaciones sobre el tema conciernen a *C. albicans* y *A. fumigatus*.

Las proteasas aspárticas secretadas por *Candida albicans*, están involucradas en los procesos de adherencia y penetración de tejidos, así como en las interacciones con el sistema inmune del huésped infectado. La familia de isoenzimas Sap de *C. albicans*, es una de las características de virulencia que le permite una mejor adaptación a las especies del género *Candida*, así como superar las barreras que el huésped le impone, a fin de causar infecciones de la mucosa y micosis profundas (Schaller *et al.*, 1999; Hube *et al.*, 1997; Sanglard *et al.*, 1997; De Bernardis *et al.*, 1999; Kretschmar *et al.*, 1999). En alcance a esta revisión, podemos decir que el estudio de enzimas proteolíticas en hongos fitopatógenos no ha sido descuidado, y existe en la literatura científica reportes recientes sobre el estudio de las proteasas en diversos hongos fitopatógenos y su probable implicación en la fitopatogénesis (Pekkarinen y Jones 2002, Pekkarinen y Jones 2003, Tian *et al.*, 2004, Dunaevskii *et al.*, 2006, Ilevleva *et al.*, 2006, Pekkarinen *et al.*, 2007, Quillis *et al.*, 2007, Tian *et al.*, 2007, Yoshida *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes que confirmen la verdadera función de las proteasas en la fitopatogénesis.

Como ya se mencionó, este trabajo fue realizado cultivando al hongo *M. royeri* en condiciones “*in vitro*”, por lo que las proteasas detectadas y los correspondiente niveles de actividad enzimática pueden ser diferentes durante el proceso de infección. Sin embargo, las verdaderas implicaciones de dichas proteasas en los diferentes procesos biológicos del hongo, incluyendo la patogénesis, solo podrán ser asignadas realizando experimentos como hibridación “*in situ*”, mutantes afectadas en los genes codificantes de las proteasas ensayadas, etc. Es importante aclarar que los ensayos de determinación de todas las actividades enzimáticas, fueron realizados previo paso de congelación y descongelación de los cultivos celulares. Este manejo nos dio como resultado, diferencias importantes en los valores de actividades enzimáticas específicas cuando los ensayos fueron realizados en fresco (inmediatamente después del término de cada periodo de incubación). Este efecto también se pudo observar durante los ensayos de inhibición (sin inhibidor). Lo anterior, nos indica que al igual que muchas enzimas, las ensayadas en este trabajo, también sufren inactivación con el proceso de congelación y descongelación.

IV.4. CONCLUSIONES.

1. En ambos medios ensayados, se encontró actividad enzimática intracelular y extracelular de mrDAP, mrAPE, mrCP y mrAP.
2. La actividad enzimática extracelular de mrAP sintetizada en ambos medios de cultivo, es producida por enzimas del tipo Aspartil proteasas ácidas y proteasas ácidas no aspartil que actúan sobre la albúmina sérica bovina como sustrato proteolítico.
3. La actividad enzimática intracelular de mrAP sintetizada en ambos medios de cultivo, es producida por una mezcla de enzimas del tipo Aspartil proteasas ácidas y proteasas ácidas no aspartil que actúan sobre la albúmina sérica bovina como sustrato proteolítico.
4. La actividad enzimática extracelular de mrAPE sintetizada en ambos medios de cultivo, es producida por una mezcla de enzimas de tipo metaloproteasas que actúan sobre la H-Lys-pNA como sustrato proteolítico.
5. La actividad enzimática intracelular de mrAPE sintetizada en ambos medios de cultivo, es producida por una mezcla de enzimas del tipo metaloproteasas y en menor proporción, también se sintetizan enzimas no APE pero que actúan sobre la H-Lys-pNA como sustrato proteolítico.
6. La actividad enzimática intracelular de mrDAP sintetizada en el medio V8 enriquecido, es producida por enzimas de tipo serín proteasas que actúan sobre H-Ala-Pro-pNA como sustrato proteolítico.

7. La actividad enzimática extracelular de mrDAP sintetizada en el medio V8 enriquecido, así como las actividades enzimáticas extracelular e intracelular de mrDAP sintetizada en el medio mineral fue producida por una mezcla de enzimas de tipo serín-metallo-proteasas y cisteín-metallo-proteasas que actúan sobre H-Ala-Pro-pNA como sustrato proteolítico.
8. La actividad enzimática de mrCP intracelular y extracelular detectadas en el medio de cultivo V8 enriquecido, podría ser producida por enzimas de tipo cisteín-metallo-proteasas.
9. La actividad enzimática de mrCP, está regulada por la presencia de un inhibidor endógeno.
10. Bajo las condiciones ensayadas, las proteasas más abundantes resultaron ser mrDAP extracelular, mrDAP intracelular y mrCP extracelular del hongo *M. roreri* crecido en el medio V8 enriquecido.

IV.5. LITERATURA CITADA.

- Achstetter, T. and D. H. Wolf. 1985. Hormone processing and membrane-bound proteinases in yeast. *EMBO J.* 4:173-177.
- Ball, A.M. Ashby M.J., Daniels M.J., Ingram D.S. Jhonstone K. 1991. Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* whit oilseed rape. *Physiol Mol Plant Pathol* 38:147-161.
- Bautista-Muñoz, C., T. Villa-Tanaca, C. Hernández-Rodríguez. 2005. Analysis and expression of *STE13ca* gene encoding a putative X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *candida albicans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45:459-469.
- Bordallo, C., J. Schwencke, M. P. Suárez-Rendueles. 1984. Localization of the thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase in the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 173: 199-203.

- Brouta, F., F. Descamps, T. Fett, B. Losson, C. Gerday, B. Mignon. 2001. Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. *Med. Mycol.* 39: 269-275.
- Borg-von Zepelin, M., S. Beggah, K. Boggian, D. Sanglard, M. Monod. 1998. The expresión of the secreted aspartyl proteinases *Sap4* to *Sap6* from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol. Microbiol.* 28: 543-554.
- Cutler, J. E. 1991. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 187-218.
- Clark, S. J., M. D. Templeton, P. A. Sullivan. 1997. A secreted aspartic proteinase from *Glomerella cingulata*: purification of enzyme and molecular cloning of the cDNA. *Microbiology.* 143: 1395-1403.
- De Bernardis, F., S. Arancia, L. Morelli, A. Cassone, J. Sturtevant, R. Calderone. 1999. Expression of *Candida albicans* SAP1 and SAP2 in experimental vaginitis. *Infect. Immun.* 63: 1887-1892.
- Dunaevskii, I. E., T. N. Gruban, G. A. Beliakova, M. A. Belozerskii. 2006. Extracellular proteinases of filamentous fungi as potential markers of phytopathogenesis. *Mikrobiologiya.* 75 (6): 747-751.
- Flores, A., H. Chet, A. E. Herrera. 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene pbr1. *Curr. Genet.* 31: 30-37.
- García-Alvarez, N., Cueva, R., Suárez-Rendueles, P. 1991. Molecular cloning of soluble aminopeptidase yscII, a putative zinc-metalloenzyme. *Eur. J. Biochem.* 202:993-1002.
- Hirsch, H. H., P. Suárez Rendueles, D. H. Wolf. 1988. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) proteinases: Structure, characteristics and functions, p. 134-200. In: E. F. Walton, and G. T. Yarranton (ed), *The molecular and cell biology of yeasts*, Blackie & Sons Ltd., London.
- Hirsch, H. H. and P. Suarez Rendueles, T. Achstetter, D. H. Wolf. 1989. Aminopeptidase yscII of yeast. Isolation of mutants and their biochemical and genetic analysis. *Eur. J. Biochem.* 173: 589-598.
- Hombergh, J. P. T. W., G. Jarai, F. P. Buxton, J. Visser. 1994. Cloning, characterization and expression of *pepF*, a gene encoding a serine carboxipeptidase from *Aspergillus niger*. *Gene.* 151: 73-79.
- Hohl, D., P. de Viragh, F. Amiguet-Barras, S Gibbs, C. Backendorf, M. Huber. 1995. The small proline-rich proteins constitute a multigene family of differentially regulated cornified envelope precursor proteins. *J. Invest. Dermatol.* 104 : 902-909.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida>.

Hube, B., M. Monod, D. Schofield, A. J. P. Brown, N. A. R. Gow. 1994. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 14: 87-89.

Hube, B., D. Sanglard, F. C. Odds, D. Hess, M. Monod, W. Schäfer, A. J. P. Brown, N. A. R. Gow. 1997. Disruption of each of the aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2 and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect. Immun.* 65 : 3529-3538.

Hull, C. M., R. M. Raisner, A. D. Johnson. 2000. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science.* 289: 307-310.

Ievleva, E.V., T. A. Revina, N.N. kudnavtseva, A. V. Sofin, T. A. Valveva. 2006. Extracellular proteinases from the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. *PrinklBiokhim Mikrobiol.* 42(3): 338-344.

Knop, M., H. H. Schiffer, S. Rupp, D.H. Wolf. 1993. Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 5: 990-996.

Kretschmar, M. B. Hube, T. Bertsch, D. Sanglard, R. Merker, M. Schröder, H. Hof, T. Nichterlein. 1999. Germ tubes and proteinases are virulence factors of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect. Immun.* 67: 6637-6642.

Lenney, J. F. 1975. Three yeast proteins that specifically inhibit yeast proteases A, B and C. *J. Bacteriol.* 122: 1265-1273.

Loaiza-Loeza, S., B. Parra-Ortega, C. Bautista-Muñoz, C. Casiano-Rosas, C. H. Hernández-Rodríguez, L. Villa-Tanaca. 2007. The proteolytic System of *Candida dubliniensis*. *Am. J. Infect. Dis.*, 3: 76-83.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Magazanik, B. y C. A. Kaiser. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 290: 1-18.

Magee, B. B., B. Hube., R. J. Wright, P. J. Sullivan, P. T. Magee. 1993. The genes encoding the secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* constitute a family with at least three members. *Infect. Immun.* 49: 571-575.

Magee, B. B. and P. T. Magee. 2000. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTL α* strains. *Science.* 289: 310-312.

- Marits, R., V. Koiv, E. Laasik, A. Mae. 1999. Isolation of an extracellular of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193. by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology*. 145: 1959-1966.
- Mercado-Flores, Y., G. Guerra-Sánchez, L. Villa-Tanaca, C. H. Hernandez-Rodríguez. 2003a. Purification and characterization of an extracelular non-aspartyl acid protease (pumAe) from *Ustilago maydis*. *Current Microbiology*. 47: 408-411.
- Mercado-Flores, Y., C. H. Hernandez-Rodríguez, H. J. Ruíz, L. Villa-Tanaca. 2003b. Proteinases and exopeptidases from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*. 95: 327-339.
- Mercado-Flores, Y., Y. Noriega-Reyes, B. Ramírez-Zavala, C. H. Hernandez-Rodríguez L. Villa-Tanaca. 2004. Purification and characterization of aminopeptidase (pumAPE) from *Ustilago maydis*. *FEMS. Microbiology Letters*. 234: 247-253.
- Milewski, S., F. Mignini, I. Covelli y E. Borowski. 1994. Specific inhibition of acid proteinase secretion in *Candida albicans* by Lys-Nav-FMDP. *J. Med. Mycol*. 32: 1-11.
- Mignon, B., M. Swinnen, J. Bouchara, M. Hofinger, A. Nikkels, G. Pierard, C. Gerday, B. Losson. 1998. Purification and characterization of a 31.5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. *Med. Mycol*. 36: 395-404.
- Monod, M., G. Togni, B. Hube y D. Sanglard. 1994. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol. Microbiol*. 13: 357-368.
- Monod, M., S Capoccia, B Léchenne, C Zaugg, M Holdom and O Jousson. 2002. Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int. J. Med. Microbiol*. 292: 405-419.
- Movahedi, S. and Heale J. B. 1990. Purification and characterization of an aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers in culture and in infected carrots. *Physiolog Mol Plant Phatol*. 36: 289-302.
- Pekkarinen, A. I. and B. L. Jones. 2002. Trypsin-like proteinase produced by *Fusarium culmorum* grown on grain protein. *J. Agric. Food. Chem*. 50 (13): 3849-3855.
- Pekkarinen, A. I. and B. L. Jones. 2003. Purification and identification of barley (*Hordeum vulgare* L.) proteins that inhibit the alkaline serine proteinases of *Fusarium culmorum*. *J. Agric. Food. Chem*. 51(6): 1710-1717.
- Pekkarinen, A. I. C. Longstaff, B. L. Jones. 2007. Kinetics of the inhibition of *Fusarium* serine proteinases by barley (*Hordeum vulgare* L.) inhibitors. *J. Agric. Food. Chem*. 55(7): 2736-2742.

- Phillips-Mora., W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.*, as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. PhD thesis. Department of Agricultural Botany, School of Plant Sciences. The University of Reading, RG6, UK.
- Phillips-Mora, W., Coutiño, A. Ortiz, C. F., López, A. P., Hernández, J. y Aime, M. C. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology*. 55: 584.
- Portillo, F. and Gancedo, C. 1986. Purification and properties of three intracellular proteinases from *Candida albicans*. *Biochem Biophys Acta* 881: 229-235.
- Poussereau N, Creton S, Brillon-Grand G, Rasclé C, Fevre, M. 2001. Regulation of *acp1*, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiology*. 147: 717-726.
- Quillis, J., D. Meynard, L. Vila, F. X. Avilés, E. Guiderdoni B. San Segundo. 2007. A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnol. J.* 5(4): 537-553.
- Rao, M. B., A. M. Tanksale M. S. Ghatge y V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 597-635.
- Reichard, U., Büttner, S. Eittner, H., Staib, F. Rüchel, R. 1990. Purification and characterisation of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. *J. Med. Microbiol.* 33: 243-251.
- Saheky, T. y H. Holzer. 1975. Proteolytic activities in yeast. *Biochem. Biophys. Acta.* 348: 203-214.
- Sanglard, D. B. Hube, M. Monod, F. C. Odds, N. A. R. Gow. 1997. A triple deletion of the aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect. Immun.* 65 : 3539-3546.
- Schaller, M. H. C. Korting, W. Schäfer, J. Bastert, W. Chen, B. Hube. 1999. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol. Microbiol.* 34: 169-180.
- Simon, M. and H. Green. 1985. Enzymatic cross-linking of involucrin and other proteins by keratinocytes particulates in vitro. *Cell* 40: 677-683.
- Steinert, P. M. and L. N. Marekow. 1995. The proteins elafin, filagrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* 270 : 17702-17711.

- Steinert, P. M. and L. N. Marekow. 1997. Direct evidence that involucrin is a major early isodipeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* 272 : 2021-2030.
- St Leger, R.J. Joshi I, Roberts W. 1997. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to requirements of their ecological niches. *Microbiology.* 143: 1983-1992.
- Suárez Rendueles, P. y D. H. Wolf. 1988. Proteinase function in yeast: biochemical and genetic approaches to a central mechanism of post-translational control in the eukariotic cell. *FEMS Microbiol. Lett.* 54: 17-46.
- Suárez Rendueles, P., J. Schwencke, N. García-Alvarez y S. Gascon. 1981. A new X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from yeast associated with a particulate fraction. *FEBS letters.* 131: 296-300.
- Tian, M., E. Huitema, I. Da cunha, T. Torto-Alalibo, S. Kamoun. 2004. A kazal-like extracelular serine protease inhititor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J. Biol. Chem.* 279(25): 26370-26377.
- Tian, M., J. Win, J. Song, R. van der Hoorn, I. van der Knaap, S. Kamoun. 2007. A *Phytophthora infestans* cystein-like potein targets a novel tomate papain-like apoplatic protease. *Plant Physiol.* 143(1): 364-367.
- Togni, G., D. Sanglard, R. Falchetto, M. Monod. 1991. Isolation and nucleotide sequence of the extracelular acid protease gene (ACP) from the yeast *Candida tropicalis*. *FEBS Lett.* 286: 181-185.
- Urbanek, H., y G. Yirdaw. 1984. Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and role in phytopatogenesis. *Acta Microbiol. Pol.* 33: 131-136.
- Urbanek, H., A. Kaczmarek. 1985. Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and role in phytopatogenesis. *Acta Microbiol. Pol.* 33: 131-136.
- Van den Hazle H. B, Kielland-Brandt M. C, Winter J. R. 1996. Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast.* 12: 1-16.
- Yoshida, H., M. Iizuka, N. Norioka, S. Norioka. 2007. Cloning and sequencing of cDNA and genomic DNA encoding serine carboxypeptidase of *Fusarium moniliforme* that was copurified whit phosphatase. *J. Biosci. Bioeng.* 103(6): 521-528.
- Zhang, Y., D. D. Bak, H. Heid y K. Geider. 1999. Molecular characterization of a protease secreted by *Erwinia amylovora*. *J. Mol. Biol.* 289: 1239-1251.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES.

1. CONCLUSIONES.

1. El presente trabajo constituye el primer reporte sobre el estudio del sistema proteolítico del hongo *M. roreri*.
2. La amplificación y secuenciación del gen 18S rDNA, permitió la identificación molecular del hongo *M. roreri* en la cepa MRO1.
3. La prueba de identificación molecular estandarizada en este trabajo, puede ser empleada como un método de diagnóstico de la moniliasis del cacao, causada por *M. roreri*.
4. Se encontró actividad enzimática intracelular y extracelular de mrDAP, mrAPE, mrCP y mrAP, en *M. roreri*, las cuales podrían participar en eventos celulares como en la fitopatogénesis.
5. Dada la variación de sensibilidad de las enzimas hacia los diferentes inhibidores ensayados, es probable que cada una de las actividades enzimáticas de mrAP, mrAPE, mrDAP y mrCP, sean codificadas por múltiples genes, como se ha descrito en otros hongos.
6. La expresión de los genes codificantes de enzimas mrAP en *M. roreri*, son regulados de manera diferencial por las diferentes fuentes de nitrógeno y carbono ensayadas.
7. Se aceptan las hipótesis nulas planteadas en el presente trabajo.

2. RECOMENDACIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, y las investigaciones realizadas sobre las proteasas de hongos fitopatógenos, se recomienda continuar el estudio de las proteasas de *M. royeri*, abordando los siguientes temas:

1. Diseño de iniciadores universales para amplificar un fragmento de los posibles genes codificantes de las enzimas con actividad de enzimática de mrDAP, mrAPE, mrCP y mrAP.
2. Búsqueda de inhibidores contra la producción de proteasas, actividad enzimática, esporulación y crecimiento micelial del hongo.
3. Clonación y secuenciación de cDNA de genes con actividad enzimática de mrDAP, mrAPE, mrCP y mrAP.
4. Caracterización molecular de los genes codificantes de proteasas con actividad enzimática de mrDAP, mrAPE, mrCP y mrAP.
5. Purificación y caracterización bioquímica de las proteasas con actividad enzimática de mrDAP, mrAPE, mrCP y mrAP.
6. Estudios de expresión *in situ*, para evidenciar la participación de dichas proteasas durante la fitopatogénesis.

ANEXOS.

Fórmula para calcular las actividades enzimáticas de mrAPE, mrDAP y mrCP.

Actividad total (U mL⁻¹).

$$U/mL = \frac{(Abs_{405 \text{ nm}}) (\text{factor de dilución}) (\text{Factor de la curva tipo de } p\text{-nitroanilina})}{\text{Tiempo de incubación}}$$

Actividad específica (Umg⁻¹ Proteína total).

$$Umg^{-1} \text{ Proteína total} = \frac{U/mL}{\text{mg mL}^{-1} \text{ de Proteína}}$$

Fórmula para determinar la actividad enzimática de mrAP.

Actividad total (U mL⁻¹)

$$U \text{ mL}^{-1} = (Abs_{660 \text{ nm}}) (\text{Factor de dilución}) (\text{Factor de la curva de tirosina}) (\text{Factor de dilución de la técnica de Micro Lowry}) / \text{Tiempo de incubación}$$

Actividad específica (Umg⁻¹ de Proteína total)

$$Umg^{-1} \text{ Proteína total} = \frac{U \text{ mL}^{-1}}{\text{mg mL}^{-1} \text{ de Proteína}}$$

Fórmula para determinar la concentración de la proteína total (mg mL⁻¹ de Proteína total).

Actividad total (U mL⁻¹).

$$\text{mg mL}^{-1} = \frac{(Abs_{660 \text{ nm}}) (\text{Factor de dilución}) (\text{Factor de la curva de albúmina})}{1000}$$

Factor de la curva tipo de *p*-nitroanilina = 110

Factor de la curva tipo de albúmina = 143.78

Factor de la curva tipo de Tirosina = 23.36