

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**DETERMINACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE
AMINOPEPTIDASA (tcAPE) Y AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADNc DE
POSIBLES GENES *TcAPE* DE *Theobroma cacao* L.**

LORENA AGUILAR ROMAN

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO 2008

La presente tesis, titulada: Determinación bioquímica de la actividad enzimática de aminopeptidasa (tcAPE) y amplificación de fragmentos de ADNc de posibles genes tcAPE de *Theobroma cacao* L., realizada por la alumna: **Lorena Aguilar Roman**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO**

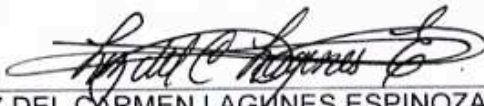
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DRA. CONSUELO DEL CARMEN BAUTISTA MUÑOZ.

ASESOR:



DRA. LUZ DEL CARMEN LAGUNES ESPINOZA

ASESOR:



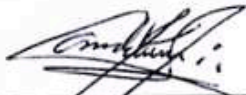
DR. JUAN MANUEL ZALDIVAR CRUZ

ASESOR:



DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESOR:



DR. WILDER CAMACHO CHIU

H. Cárdenas, Tabasco, 11 de diciembre de 2008

Determinación bioquímica de la actividad enzimática de aminopeptidasa (tcAPE) y amplificación de fragmentos de ADNc de posibles genes *TcAPE* de *Theobroma cacao* L.

**Lorena Aguilar Román, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2008**

En el presente trabajo, se propuso realizar una determinación bioquímica de la actividad enzimática de aminopeptidasa (tcAPE) durante los procesos de germinación y fermentación de la semilla de *T. cacao* L., así como amplificar los extremos 3' de fragmentos de cDNA de los posibles genes codificantes. El trabajo inició con la determinación de la actividad enzimática de tcAPE. Los resultados indicaron que la actividad enzimática de tcAPE, está presente durante el proceso de germinación de la semilla de *T. cacao* L., sin embargo, la síntesis de esta enzima se eleva durante la fase de crecimiento, misma que corresponde a la última etapa del proceso de germinación de la semilla de cacao criollo del genotipo almendra blanca. La actividad de tcAPE también se detectó durante el proceso de fermentación, observándose una disminución progresiva a partir del día 2 hasta el día 6, con una actividad residual del 21.88%. Por otro lado, también se pudo concluir que la(s) enzima(s) tcAPE ensayada, pudiera estar localizada en la membrana o pared celular, dado que la actividad enzimática, solo pudo ser detectada agregando Triton X-100 al regulador de trabajo. La segunda etapa del trabajo inició con la extracción del RNA total, obtenido a partir de muestras de radícula y cotiledón de semillas de cacao, germinadas en condiciones de esterilidad. El cDNA fue amplificado con el Sistema RACE 3' (Rápida Amplificación de Extremos 3' del cDNA; 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends), los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y seis GSP's. Los GSP's fueron diseñados a partir de alineamientos múltiples de genes APE descritos en plantas y depositados en la base de datos del NCBI. Se lograron amplificar fragmentos de cDNA empleando cuatro iniciadores GSP's; sin embargo, debido a problemas técnicos, los fragmentos no pudieron ser enviados a secuenciar. Por lo anterior, no fue posible realizar un análisis bioinformáticos que nos ayudara a predecir la función de los genes amplificados.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L., aminopeptidasa, proteasas, germinación, fermentación.

Biochemical determination of the enzymatic activity of aminopeptidase (tcAPE) and cDNA fragment amplification of possible genes *TcAPE* from *Theobroma cacao* L.

Lorena Aguilar Román, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2008

This paper proposes to make a biochemistry determination of the enzyme activity of aminopeptidase (tcAPE) during the processes of fermentation and germination of the seeds of *T. cacao* L., and to amplify the ends 3' cDNA fragments of genes coding potential. The work began with the determination of enzyme activity of tcAPE. The results indicated that the enzymatic activity of tcAPE, is present during the process of seed germination of *T. cacao* L., however, the synthesis of this enzyme rises during the growth phase, which corresponds to the last stage of the process of germination of the seeds of the creole cacao genotype almond white. The activity also detected tcAPE during the fermentation process, showing a progressive decline from day 2 until day 6, with a residual activity of 21.88%. On the other hand, it could also be concluded that the (s) enzyme (s) tcAPE tested, could be located in the membrane or cell wall, because the enzyme activity, could only be detected by adding Triton X-100 to the regulator of work. The second phase of work began with the extraction of total RNA, obtained from samples of radicle and cotyledon of cacao beans, sprouted in a sterile condition. The cDNA was amplified with the System RACE 3' (Rapid Amplification of 3' end of the cDNA; 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends), the oligonucleotide primers AUAP (provided by the manufacturer) and six GSP's. The GSP's were designed from alignments of multiple genes in plants and described APE deposited in the NCBI database. It was possible to amplify fragments of cDNA using four starters GSP's, but due to technical problems, the fragments could not be sent to sequencing. Therefore, it was not possible to make a bioinformatics analysis that will help us predict the function of genes amplified.

Key words: *Theobroma cacao* L., aminopeptidase, proteases, germination, fermentation.

DEDICATORIA

A Dios por haberme bendecido todos los días de mi vida, por procurarme lo justo y necesario cada minuto de mi existencia.

A mis padres, Luis y Lidia, a ti mami por tu gran paciencia y apoyo brindado, porque soy solo un reflejo de tu empeño y devoción hacia tu familia, a ti papi porque me haces fuerte cuando mas débil soy.

In memoriam a mi abuelita Olegaria Alvarado Pinto porque a pesar de no estar a mi lado su amor me ha acompañando todos estos años y a doña Lupita por ser un ejemplo de fortaleza; a mis bebes Luisito y Lupita, que siempre están presente en mi corazón.

A mis hermanos Antonio y Janeth y a mi abuelito Otilio, por su apoyo y motivación, por ser mi inspiración en todas las cosas que hago.

A mis niños más queridos Danna Paola, Ariadna y Leonardo que son el eje de mi vida, que han motivado y alegrado mi existencia desde el día que nacieron, por que con una sonrisa alegraron muchos días difíciles.

A las familias Vázquez Alvarado, Vázquez García, Vázquez López, Vázquez Guillen y Morales Aguilar que son la mejor motivación de mi vida, por su apoyo incondicional.

A Eric por haber llegado a mi vida inesperadamente, por alegrarme y acompañarme durante todo este tiempo, por ser parte importante de mi existencia, por hacer que la distancia no importe, por que cada minuto compartido contigo son y serán la mejor etapa de mi vida, con cariño Banibak.

A mis compañeros del CESVETAB y al Ing. Isidro Izquierdo Castillo por su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco por darme la oportunidad al conocimiento, dándome la oportunidad de enriquecer mi vida profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber financiado mis estudios de Maestría en Ciencias.

A la Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz, por su paciencia, asesoría y por todo el tiempo que dedicó a este proyecto de investigación.

A la Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza, por el apoyo que brindado.

A la Dra. Adriana Delgado Alvarado, por su disposición en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Wilder Camacho Chiu, por su ayuda incondicional.

Al Dr. Juan Manuel Zaldivar Cruz, por sus consejos en todo momento.

Al Dr. Xavier Boldo León, por su asesoría y más que nada por el tiempo y paciencia que le otorgo a esta investigación.

Al Dr. Alfonso Azpeitia Morales, por su asesoría en este proyecto.

Al Ing. Moisés Acosta Mayo y al Sr. Daniel Jiménez Escayola, por la ayuda otorgada.

A los trabajadores del Colegio de Postgraduados por las facilidades prestadas para el desarrollo de esta investigación y a la generación 2006-2007 del PROPAT por haber caminado juntos este sendero.

INDICE DE CONTENIDO

	<i>Páginas.</i>
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPOTÉISIS	3
III. OBJETIVO GENERAL	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
IV.1. Descripción botánica del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	5
IV.2. Descripción taxonómica del género <i>Theobroma</i>	8
IV.3 Clasificación y descripción de las poblaciones cultivadas.....	11
IV.4. Distribución y dispersión.....	12
IV.5. Condiciones climáticas para el cultivo del cacao.....	14
IV.6. Germinación de semillas.....	14
IV.7. Sustancias de reserva	15
IV.8. Clasificación de las proteasas.....	16
IV.9. Principales proteínas de la semilla de <i>Theobroma cacao</i> L.....	17
IV.10. Proceso de fermentación y enzimas hidrolíticas descritas en la semilla de <i>Theobroma cacao</i> L.....	18
IV.11. Función de las aminopeptidasas (APE's) descritas en plantas.....	20
IV.12. Leucina aminopeptidas (LAP's) especies específicas de plantas con importantes papeles de defensa.....	21

IV.13. Sistema de amplificación rápida de los extremos 3' del ADNc (RACE; System for Rapid Amplification of cDNA Ends).....	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS	27
V.1. Muestreo.....	27
V.2. Condiciones de germinación.....	27
V.3. Condiciones de fermentación de la semilla de <i>T. cacao</i> L.....	28
V.4. Determinación bioquímica de la actividad de tcAPE de <i>t. cacao</i> L. durante los procesos de germinación y fermentación.....	28
V.4.1. Extracción con acetona de los polvos de cacao.....	28
V.4.2. Obtención del extracto enzimático para la determinación de la actividad enzimática de tcAPE.....	29
V.4.3. Determinación de la actividad de tcAPE con el sustrato H-Leu-pNA.....	29
V.4.4. Determinación de la proteína total.....	29
V.4.5. Formulario para el cálculo de la actividad enzimática de tcAPE.....	30
V.4.5.1. Formulario para determinar la concentración de la proteína total (mg Proteína total/mg PDA).....	30
V.4.5.2. Formulario para determinar los niveles de actividad enzimática específica de tcAPE (U/mg Proteína total).....	30
V.4.6. Análisis estadístico.....	31
V.5. Amplificación de fragmentos de ADNc de posibles genes codificantes de proteasas con actividad de aminopeptidasa (tcAPE) presentes en la semilla de <i>T. cacao</i> L.....	31
V.5.1. Diseño de iniciadores para la amplificación de posibles genes codificantes de tcAPE.....	31
V.5.2. Extracción de ARN total de <i>Theobroma cacao</i> L.....	32
V.5.3. Cuantificación del ARN total.....	33
V.5.4. Electroforesis del RNA total en geles de agarosa al 1%.	33
V.5.5. Tratamiento del ARN total con DNasa I libre de RNasa.....	33
V.5.6. Amplificación del extremo 3' del ADNc por RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	34

V.5.6.1. Síntesis de la primera cadena de ADNc.....	34
V.5.6.2. Amplificación de fragmentos de ADNc.....	36
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
VI.1. Determinación bioquímica de la actividad de tcAPE durante los procesos de germinación y fermentación de la semilla de cacao (<i>T. cacao</i> L.).....	37
VI.1.1. Determinación de la actividad de tcAPE durante el proceso de germinación de la semilla de cacao (<i>T. cacao</i> L.).....	37
VI.1.2. Determinación de la actividad de tcAPE durante el proceso de fermentación de la semilla de cacao (<i>T. cacao</i> L.).....	40
VI.2. Amplificación de fragmentos de ADNc de posibles genes codificantes de proteasas con actividad de aminopeptidasa (tcAPE) presentes en la semilla de <i>T. cacao</i> L.....	44
VI.2.1. Diseño de iniciadores gen específico (GSP) para la amplificación de ADNc de posibles genes tcAPE.....	44
VI.2.2. Extracción del ARN total de <i>T. cacao</i> L.....	55
VI.2.3. Amplificación de fragmentos de ADNc de posibles genes tcAPE por el método del RACE 3'.....	56
VII. CONCLUSIONES.....	64
VIII. PERSPECTIVAS.....	65
IX. LITERATURA CITADA.....	66

INDICE DE CUADROS

	<i>Páginas</i>	
Cuadro 1.	Actividad enzimática específica de tcAPE en semillas de cacao germinadas proveniente de diferentes plantas del genotipo de cacao criollo almendra blanca. Reportados en U/mg de Proteína total por cada mg de PDA.	38
Cuadro 2.	Comparación de medias de la actividad enzimática específica de tcAPE en semillas de cacao fermentadas del genotipo cacao criollo almendra blanca.	41
Cuadro 3.	Porcentaje residual de actividad enzimática específica de tcAPE en semillas de cacao fermentadas del genotipo de cacao criollo.	42
Cuadro 4.	Dendrograma del alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes APE descritas de plantas, alineadas para el diseño del oligonucleótido APEPLANTASG1A SENSE.	45
Cuadro 5.	Dendrograma del alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes APE descritas de plantas, alineadas para el diseño del oligonucleótido APEPLANTASG1B SENSE.	45
Cuadro 6.	Dendrograma del alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes APE descritas de plantas alineadas para el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG2 SENSE.	46
Cuadro 7.	Dendrograma del alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes APE descritas de plantas, alineadas para el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG3A SENSE.	46
Cuadro 8.	Dendrograma del alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes APE descritas de plantas, alineadas para el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG3B SENSE.	47

Cuadro 9.	Dendrograma del alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes APE descritas de plantas, alineadas para el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG4 SENSE.	47
Cuadro 10.	Oligonucleótidos iniciadores GSP's diseñados para la amplificación de fragmentos de ADNc de posibles genes codificantes de proteasas con actividad de aminopeptidasa (tcAPE) presentes en la semilla de <i>T. cacao</i> L.	54
Cuadro 11.	Temperatura de fusión (T_m), temperatura de alineamiento (T_a) y T_a de amplificación del ADNc con cada uno de los GSP's.	57

Figura 1.	Hoja del árbol de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) Rancho la Joya, Cunduacán, Tabasco.	6
Figura 2.	Flor del árbol de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L). Rancho la Joya, Cunduacán, Tabasco.	6
Figura 3.	Fruto del árbol de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) Rancho la Joya, Cunduacán, Tabasco.	7
Figura 4.	Esquema general del procedimiento del sistema RACE 3'.	26
Figura 5.	Actividad enzimática específica de tcAPE, durante el proceso de germinación de semillas de cacao del genotipo criollo. La actividad enzimática fue determinada en semillas de cacao durante el proceso de germinación. Los niveles son reportados como actividad enzimática específica en U/mg de Proteína total por cada mg de PDA.	39
Figura 6.	Actividad enzimática específica de tcAPE, durante el proceso de fermentación de semillas de cacao del genotipo criollo almendra blanca. La actividad enzimática fue determinada en semillas de cacao durante el proceso de fermentación. Los niveles son reportados como actividad enzimática específica en U/mg de Proteína total por cada mg de PDA.	43
Figura 7.	Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de genes APE descritos en las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Número de acceso GenBank: NC003070), <i>Prosopis juliflora</i> (Número de acceso GenBank: DW359562), <i>Pinus taeda</i> (Número de acceso GenBank: CD028075), <i>Festuca arundinacea</i> (Número de acceso GenBank: CA820695), <i>Phaseolus coccineus</i> (Número de acceso GenBank: CA906284), <i>Hordeum vulgare</i> (Número de acceso GenBank: CV059480), <i>Zea mays</i> (Número de acceso GenBank: DN830908), <i>Arabidopsis thaliana</i> (Número de acceso GenBank: BT005680), <i>Oriza sativa</i> (Número de acceso GenBank: AP008210), <i>Oriza sativa</i> (Número de acceso GenBank: NC008400) y <i>Oryza sativa</i> (Número de acceso GenBank: AP008213), empleadas en el diseño del oligonucleótido	48

APEPLANTSG1A SENSE. Blanco, < 60% de identidad; verde, 60% de identidad; amarillo, 80% de identidad; rojo, 100% de identidad.

Figura 8. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de genes APE descritos en las plantas de *Capcicum annuum* (Número de acceso GenBanK: CK901665), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBanK: AP008217), *Prunus pérsica* (Número de acceso GenBanK: BF717113), *Lycopersicum esculentum* (Número de acceso GenBanK: AJ310676), *Oryza sativa* (Número de acceso GenBanK: CA755384, *Avicennia marina* (Número de acceso GenBanK: CD777124), *Medicago truncatula* (Número de acceso GenBanK: BV165264), *Pinus taeda* (Número de acceso GenBanK: BQ697522), *Medicago truncatula* (Número de acceso GenBanK: AC140027), *Arabidopsis thaliana* (Número de acceso GenBanK: NC003076) y *Oryza sativa* (Número de acceso GenBanK: AP008207), empleadas en el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG1B SENSE. Blanco, < 60% de identidad; verde, 60% de identidad; amarillo, 80% de identidad; rojo, 100% de identidad.

Figura 9. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de genes APE descritos en las plantas de *Arabidopsis thaliana* (Número de acceso GenBanK: AY143574), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBanK: AP008208), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBanK: AP008214), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBanK: AP008215), *Euglena Gracilis* (Número de acceso GenBanK: DQ384304), *Apium graveolens* (Número de acceso GenBanK: BU693680), *Populos trichocarpa* (Número de acceso GenBanK: BH860808) y *Nicotiana benthamiana* (Número de acceso GenBanK: CN745933), empleadas en el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG2 SENSE. Blanco, < 60% de identidad; verde, 60% de identidad; amarillo, 80% de identidad; rojo, 100% de identidad.

Figura 10. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de genes APE descritos en las plantas de *Lycopersicum esculentum* (Número de acceso GenBanK: AF510743), *Pinus pinaster* (Número de acceso GenBanK: BX250812), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBanK: AP008212), *Gossypium*

barbadense (Número de acceso GenBank: AY239297), *Hordeum vulgare* (Número de acceso GenBank: AF474373), *Zea mays* (Número de acceso GenBank: DR906997), *Pinus taeda* (Número de acceso GenBank: CD018433), *Betula pendula* (Número de acceso GenBank Y14777), *Oryza sativa* (Número de acceso GenBank: CA753071), *Phaseolus vulgaris* (Número de acceso GenBank: AB037678), *Solanum tuberosum* (Número de acceso GenBank: X67845) y *Solanum tuberosum* (Número de acceso GenBank X77015), empleadas en el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG3A SENSE. Blanco, < 60% de identidad; verde, 60% de identidad; amarillo, 80% de identidad; rojo, 100% de identidad.

Figura 11.

Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de genes APE descritos en las plantas de *Medicago truncatula* (Número de acceso GenBank: AC136953), *Medicago truncatula* (Número de acceso GenBank: AC152068), *Phaseolus coccineus* (Número de acceso GenBank: CA906283), *Brassica napus* (Número de acceso GenBank: BG732235), *Ananas comusus* (Número de acceso GenBank: DT339275), *Alstroemeria peruviana* (Número de acceso GenBank: CF802396), *Capsicum annuum* (Número de acceso GenBank: CK901986) y *Beta vulgaris* (Número de acceso GenBank: BQ060472), empleadas en el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG3B SENSE. Blanco, < 60% de identidad; verde, 60% de identidad; amarillo, 80% de identidad; rojo, 100% de identidad.

52

Figura 12.

Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de genes APE descritos en las plantas de *Allium cepa* (Número de acceso GenBank: BE205591), *Phaseolus acutifolius* (Número de acceso GenBank: CK901519), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBank: AP008218), *Ananas comusus* (Número de acceso GenBank: DQ288246), *Pinus pinaster* (Número de acceso GenBank: BX255516), *Beta vulgaris* (Número de acceso GenBank: BI096101), *Arabidopsis thaliana* (Número de acceso GenBank: NC003071), *Hordeum vulgare* (Número de acceso GenBank: BM816757), *Crocus sativus* (Número de acceso GenBank: BM005667), *Elaeis oleífera* (Número de acceso GenBank: AY548529), *Malus domestica* (Número de acceso GenBank: DT002375) y *Oriza sativa* (Número de acceso GenBank: AP008209), empleadas en el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG3B SENSE.

53

Blanco, < 60% de identidad; verde, 60% de identidad; amarillo, 80% de identidad; rojo, 100% de identidad.

- Figura 13. RNA total de muestras de cotiledón y radícula de *T. cacao* L. Carriles 1, 2 y 3) RNA total de cotiledón; carril 4) Marcador de talla molecular de DNA de 100 pb; 5, 6 y 7) RNA total de radícula. Se muestra la integridad de los RNAr 18S y 28S, indicando la calidad del RNA total extraído. 55
- Figura 14. Fragmentos de cDNA de posibles genes tcAPE, amplificados por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y APEPLANSG1A SENSE. El par de oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, no nos permitió amplificar fragmentos de cDNA. 58
- Figura 15. Fragmentos de cDNA de posibles genes tcAPE, amplificados por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y APEPLANTSG1B SENSE. El par de oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, nos permitió amplificar un fragmento principal de cDNA de 366 pb. 78
- Figura 16. Fragmentos de cDNA de posibles genes tcAPE, amplificados por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y APEPLANTSG2 SENSE. El par de oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, nos permitió amplificar tres fragmentos principales de cDNA de 187, 239 y 366 pb. 59
- Figura 17. Fragmentos de cDNA de posibles genes tcAPE, amplificados por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y APEPLANTSG3A SENSE. El par de oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, nos permitió amplificar un fragmento principal de cDNA de 280 pb. 59
- Figura 18. Fragmentos de cDNA de posibles genes tcAPE, amplificados 60

Figura 18.	Fragmentos de cDNA de posibles genes tcAPE, amplificados por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y APEPLANTSG3B SENSE. El par de oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, nos permitió amplificar un fragmento principal de cDNA de 339 pb.	60
Figura 19	Fragmentos de cDNA de posibles genes tcAPE, amplificados por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y APEPLANTSG4 SENSE. El par de oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, no nos permitió amplificar fragmentos de cDNA.	60
Figura 20.	Fragmento de cDNA del gen CP-III de <i>T. cacao</i> L. amplificado por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores CPIII _{sense} y CPIII _{antisense} , codificante de una proteasa con actividad enzimática de carboxipeptidasa-III, usado como control interno de amplificación. El par de oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, nos permitió amplificar un	61

ABREVIATURAS

°C: Grados centígrados

μLt: Microlitro

μM: Micromolar

A: Adenina
Abs: Absorbancia
C: Citosina
ADNc: ADN complementario
DEPC: Dietilpirocarbonato
ADN: Ácido Desoxirribonucléico
G: Guanina
M: Molar
mg: Miligramo
mg: miligramo
mLt/g: mililitro por gramo
mL: Mililitros
mM: Milimolar
nm: Nanómetro
Pb: Pares de bases
RCP: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA: Polvos secos de cacao
ARN: Ácido Ribonucleico
ARNr: RNA ribosomal
RT-PCR: Retrotranscripción-PCR
SDS: Dodecil sulfato de sodio
T: Tiamina
tcAPE: Aminopeptidasa
U/mg: Unidades por miligramo
U/ml: Unidades por mililitro
U: Uracilo

I. INTRODUCCIÓN

Theobroma cacao L., ha sido considerado por mucho tiempo, un cultivo de importancia mística para las culturas indígenas mesoamericanas. La importancia de este cultivo en la cultura moderna, está creciendo con nuevos enfoques sobre los efectos benéficos potenciales de los compuestos polifenólicos hacia la salud (Bennet, 2003).

Las características cualitativas de sabor y aroma del grano de cacao fermentado, son cruciales para la producción del chocolate. En este sentido, se ha descrito que el desarrollo de una gama completa de los precursores del sabor y aroma del cacao, probablemente ocurren durante la fermentación, debido a que los granos no fermentados, no proporcionan el sabor y aroma característicos del chocolate, aunque estos hayan sido tostados. El origen de los precursores del sabor y aroma, ocurre durante la fermentación y es principalmente debido a reacciones enzimáticas (Rohan, 1964).

Durante el proceso de fermentación, los microorganismos, degradan la pulpa que rodea al grano, transformando los azúcares a ácidos, especialmente ácido acético. El incremento de la temperatura del material fermentante y la penetración de ácidos, dentro de la semilla de cacao, son responsables de la muerte del embrión, la ruptura de los compartimentos celulares y la formación de los precursores del sabor y aroma (Kirchhoff *et al.*, 1989). La fuente de estos precursores, son numerosas; sin embargo, la degradación de las proteínas de la semilla y la consecuente liberación de péptidos y aminoácidos libres, son probablemente algunos de los eventos más importantes para la formación de los precursores del sabor y aroma. Particularmente, Kirchhoff *et al.*, (1989), señala que existe una correlación entre la acumulación de aminoácidos libres y la generación esencial de los precursores del sabor y aroma. Dichos autores, concluyeron que los precursores del aroma específico del cacao, son formados por un proceso proteolítico dependiente del pH.

Se ha descrito que el aroma específico del cacao, fue obtenido *in vitro*, cuando la globulina clase vicilina fue sucesivamente degradada por una proteinasa aspártica (EC 3.4.23) y una carboxipeptidasa (EC 3.4.16.1) y los productos resultado de la proteólisis, fueron degradados en presencia de azúcares reductores (Voigt *et al.*, 1994a; Voigt *et al.*, 1994b).

Se han realizado estudios que demuestran la presencia de enzimas diversas tales como proteasas, glicosidasas y polifenol oxidasas en los granos de cacao. En 1998, Hansen *et al.*, demostraron la presencia de actividad enzimática de aminopeptidasa, en semillas fermentadas de cacao.

Estudios previos realizados sobre la determinación de actividades enzimáticas durante los procesos de germinación y fermentación de la semilla de cacao, han puesto de manifiesto la presencia de la actividad de tcAPE (datos no publicados), en conjunto con otras proteasas como carboxipeptidasa y aspartil proteasas previamente reportadas. Sin embargo, hasta el momento, no se han realizado estudios moleculares sobre los genes que codifican dicha proteasa(s). Con base en lo anterior, en este proyecto se propuso realizar la determinación bioquímica y amplificación de fragmentos de cDNA de posibles genes tcAPE de *Theobroma cacao* L.

Dada las características cualitativas en sabor y aroma de las variedades de cacao criollo, el presente trabajo de investigación se realizó en semillas de la variedad de cacao criollo almendra blanca, cultivadas en el Rancho La Joya ubicado en Cunduacán, Tabasco.

II. HIPÓTESIS.

II.1. HIPÓTESIS NULA.

La actividad de aminopeptidasa (tcAPE) se expresa durante los procesos de germinación y fermentación de la semilla de *T. cacao* L. y la secuencia de ADNc de los posibles genes APE codificantes pueden ser amplificados.

II.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA.

La actividad de aminopeptidasa (tcAPE) no se expresa durante los procesos de germinación y fermentación de la semilla de *T. cacao* L., por lo tanto, la secuencia de ADNc de los posibles genes APE codificantes no pueden ser amplificados.

III. OBJETIVO GENERAL

Realizar una determinación bioquímica y amplificación de posibles genes codificantes de enzimas con actividad de aminopeptidasa (tcAPE) durante los procesos de germinación y fermentación de la semilla de *T. cacao* L

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar los niveles de actividad enzimática de tcAPE durante los proceso de germinación y fermentación de la semilla de *T. cacao* L.
2. Amplificar fragmentos de cDNA de posibles genes codificantes de proteasas con actividad enzimática de aminopeptidasa (tcAPE) presentes en la semilla de *T. cacao* L.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

IV.1. Descripción botánica del cacao (*Theobroma cacao* L.)

T. cacao L., es un árbol de tamaño mediano (5-8 m) y puede alcanzar alturas de hasta 20 m cuando crece libremente bajo sombra intensa. Su corona es densa, redondeada y con un diámetro de 7-9 m. El tronco de este árbol es recto y se puede desarrollar en formas muy variadas. Su sistema radicular, está compuesto por una raíz pivotante con muchas raíces secundarias, la mayoría de las cuales se encuentran en los primeros 30 cm del suelo (Toxopeus, 1969).

Las hojas son simples, enteras y de color verde bastante variable (café claro, morado o rojizo, verde pálido) y de peciolo corto. Miden de 15-50 cm de longitud y de 4-15 cm de ancho, con un ápice agudo o subagudo (Figura 1). Las ramas primarias se forman en un conjunto denominado “molinillo” (Urquhart, 1961).

Las inflorescencias se localizan en el tallo, ramas principales (truncadas y caulifloras), en la base de las hojas, alrededor de la yema axilar y en la cicatriz que deja a la caída de la hoja. Al paso del tiempo, en los sitios de origen se produce un engrosamiento secundario que recibe el nombre de cojín floral, cuyo número de flores varía de acuerdo al genotipo y al sistema de cultivo (Hardy, 1960).

La aparición de flores ocurre durante todo el año, pero particularmente en los solsticios, la mayor parte se aborta, las que quedan son las que producen frutos. La flor es pequeña (1-1.5 cm de diámetro) y completa, es decir es hermafrodita con cinco sépalos, cinco pétalos, un pistilo y un ovario súpero con cinco carpelos (Figura 2). El ovario puede contener desde 30 a 50 óvulos, acomodados en cinco hileras (Toxopeus, 1969). Contiene diez estambres, cinco estériles (estaminoides) y cinco fértiles: los primeros forman cinco lóbulos lanceolados opositisépalos; los segundos opositisépalos, por el contrario, nacen del seno de los lóbulos con filamentos cortos y anteras divergentes (Wood, 1975).

La parte basal de los pétalos forman una copa, por lo que los sacos de polen están ocultos, los granos de polen son muy pequeños y pegajosos. La flor es típicamente de polinización entomófila, donde intervienen principalmente mosquitas del género *Forcypomia* spp. (Diptera-Ceratoponidae) (Toxopeus, 1969).



Figura 1. Hoja del árbol de cacao (*Theobroma cacao* L.) Rancho la Joya, Cunduacán, Tabasco.



Figura 2. Flor del árbol de cacao (*Theobroma cacao* L.) Rancho la Joya, Cunduacán, Tabasco

El fruto de esta planta es una baya conocida como “mazorca”, y se forma por la unión de los 5 carpelos. Las semillas están dispuestas en formas axiales e incrustadas en una masa mucilaginosa desarrollada en las capas externas de la testa. La forma varía de globosa a fusiforme, con una constricción o “cuello de botella” en el extremo del pedúnculo y el ápice es generalmente agudo. La superficie presenta diez lomos, cinco de los cuales son más elevados que el resto (Figura 3) (Toxopeus, 1969).



Figura 3. Fruto del árbol de cacao (*Theobroma cacao* L.) Rancho la Joya, Cunduacán, Tabasco.

La semilla de cacao se conoce también como “haba”, “grano” o “almendra”, se localiza dentro de la túnica del fruto, y su número varía de 30 a 40, puede llegar hasta 70 (Bradeau, 1970); su forma es aplanada ovoide, de 2 a 3 centímetros de longitud, 1.5 centímetros de ancho y con una fina testa. El embrión está rodeado por una membrana delgada de endospermo. Los cotiledones, que forman la mayor parte de la almendra, son planoconvexos e irregularmente plegados; cada uno tiene en su cara plana tres

grandes surcos. Tanto la testa como la almendra son de color pardo rojizo que varía en diversas variedades comerciales (Trease *et al.*, 1976).

Los cotiledones de la semilla de cacao (dicotiledónea) contienen altas concentraciones de grasa: la manteca de cacao tiene consistencia de cebo de color amarillo pálido, es quebradiza, cristalina y se derrite a temperaturas entre 32 y 35°C. Se integra por una mezcla de glicéridos; dos ácidos grasos saturados (esteárico y palmítico) y un ácido graso insaturado (oleico) (Hardy, 1960). La pulpa contiene pequeñas cantidades de aminoácidos como ácido glutámico, ácido aspártico y asparagina (Hardy, 1960). Debido a estas características, su demanda aumenta cada día, ya que es importante en la elaboración del chocolate (López *et al.*, 1987). El cacao tipo amelonado contiene más grasa que el criollo, pero en éste, la calidad del sabor del chocolate producido es superior (Pence, 1989).

En forma general, se emplean cuatro características externas en la descripción del fruto (Engels *et al.*, 1980), las cuales son:

- 1) Color; puede ser blanco o verde muy pálido cuando el fruto es joven, y de amarillo a rojizo cuando madura.
- 2) Superficie; generalmente puede ser lisa o arrugada, pero también puede representar lomos pronunciados y surcos alternos.
- 3) Base; cuello de botella, el cual puede estar presente o no.
- 4) Ápice; éste es largo y agudo, u obtuso sin punta.

IV.2. Descripción taxonómica del género *Theobroma*.

El nombre científico del árbol de cacao es *Theobroma cacao* L., tal como lo cito Linneo en la primera edición de su libro *Species Planterum* en 1753. El género *Theobroma* es un miembro del orden **Malvales** y la familia **Sterculiaceae** y está emparentado con los géneros *Herrania* y *Guazuma* (Toxopeus, 1987).

En 1964, Cuatrecasas menciona que los principales trabajos para clasificar las especies del género *Theobroma* los realizó Shumann en 1866, el cual divide el género en tres secciones; posteriormente, en 1871, Bernoulli ubica cinco secciones; para 1935, Pittier retoma las secciones de los dos autores anteriores; y en 1961 De León toma la clasificación de Pittier reubicando algunas especies y subespecies (López *et al.*, 1996).

En 1964, Cuatrecasas adopta los grupos subgenéricos de Bernoulli, pero incluye una nueva sección. De esta forma, su clasificación considera seis secciones, con 22 especies y la siguiente clave de identificación:

A. Germinación epigea, crecimiento del tallo por nuevos adventicios ortotropos, laterales y subterminales, estaminodios erectos.

A.1 Estaminodios lineales, espesos u obtusos, cogullas de los pétalos uninervias y limbo subsésiles, estambres dianteróforos, ramas primarias formadas en verticilos de tres, hojas tomentosas por el envés.

Sección	Especies
Rhytidocarpus	(01) <i>Theobroma bicolor</i>

A.2 Estaminodios lineales, subulados o lanceados, cogullas de pétalos trinervias.

A.2.1 Limbos de pétalos estirilados, estambres di o triánteros, ramas primarias en verticilos de tres, hojas tomentosas por el envés.

Sección	Especies
Oreanthes	(02) <i>Theobroma silvestre</i>
	(03) <i>Theobroma speciosum</i>
	(04) <i>Theobroma velutinum</i>
	(05) <i>Theobroma glaucum</i>
	(06) <i>Theobroma Bernoulli</i>

A.2.2 Limbos de pétalos estirilados, estambres dianteroforos, ramas primarias en verticilos de cinco, hojas glabras o pubescentes en el envés.

Sección	Especies
Theobroma	(07) <i>Theobroma cacao</i>
	Subespecie: <i>cacao</i>
	Forma: <i>lacandonense</i>
	<i>Pentagonum</i>
	<i>Leiocarpum</i>
	Subespecie: <i>sphaerocarpum</i>

B. Germinación hipógea, crecimiento pseudoapical del tallo, ramas primarias en verticilos de tres, estambres trianteróforos.

B.1 Estaminodios flexuosos en la yema floral, cogulla de los pétalos con cinco nervios, limbos de los pétalos ausentes.

Sección	Especies
Telmatocarpus	(08) <i>Theobroma gileri</i> (09) <i>Theobroma microcarpum</i>

B.2 Estaminodios reflexuosos en la yema floral, reflexuosos erectos en la antesis, cogullas de los pétalos con siete nervios.

B.2.1 Estaminodios obovados, alargados o lanceados, limbos de los pétalos muy desarrollados, estipitados.

Sección	Especies
Glossopetalum	(10) <i>Theobroma angustifolium</i> (11) <i>Theobroma cirmonilae</i> (12) <i>Theobroma stipulatum</i> (13) <i>Theobroma chocoense</i> (14) <i>Theobroma cimiarum</i> (15) <i>Theobroma grandiflorum</i> (16) <i>Theobroma obovatum</i> (17) <i>Theobroma subicanum</i> (18) <i>Theobroma hylaeum</i> (19) <i>Theobroma nemorale</i> (20) <i>Theobroma sinonosum</i> (21) <i>Theobroma canumanense</i>

B.2.2 Estaminodios obovados tan anchos como largos, limbos de los pétalos muy reducidos.

Sección	Especies
Andropetalum	(22) <i>Theobroma mammosum</i>

De la información anterior cabe destacar que las secciones ***Rhytidocarpus***, ***Theobroma*** y ***Andropetalum***, representadas por una sola especie, son las de mayor importancia agrícola y las de mayor distribución geográfica.

IV.3 Clasificación y descripción de las poblaciones cultivadas.

El cacao se divide genéticamente en tres grandes grupos: Criollos, Forasteros y una mezcla de los criollos y forasteros denominada Trinitarios (Hardy 1969).

Cacao Criollo

Dentro de este grupo se ubican las formas de ***T. cacao*** subespecie ***cacao*** que crecen espontáneamente en el sureste de México y Centroamérica (Cuatrecasas, 1964); se consideran los primeros cacaos domesticados en las regiones cálidos-húmedas, donde se ubican asentamientos de la cultura Mesoamericana (Mora, 1959).

Este grupo se caracteriza por sus frutos angostos y alargados, con punta muy pronunciada; su coloración varía según el estado de desarrollo, pueden ser de color verde, verde blanquizco en estado inmaduro y de color amarillo a rojizo cuando maduran. No obstante, su principal característica es la pigmentación de los cotiledones de la semilla, de color blanco en los granos frescos (López *et al.*, 1996).

Como se mencionó anteriormente, estos cacaos fueron los primeros que se domesticaron, lo cual no fue casual o circunstancial, ya que el hombre conocía de alguna manera sus características de alta calidad por su alto contenido de grasa, sabor y aroma; sin embargo, actualmente han perdido su importancia comercial, y están en vías de extinción, debido a sus bajos rendimientos y alta susceptibilidad a enfermedades (especialmente a la pudrición negra de la mazorca), sustituyéndolas así por cacaos forasteros (López *et al.*, 1996).

Cacao Forastero

Este grupo de materiales corresponde a ***Theobroma cacao*** subespecie ***sphaerocarpum***, cuyo genotipo característico es el denominado calabacillo, que integra poblaciones homogéneas en la Cuenca del Río Amazonas, cuyas

características morfológicas y distribución geográficas se consideran opuestas a los tipos criollos y cacaos cultivados (Cuatrecasas, 1964).

Las poblaciones de cacao forastero pueden dividirse en dos tipos principales:

- a) Forasteros del Alto Amazonas, se localizaron en la Cuenca del Río Amazonas.
- b) Forasteros del Bajo Amazonas, presentes en las Guyanas y forman un tipo bastante uniforme denominado cacao amelonado.

Estos cacaos se consideran de domesticación relativamente reciente, en comparación a los criollos, ya que al parecer en Brasil se comenzaron a cultivar a partir del año de 1740.

Cacao Trinitario

En 1944, Chesemman clasificó a la población de cacao trinitario como un tipo forastero. Existen evidencias que demuestran su origen reciente y pueden reproducirse artificialmente (Swarbrick *et al.*, 1964). Se cree que ésta es una población segregante, originada por el cruzamiento entre cacaos forasteros de Guyana y los criollos de Venezuela, ocurrido probablemente en el estuario del Río Orinoco, y más tarde una generación temprana de la cruce se introdujo en la Isla de Trinidad (Toxopeus, 1969).

En la actualidad, estas poblaciones presentan una gran variabilidad, y pueden encontrarse mezcladas en ellas formas de cacao criollo, forastero (calabacillo) y varios tipos intermedios.

IV.4. Distribución y dispersión.

El género *Theobroma* es típicamente tropical y se distribuye en forma natural en los estratos medios de las selvas cálidas húmedas del hemisferio occidental, entre las latitudes de los 18° norte (Veracruz, Tabasco; México) y los 15° sur (Matto Grosso; Brasil y Bolivia), y en altitudes desde los 0 a los 1000 msnm. La mayor parte de las especies del género *Theobroma*, tienen una distribución geográfica restringida, excepto las especies de *T. cacao* y *T. bicolor*.

La mayoría de las especies se concentran en Sudamérica, de ahí el consenso de que el género se originó en esa región y muy probablemente en la cuenca del río

Amazonas. Las especies del oriente de Brasil son bastante diferentes a las demás especies, algunas de ellas se contraponen a las del otro lado de la cordillera de los andes. Lo cual sugiere que la cordillera pudo constituirse en una barrera natural que separó a las poblaciones geográficamente, favoreciendo su diversificación.

***Theobroma cacao* L.**

T. cacao subespecie ***cacao***. Según Cuatrecasas (1964), corresponde a las formas de cacao llamadas criollos, las cuales originalmente se distribuían en el sur de México y América Central.

T. cacao subespecie ***cacao*** forma ***pentagonum***. Corresponde al cacao tipo criollo, denominado cacao lagarto, cuyo cultivo solo se ha encontrado en el Sureste de México, y otras áreas próximas. Este cacao se considera de alta calidad, de porte robusto y resistente a enfermedades.

T. cacao subespecie ***cacao*** forma ***leiocarpum***. Corresponde al cacao tipo criollo, denominado cacao gumacu en Guatemala, se distribuye en la Costa Atlántica de este país, y es raro encontrarlo en el Sureste de México y otras partes de América Central. Al igual que el anterior, se considera un material de alta calidad que corresponde probablemente al llamado criollo porcelana de Java.

T. cacao subespecie ***cacao*** forma ***lacandonense***. Corresponde al cacao silvestre colectado por Miranda (1962) en Caribal Lacanjá, selva Lacandona, Chiapas, Mexico. Se caracteriza por su hábito de crecimiento semitrepador, que no se encuentra en ninguna de las otras especies, y corresponde con su habitat; se encuentra esporádicamente en la selva y sin utilizar por los indígenas lacandones; su descubrimiento se considero un hecho importante, pues al tratarse de una planta silvestre es un probable ancestro de los cacaos cultivados en la actualidad.

T. cacao subespecie ***sphaerocarpum***. Esta subespecie corresponde a los denominados calabacillo, amelonados, forasteros amazónicos y forastero. Indudablemente este grupo es originario de América del Sur, pues se han encontrado poblaciones espontáneas en la Cuenca del Río Amazonas, al Norte y Noreste de los Andes. Estos tipos de cacao se encuentran ampliamente cultivados en plantaciones comerciales de Sudamérica y África, debido a que son cacaos rendidores (en numero

de frutos) y resistentes a enfermedades; sin embargo, son de baja calidad por lo que se les denomina cacaos corrientes.

Theobroma bicolor.

Es una especie semicultivada en áreas cálida húmeda de América, desde el Sureste de México hasta Brasil y Bolivia. Probablemente esta región sea su centro de origen, pues crece naturalmente en el estrato medio de las selvas altas perennifolias aun sin perturbar; además, aun en la actualidad la gente de Tabasco y Chiapas, a menudo lo utilizan como sustituto del cacao en la elaboración de bebidas refrescantes como el pozol o chorote. En estos estados se le denomina pataste, pataste de sapo, o pataste de mico; en Guatemala, pataste; en Costa Rica y Panamá, pataste; en Colombia, bacao; en Perú, macambo y en Brasil, cacau do Perú.

IV.5. Condiciones climáticas para el cultivo del cacao.

Los factores climáticos críticos para el desarrollo del cacao, son la temperatura y la lluvia. A estos se le unen el viento y la luz o radiación solar. El cacao es una planta que se desarrolla bajo sombra. La humedad relativa también es importante ya que puede contribuir a la propagación de algunas enfermedades del fruto. Estas exigencias climáticas han hecho que el cultivo de cacao se concentre en las tierras bajas tropicales. El cacao no soporta temperaturas bajas, siendo su límite medio anual de temperatura los 21 °C. La temperatura óptima es de 25 °C. En Tabasco, la temperatura media anual es de 26 °C, por lo que este elemento climático no es limitante para el buen desarrollo del cultivo (López *et al.*, 2003).

IV.6. Germinación de semillas.

La recuperación de la actividad biológica por parte de la semilla constituye el **proceso de germinación**. Se considera que una semilla ha germinado en el momento que ha originado una plántula capaz de convertirse a su vez, bajo condiciones externas favorables, en una planta adulta productora de nuevas semillas.

Por lo general, durante el proceso de germinación se identifican tres fases sucesivas:

a) Fase de hidratación. En esta fase se lleva a cabo una intensa absorción de agua por los distintos tejidos que forman la semilla (imbibición). Por lo general va acompañada de un aumento proporcional en la actividad respiratoria.

b) Fase de germinación. Constituye el verdadero proceso de germinación. Durante esta fase tienen lugar en la semilla importantes transformaciones metabólicas que dan lugar a la fase siguiente de crecimiento, siendo, por lo tanto, imprescindibles para el desarrollo normal de la plántula. En esta fase, se reduce considerablemente la absorción de agua por la semilla.

c) Fase de crecimiento. Representa la última etapa del proceso de germinación y se da el inicio de cambios morfológicos visibles, en concreto se inicia la elongación del eje embrionario y la emergencia de la radícula.

Durante este proceso de germinación, y a partir de la imbibición, la semilla seca inmóvil reanuda rápidamente su actividad metabólica. Actividades como la respiración, la **actividad enzimática** (para la hidrólisis de sustancias de reserva), el ácido Ribonucleico (RNA) y la síntesis de proteínas son actividades celulares fundamentales reestablecidas durante la germinación y son un pre-requisito para el crecimiento de la semilla (Briggs, 1992).

IV.7. Sustancias de reserva.

Posterior a la hidratación de los distintos tipos de tejidos que conforman la semilla, tienen lugar en ellos una serie de reacciones metabólicas de hidrólisis que transforman las sustancias nutritivas de reservas en moléculas más sencillas y asimilables para el embrión. Entre estas sustancias nutritivas de reserva se encuentran los carbohidratos, lípidos y proteínas. Las proteínas constituyen una fuente importante de reserva energética y son hidrolizadas hasta aminoácidos libres mediante enzimas hidrolíticas llamadas proteasas. Estas proteínas de reserva acumuladas en la semilla durante su desarrollo, sirven como fuente de nitrógeno, azufre y carbono, durante la germinación de la propia semilla (Shotwell *et al.*, 1988).

En las semillas dicotiledóneas, la degradación de las proteínas de reserva, va acompañada por consiguiente de una acumulación de aminoácidos libres en los cotiledones.

Por lo anterior, la actividad biológica de estas proteasas específicas se incrementa notablemente durante el proceso de germinación, por dos razones que son: 1) la activación de enzimas preexistentes y 2) por la síntesis de nuevas moléculas enzimáticas (Pérez *et al.*, 1994).

IV.8. Clasificación de las proteasas.

Siguiendo las recomendaciones de la comisión de Nomenclatura y Clasificación de las enzimas, las proteasas son hidrolasas, las cuales pertenecen al grupo 3 y se les asigna en el subgrupo 4 por actuar sobre enlaces peptídico (Dixon *et al.*, 1979).

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 *et al.*, 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 proteasa ya que éste engloba a los dos grupos (Suárez *et al.*, 1988).

Por otro lado, 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 *et al.*, 1988).

IV.9. Principales proteínas de la semilla de *Theobroma cacao* L.

Según Osborne (1924), las principales proteínas de las semillas pueden ser clasificadas con base en su solubilidad en cuatro clases: albúmina (soluble en agua), globulinas (solubles en sales), prolamina (soluble en alcoholes) y glutelina (soluble en soluciones ácidas o básicas). Las semillas de las plantas de diferentes taxas, contienen diferentes proporciones de albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas (Higgins., 1984; Shotwell *et al.*, 1988). Se ha reportado que las semillas de *T. cacao* contienen albúminas, globulinas, prolamina y glutelina, siendo la albúmina la principal fracción proteica de la semilla (Niepage, 1961; Zak *et al.*, 1976a, b). Por otro lado, se han clonado y secuenciado los ADNc de los genes que codifican la albúmina principal y una globulina de la semilla de cacao (Spencer *et al.*, 1991; 1992). La secuencia de aminoácidos del precursor de 65 KDa de la globulina de cacao deducida a partir de la secuencia nucleotídica del ADNc clonado, reveló una alta homología con las globulinas clase vicilina de algunas plantas dicotiledoneas, especialmente con una α -globulina de la semilla de algodón (Spencer *et al.*, 1992). También se encontraron dos polipéptidos con un peso molecular de 47 y 31 KDa, respectivamente, los cuales derivaron del precursor mencionado (Spencer *et al.*, 1991; 1992).

Voigt *et al.* (1993), realizaron una extracción diferencial de proteínas de *T. cacao* L. Esta extracción diferencial, reveló la presencia de una fracción de albúmina y una fracción de globulina en proporciones de 52 % y 43 %, respectivamente, del total de proteínas de la semilla de cacao. Posterior a la fermentación (primer paso en el procesamiento del cacao), la proporción de globulina fue reducida considerablemente. Por lo tanto, *T. cacao* L, fue descrita como una planta cuya semilla posee globulina clase vicilina (pero no clase legumina), como proteína de almacenamiento.

Se piensa que estas proteínas de almacenamiento, son las proteínas a partir de las cuales se derivan los precursores del aroma específico del cacao, mediante la

participación de actividades proteolíticas durante el proceso de fermentación (Biehl *et al.*, 1982b).

IV.10. Proceso de fermentación y enzimas hidrolíticas descritas en la semilla de *Theobroma cacao* L.

La fermentación de la semilla de cacao incluye dos fenómenos distintos pero no independientes: a) una fermentación microbiana de la pulpa que contribuye a eliminar la pulpa mucilaginosa presente alrededor de los granos y b) un conjunto de reacciones bioquímicas internas, que llevan entre otras cosas a la formación de los precursores del aroma específico del cacao.

Biehl *et al.*, (1993) y Voigt *et al.* (1994b), demostraron que las proteínas de reserva de la semilla de cacao, son hidrolizadas mediante proteasas, produciendo la formación de más de 80 oligopéptidos y aminoácidos libres diferentes.

En la semilla de *T. cacao* L., se ha descrito una **aspartil proteinasa**, la cual ha sido considerada una enzima clave, involucrada en la formación de los precursores del aroma del cacao, generados básicamente durante la fermentación de la semilla. Estos precursores son una mezcla de péptidos y aminoácidos hidrofóbicos (alanina, valina, leucina, fenilalanina, etc.), los cuales calentados y en presencia de glucosa producen la formación de un aroma específico (Rohan, 1964; Biehl *et al.*, 1982b, 1985; Kirchhoff *et al.*, 1989). Durante este proceso de fermentación, la pulpa alrededor de la semilla es degradada por microorganismos y los azúcares son transformados en ácidos, principalmente ácido acético. Los ácidos penetran en la semilla y causan la acidificación en el tejido de reserva. Como el pH baja, la semilla pierde su estructura celular y posteriormente, ocurre la hidrólisis de las proteínas de reserva (Biehl *et al.*, 1982a; 1985). Se ha propuesto que los precursores del aroma, son derivados a partir de la degradación de la albúmina (7S) clase vicilina contenida en la semilla del cacao. Esta degradación es llevada a cabo por una **proteínasa aspártica** y una **carboxipeptidasa** presentes en la semilla madura del cacao no germinado (Voigt *et al.*, 1994 a, b, Voigt *et al.*, 1995).

Hansen *et al.*, (1998), realizaron estudios sobre la determinación de las actividades enzimáticas de endoproteasa, aminopeptidasa y carboxipeptidasa presentes en la

semilla de cacao durante la fermentación. La proteinasa aspártica o endoproteasa conservó el 50 % de la actividad enzimática después de 4 días de fermentación, no se inactivó con el secado solar ni artificial, lo cual indicó una gran estabilidad durante todo el proceso de fermentación. La aminopeptidasa tuvo un pH óptimo de 7.0, y fue muy sensible a la fermentación, conservando solamente el 5 % de su actividad después de dos días de fermentación; sin embargo, fue estable al secado solar y artificial. La carboxipeptidasa resultó más estable que la aminopeptidasa, conservando entre el 50 y 15 % de su actividad, después de 3 o 4 días de fermentación respectivamente, y no resultó inactivada por secado solar y artificial. Además dichas enzimas, permanecieron activas en la semilla seca.

Se ha reportado que en las semillas maduras del cacao no germinado, la actividad proteolítica predominante detectada es la actividad de aspartil proteinasa. Esta actividad es encontrada en niveles muy altos en la semilla de cacao, comparado con los niveles detectados en las semillas de otras plantas (Voigt *et al.*, 1997). La actividad enzimática de esta proteinasa parcialmente purificada resultó ser óptima a pH 3.5 y sensible a Pepstatina A (Biehl *et al.*, 1993). Posteriormente, se purificó otra proteinasa aspártica, la cual resultó estar formada de dos péptidos (29 y 13 kDa) derivados de un único zimógeno precursor de 42 kDa (Voigt *et al.*, 1995). Mediante el uso de anticuerpos específicos para la aspartil proteinasa purificada, Voigt *et al.*, (1995) demostraron que esta enzima se acumula en presencia de vicilina durante la maduración de la semilla. Además, el nivel de actividad permanece constante durante los primeros días de la germinación y no disminuyen sino hasta que se inicia la degradación de la globulina.

En 2002, Laloi *et al.*, aislaron y caracterizaron dos genes codificantes de aspartil proteinasa (*TcAP1* y *TcAP2*) a partir de la semilla de cacao. Los estudios de expresión mediante análisis Northern y la clonación del cDNA indicaron que ambos genes se expresan durante el desarrollo de la semilla de cacao. Estos genes se expresan en la etapa temprana del desarrollo de las semillas y sus niveles de RNAm disminuyen hacia la etapa final de maduración. *TcAP2* es expresado en niveles muchos más altos que *TcAP1*; sin embargo, el nivel del RNAm de *TcAP2* se incrementa levemente durante la germinación. Ambos genes comparten un 73% de identidad. El hecho de que ambos

genes tengan diferentes patrones de expresión, sugiere que ambas proteasas pueden tener diferentes funciones en la maduración de las semillas y durante la germinación.

IV.11. Función de las aminopeptidasas (APE's) descritas en plantas.

Las Aminopeptidasas (APE's) son enzimas que liberan residuos de aminoácidos amino terminales, a partir de proteínas y péptidos. Con respecto a su función, estas enzimas están involucradas en el recambio proteico. Un papel fisiológico bien conocido para las APE's de plantas, es la movilización de las proteínas de reserva durante la germinación de las semillas (Couton *et al.*, 1991; Mikkonen, 1992; Yamahoka *et al.*, 1994). Algunos reportes, han propuesto que las APE's podrían tener otras funciones en procesos biológicos fundamentales como el mantenimiento de la vida media de las proteínas (Amrani *et al.*, 1995), respuesta de defensa a infecciones y heridas (Pautot *et al.*, 1993), maduración de proteínas (Giglione *et al.*, 2000) y transporte de auxinas (Murphy *et al.*, 2000).

En hojas de pepino (*Cucumis sativus* L.), se ha detectado mucha actividad de APE, esta enzima libera preferentemente Alanina a partir de sustratos artificiales y fue purificada y caracterizada. La enzima resultó tener un peso molecular de 200 kDa y consiste de dos subunidades de 95 kDa. Se trata de una metaloproteasa que tiene un pH óptimo de 8 a 9 y libera Alanina, Glycina, Metionina, Serina, Leucina, Lysina y Arginina a partir de sustratos artificiales. La secuencia interna de aminoácidos fue similar a las Aminopeptidasas N (clan MA, familia M1) descrita en microorganismos como *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*, y muy similar a una aminopeptidasa N putativa de *Arabidopsis thaliana*. De estos resultados, los niveles altos de actividad de aminopeptidasa en hojas de pepino fueron asignados a una Aminopeptidasa N de plantas. Los resultados también indican la presencia de otras dos enzimas APE con diferente masa molecular que liberan preferentemente Met y Leu a partir de sustratos artificiales (Yamauchi *et al.*, 2001).

En tomates (*Lycopersicon esculentum*), se ha detectado la expresión de dos formas de Leucina aminopeptidasa que han sido denominadas LAP-A (pI ácido) y LAP-N (pI neutral), así como dos proteínas semejantes a LAP. La máxima relación entre las proteínas LAP-N y LAP-A fue determinada usando anticuerpos purificados por afinidad

y dirigidos contra cuatro dominios de la proteína LAP-A. Los anticuerpos para epitopes localizados en la región N-terminal fueron capaces de discriminar entre LAP-A y LAP-N, mientras que los anticuerpos que reconocieron la región central y COOH-terminal, reconocieron a ambos polipéptidos LAP. Los inmunoblots de dos dimensiones, demostraron que las proteínas LAP-N y semejantes a LAP, fueron detectadas en todos los órganos vegetativos (hojas, vástagos, raíces y cotiledones) y reproductivos (sépalos, pétalos, estambres y brotes florales) examinados, mientras que la proteína LAP-A mostró un programa de expresión distinto (Tu *et al.*, 2003).

LapN resultó ser un gen de una sola copia que codifica un transcripto de clase rara. La clona de ADNc LapN de longitud completa fue aislada y la secuencia peptídica deducida tuvo un 77% de identidad con la secuencia péptidica de la proteína LAP-A inducida por heridas. La comparación de LAP-N con otras LAP's de plantas, identificó 28 residuos firma que permitieron clasificar a las proteínas LAP como proteínas semejantes a LAP-N o LAP-A. La sobreexpresión de la proteína de fusión His₆-LAP-N en *Escherichia coli*, demostró diferentes niveles de actividad de His₆-LAP-N y His₆-LAP-A. De manera similar a LapA, el RNA LapN codificó una proteína precursora con una masa molecular de 60 kDa. La presecuencia de 5 kDa tuvo características similares a los péptidos plástidos transitorios, y el procesamiento de la presecuencia LAP-N, podría generar una proteína LAP-N madura de 55 kDa. De manera contraria a LapA, el transcripto LapN, contiene un segundo marco ATG, y la utilización de potencial de dicho codón de inicio podría producir una proteína LAP-N de 55 kDa. Finalmente, los autores proponen que la localización LAP-N podría estar controlada por el balance entre la utilización del sitio de inicio traduccional y el procesamiento de la preproteína LAP-N (Tu *et al.*, 2003).

IV.12. Leucina aminopeptidas (LAP's) especies específicas de plantas con importantes papeles de defensa.

Las LAP's con pH óptimo alcalino han sido bioquímicamente purificadas a partir de algunas plantas (Walling, 2004) y relativamente pocas de estas enzimas han sido suficientemente caracterizadas para demostrar sus estructuras hexaméricas. Se ha descrito que las LAP's de plantas pueden tener un papel importante en la obtención

de N y C de los cotiledones de semillas en germinación. Sin embargo, estudios recientes indican que las LAP's no pueden ser los principales contribuyentes del proceso de removilización de nitrógeno (Yang *et al.*, 2004).

Las LAP's de plantas de la familia M17 mejor caracterizadas son LAP-A y LAP-N de tomate (*Solanum lycopersicom*, antes *Lycopersicon esculentum*) (Walling, 2004). Usando inmunotransferencia 2D-PAGE, las proteínas LAP-N han sido detectadas en hojas de todas las plantas examinadas a la fecha, incluyendo el maíz, la cebada, el tabaco, *Arabidopsis*, *Brassica*, la soya, etc. (Chao *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 2003). *Arabidopsis* tiene tres genes (LAP1, LAP2 y LAP3) que codifican proteínas relacionadas con LAP-N (Walling, 2006). El gen LAP1 de *Arabidopsis* no tiene una pre-secuencia y es probable que sea de localización citosólica. La transcripción abundante de este gen no muestra un cambio apreciablemente durante el desarrollo o en respuesta al estrés (Bartling *et al.*, 1994).

Las Proteínas semejantes a LAP-A han sido encontradas sólo en un conjunto de la familia Solanaceae (Chao *et al.*, 2000). El genoma del tomate alberga dos genes LapA (LapA1 y LapA2), mismos que codifican proteínas que son >99% idénticas. Los genes LapA1 y LapA2 están situados en tándem, con aproximadamente 6 kb de separación entre sus regiones codificantes (Chao *et al.*, 2000). Los RNAs y las proteínas de LapA son regulados durante su desarrollo y en respuesta al estrés biótico y abiótico (Walling, 2004). Los RNA de LapA no han sido detectados en raíces u hojas sanas; pero se encuentran de manera abundante en todos los órganos florales, brotes florales, flores maduras y frutos en desarrollo. Los transcritos de LapA son abundantes después de las heridas, daño de tejidos por ataque de insectos (*Manduca sexta*, *Spodoptera littoralis*), infecciones por patógenos (*Pseudomonas syringae pv tomato*, *Phytophthora parasitica*), déficit de agua y estrés salino.

LapA es regulado por la vía octadecanoide del tomate, la cual es paralela a la vía biosintética de las prostaglandinas en animales. En plantas, la vía octadecanoide es activada después del daño a tejidos, convirtiendo el ácido linolenico (C₁₈) a la oxilipina ácido jasmónico (JA) (Ryan., 2000). Consistente con la inducción por heridas, los transcritos de LapA se acumulan en respuesta a JA, ácido abscisico y sistemina (un

péptido bioactivo que activa la vía octadecanoide) y declina en respuesta al ácido salicílico, un conocido antagonista de la señalización por heridas (Chao *et al.*, 1999).

JA activa genes de respuesta temprana y tardía a heridas (Ryan, 2000). Los genes de respuesta temprana a heridas codifican proteínas que amplifican la vía de señalización del octadecanoide, aumentando las señales por herida (prosistemina, poligalacturonasa), lípidos substrato de C₁₈ (lipoxigenasas), o enzimas oxilipinas biosintéticas. Muchos genes de respuesta tardía a heridas, codifican proteínas antinutritivas, tales como inhibidores de Serina proteinasas, polifenol oxidasa, arginasa y treonina desaminasa (Chen *et al.*, 2005). LapA es un gen de respuesta tardía a heridas. LapA es transcripcionalmente controlado (Chao *et al.*, 1999) y la región entre -313 y -78 es suficiente para la inducción del promotor de LapA regulada por JA (Ruiz-Rivero *et al.*, 1998). Esta regulación es medida por dos factores de transcripción MYC (JAMYC2 y JAMYC10) inducidos por JA que se unen a un motif repetido (GAGTA) (Boter *et al.*, 2004). Por otro lado, la mutagénesis ha demostrado que un motif de AACGTG también es necesario para la inducción de LapA por JA.

Aunque la función de LAP-A no se conoce, se ha postulado que LAP-A puede tener un papel antinutritivo en el aparato digestivo alcalino de insectos. Esta conclusión se basa en el hecho de que LapA es corregulado con muchos genes que confieren propiedades antinutritivas al follaje (Chao *et al.*, 1999), que LAP-A es excepcionalmente estable en el aparato digestivo alcalino del lepidóptero (Chen *et al.*, 2005), y que LAP-A tiene un pH óptimo alcalino (Gu *et al.*, 1999). Un papel directo de LAP-A en la defensa, es coherente con el papel de las endopeptidasas en la disuasión y la defensa contra insectos (Pechan *et al.*, 2002).

También se ha propuesto que LAP-A podría regular la señalización por heridas (Walling, 2006), y los análisis recientes sobre el silenciamiento de *LapA* en plantas apoya esta premisa (Matsui *et al.*, 2006). Aún no se ha esclarecido si la capacidad de LAP para regular la respuesta a heridas es dependiente de la actividad de aminopeptidasa o de una manera semejante a las LAPs procarióticas, LAP-A en el tomate podría actuar como un regulador transcripcional. Los Microarreglos se están utilizando para probar dicha hipótesis y para identificar la cascada de genes que son regulados por *LapA* (Matsui *et al.*, 2006).

IV.13. Sistema de amplificación rápida de los extremos 3' del ADNc (RACE; System for Rapid Amplification of cDNA Ends.

La amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE), es un procedimiento para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos, a partir de un RNA mensajero molde. La región amplificada se ubica entre un sitio interno definido y cualquiera de los extremos 3' o 5' del RNA mensajero (Frohman *et al.*, 1988). Esta metodología de amplificación con especificidad de un solo lado, ha sido descrita por otros investigadores como RCP “one side” (Ohara *et al.*, 1989) o RCP “anchored” (Loh *et al.*, 1989). En general, la amplificación por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) de moléculas blanco escasas en una mezcla compleja, requiere dos oligonucleótidos iniciadores secuencia específica que flanqueen la región de la secuencia a ser amplificada (Saiki *et al.*, 1985, 1988). Sin embargo, para amplificar y caracterizar las regiones de secuencias desconocidas, este requerimiento impone una severa limitación (Loh *et al.*, 1989).

El RACE 3' aprovecha la cola de poly(A) natural presente en el ARN mensajero como un sitio general de alineamiento para la amplificación por RCP. En este procedimiento, los ARN mensajeros son convertidos en ADNc usando la transcriptasa reversa (RT) y un oligonucleótido adaptador oligo-dT. El ADNc específico, es entonces amplificado directamente por RCP usando un oligonucleótido gen específico (GSP) que se alinea una región de la secuencia de un exón conocido y un oligonucleótido adaptador que se alinea a la región de la cola de poli(A). Lo anterior, permite la captura de los extremos 3' de las secuencias de ARN mensajero desconocidas posicionada entre el exón y la cola de poli(A).

El RACE 5' o RCP “anchored”, es una técnica que facilita el aislamiento y la caracterización de los extremos 5' a partir de moléculas de ARN mensajero en bajo número de copia. El método ha sido revisado por Frohman (1990; 1993) y Loh (1991). Aunque el protocolo preciso varía entre diferentes usuarios, la estrategia general es consistente. La síntesis de la primera cadena de ADNc es iniciada usando un oligonucleótido gen específico anti sentido (GSP1). Esto permite la conversión de un ARN mensajero específico, o familias relacionadas de ARN mensajeros, y maximiza el potencial para completar la extensión de los extremos 5' de los ARN mensajeros.

Posterior a la síntesis del ADNc, el producto de la primera cadena es purificado para eliminar los dNTP's así como el oligonucleótido GSP1 no incorporado. La enzima TdT (Deoxinucleotidil transferase terminal) es usada para incorporar colas homopoliméricas a los extremos 3' del ADNc. En el protocolo original, el ADNc coleado es entonces amplificado por RCP usando una mezcla de tres oligonucleótidos iniciadores: un oligonucleótido iniciador gen específico anidado (GSP2), mismo que se alinea al extremo 3' del oligonucleótido iniciador GSP1; y una combinación de un oligonucleótido iniciador de anclaje que contiene la cola homopolimérica complementaria, mismo que corresponde al oligonucleótido adaptador que permite la amplificación de la cola homopolimérica. Esto permite la amplificación de secuencias desconocidas entre el GSP2 y el extremo 5' del ARN mensajero.

Los procedimientos RACE han sido usados para la amplificación y clonación de ARN mensajeros raros que puedan escaparse, o ser un reto para los métodos convencionales de clonación de ADNc (Loh, 1991). Además, el RACE puede ser aplicado a librerías de ADNc existentes (Berthold, 1989). Los productos de reacciones RACE pueden ser secuenciados directamente sin ningún paso de clonación intermedio (Brow, 1990; Adams *et al.*, 1991), o pueden ser usados para la preparación de sondas (Frohman *et al.*, 1989). Los productos generados por el procedimiento RACE 3' y 5' pueden ser combinados para generar ADNc de longitud completa (Frohman *et al.*, 1989; Frohman, 1990). Finalmente, el RACE puede ser utilizado en conjunto con los métodos de captura de exones (Buckler *et al.*, 1991) para permitir la amplificación y posterior caracterización de secuencias codificantes desconocidas.

Sistema RACE 3'.

El sistema RACE 3' es un procedimiento resumido en la figura 4, La primera cadena del ADNc es sintetizado a través del ARN total o la cola de poli (A)⁺ usando un primer adaptador (AP). Después de la síntesis de la primera cadena de ADNc, el molde de ARN mensajero original es eliminado por el tratamiento con el RNase H, la cual es específica para moléculas heteroduplex ARN:ADN. La amplificación es realizada sin extracciones orgánicas intermedias o precipitaciones con etanol, usando dos primer: un iniciador gen específico (GSP) diseñado por el usuario, mismo que se alinea a un sitio

localizado dentro de la molécula de ADNc; el otro es un oligonucleótido de amplificación universal diseñado a partir del ARNm y que une al ADNc en el extremo 3' ARNm.

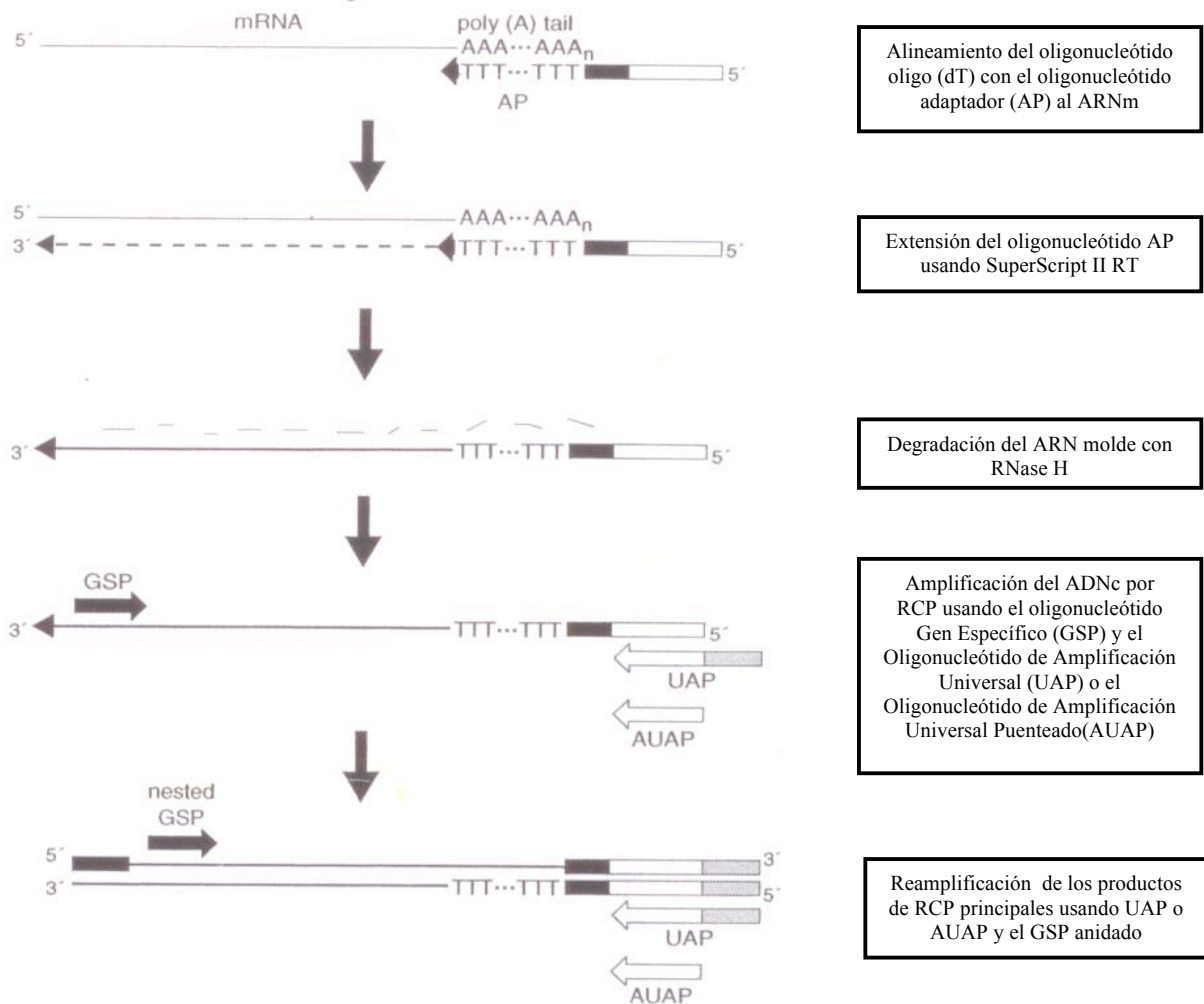


Figura 4. Esquema general del procedimiento del sistema RACE 3'

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de *T. cacao* L. de la variedad de cacao criollo almendra blanca, fueron obtenidas del Rancho La Joya ubicado en Cunduacán, Tabasco. Las semillas fueron previamente germinadas en condiciones de esterilidad. La actividad enzimática de tcAPE fue determinada en los polvos secos de cacao (PDA), preparados a partir de los cotiledones de las semillas germinadas y fermentadas de cacao (desprovistas del mucilago). Por otro lado, el ARN fue extraído a partir de diferentes órganos de la planta (radículas y cotiledones de 15 días de germinación), empleando el método descrito por Da Silva Gesteira *et al.*, (2003). El ARN fue cuantificado y tratado con DNasa I libre de RNasa. A continuación, los extremos 3' de fragmentos de ADNc de posibles genes codificantes de proteasas con actividad de aminopeptidasa de *T. cacao* L., fueron amplificados por el "Sistema RACE 3' (System for Rapid Amplification of cDNA Ends).

V.1. Muestreo.

Los árboles de cacao florecen dos veces al año, siendo el principal periodo de floración en junio y julio. En los meses de septiembre y octubre tiene lugar una segunda floración en menor escala. El periodo de maduración de los frutos oscila entre los cuatro y los seis meses. Así la primera cosecha se concentra en los meses de octubre, noviembre y diciembre y la segunda durante marzo y abril. Las muestras se tomaron en el mes de marzo, seleccionando 3 mazorcas maduras de diferentes arboles, con características fenotípicas homogéneas (color y tamaño) y libres de enfermedades y plagas.

V.2. Condiciones de germinación.

Las semillas de cacao tienen una germinación mínima del 90 % y su proceso germinativo se completa a los 15 días.

Las semillas de *T. cacao* L. fueron germinadas en el sustrato inerte agrolita hidratada a saturación. La agrolita fue colocada en frascos de vidrio y esterilizada en autoclave All, American, modelo 75X a 121 °C durante 15 min. El material vegetativo fue desprovisto del mucílago y colocado en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 3 min. A continuación, las semillas fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril y puestas a germinar en los frascos con agrolita estéril, preparados previamente. Las

semillas fueron germinadas durante 15 días a temperatura ambiente. Finalmente, se tomaron semillas germinadas cada 24 horas y se guardaron a -80 °C (Laloi *et al.*, 2002).

V.3. Condiciones de fermentación de la semilla de *T. cacao* L.

La fermentación de semillas fue realizada con la colaboración del Dr. Pedro García Alamilla del Instituto Tecnológico de Villahermosa, siguiendo el método de cajas de cedro. Las semillas de cacao del genotipo criollo almendra blanca (1g aproximadamente) cubiertas por el mucílago, fueron fermentadas en bolsas de mallas, las cuales fueron insertadas dentro de 100 kg de semillas (masa fermentante). La masa fermentante fue removida cada 24 h durante 6 días, hasta concluir el proceso de fermentación (Hansen *et al.*, 2000; López *et al.*, 2003). Las semillas fueron almacenadas a -80 °C y empleadas posteriormente para la preparación de los polvos secos de cacao (PDA) y realizar la determinación de la actividad enzimática de tcAPE.

V.4. Determinación bioquímica de la actividad de tcAPE de *T. cacao* L. durante los procesos de germinación y fermentación.

V.4.1. Extracción con acetona de los polvos de cacao.

Los polvos secos de cacao (PDA), fueron preparados a partir de los cotiledones de las semillas fermentadas de cacao (desprovistas del mucílago). Previo a la extracción, la pulpa y testa, fueron retiradas de las semillas. Los cotiledones fueron molidos con nitrógeno líquido hasta la obtención polvos finos mediante el empleo de mortero y pistilo. Muestras de 3 g de PDA fueron extraídos cinco veces con acetona al 80 % a -20 °C y tres veces con acetona al 100 % (3 mL/g de PDA) en un tubo de centrífuga de 50 mL. Las extracciones fueron realizadas a 4 °C, usando un homogenizador Omni TH y aplicando un pulso de 15 segundos a baja velocidad con vortex Labnet VX100. Los homogenizados fueron centrifugados a 5000 x g durante 5 minutos a 4 °C y a 10 000 x g para las últimas tres extracciones en una centrifuga (Sigma 3-16K). Finalmente, el solvente fue desechado, y la pasta fue secada al aire a temperatura ambiente. Posteriormente, la pasta seca se molió a polvo fino con mortero. Los polvos secos de color blanco/ligeramente amarillo, fueron guardados -20°C, y se usaron para la

preparación del extracto enzimático (fuente de enzima) y posterior determinación de la actividad enzimática de tcAPE (Hansen *et al.*, 1998).

V.4.2. Obtención del extracto enzimático para la determinación de la actividad enzimática de tcAPE.

El extracto enzimático fue preparado a partir de 15 mg de PDA y 30 mg de polivinilpolipirrolidona en 900 μ l de regulador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0, Triton X-100 al 1% en agitación constante. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 30 minutos y centrifugada a 10,000 x g y 20,000 x g durante 10 minutos a 4 °C, en una centrifuga (Sigma 3-16K) previa separación del sobrenadante. Finalmente, el sobrenadante fue separado y empleado como fuente de enzima en la determinación de la actividad enzimática de tcAPE.

V.4.3. Determinación de la actividad de tcAPE con el sustrato H-Leu-pNA.

La actividad enzimática de tcAPE fue determinada en tubos eppendorf de 1.5 ml con 100 μ Lt de extracto enzimático; 370 μ Lt de regulador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0, Triton X-100 al 1%; 30 μ Lt del sustrato Leucina-*p*-NA (H-Leu-*p*NA) a una concentración de 10 mM. La mezcla fue agitada en vortex (marca Labnet VX100), incubada a 37 °C en baño de agua (marca Tectron Bio) durante 30 min. A continuación, la reacción fue detenida con 400 μ Lt de ZnSO₄ al 5 % y 100 μ Lt de Ba (OH)₂ al 7.5%, seguido de agitación en vortex (marca Labnet VX100) y centrifugación a 13,201 x g durante 10 min, en una centrifuga (centrifuge 5415 C). El sobrenadante fue leído a una longitud de onda de 405 nm, en un Espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 25, para valorar la *p*-nitroanilina liberada. Las absorbencias obtenidas se interpolaron en una curva tipo de *p*-nitroanilina (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

Una **unidad de actividad enzimática de tcAPE** se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de *p*-nitroanilina por min a 37 °C y pH 7.0.

V.4.4. Determinación de la proteína total.

La proteína total fue determinada en todos los extractos enzimáticos preparados, siguiendo la técnica de Micro-Markwell (Lowry *et. al.*, 1951). Se usaron 100 μ Lt de

extracto enzimático mezclado con 200 µLt de agua destilada. Posteriormente, se agregó 1000 µLI de reactivo A (Na₂CO₃ al 2%, NaOH al 0.4%, SDS al 1%, Tartrato de sodio y potasio al 0.16%) mas reactivo B (CuSO₄ 5 H₂O al 4%) en una proporción de 100:1, en agitación constante y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se agregó 100 µLt del reactivo Folin-agua en una proporción 1:1 en agitación constante. Finalmente, la mezcla fue incubada a 37 °C durante 45 minutos baño de agua (marca Tectron Bio). Los péptidos revelados se leyeron a una longitud de onda de 660 nm y los valores de absorbencia obtenidos, se interpolaron en una curva patrón de albúmina de suero bovino.

V.4.5. Formulario para el cálculo de la actividad enzimática de tcAPE

V.4.5.1. formulario para determinar la concentración de la proteína total (mg Proteína total/mg PDA).

Proteína total (mg Proteína total/mg PDA):

$$\text{mg Proteína Total/mL de extracto enzimático} = \frac{(\text{Abs}_{660\text{nm}})(\text{Factor de dilución})(\text{Factor de la curva tipo de albúmina})}{1000}$$

$$\text{mg proteína total/mg PDA} = \frac{\text{mg Proteína total/mLt}}{15 \text{ mg PDA}}$$

V.4.5.2. Formulario para determinar los niveles de actividad enzimática específica de tcAPE (U/mg Proteína total).

Actividad total (U/mg PDA)

$$\text{U/ml} = \frac{(\text{Abs}_{405 \text{ nm}}) (\text{Factor de dilución}) (\text{Factor de la curva tipo de } p\text{-nitroanilina})}{\text{Tiempo}}$$

$$\text{U/mg PDA} = \frac{\text{U/mLt}}{15 \text{ mg PDA}}$$

Actividad específica (U/mg Proteína total)

$$\text{U/mg Proteína total} = \frac{\text{U/mg PDA}}{\text{mg Proteína total/mg PDA}}$$

V.4.6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos se realizó a través del paquete estadístico SAS, versión 9.1.3 (SAS, 2003). A los datos de actividad específica de tcAPE determinados durante los procesos de germinación y fermentación, se le realizó el análisis de varianza mediante el procedimiento PROC GLM en un diseño completamente al azar, se realizaron comparación de media mediante la prueba de Tukey. Se establecieron 15 y 6 tratamientos que corresponden a los días de muestreo durante los procesos de germinación y fermentación respectivamente, y 3 repeticiones por tratamiento.

V.5. Amplificación de fragmentos de ADNc de posibles genes codificantes de proteasas con actividad de aminopeptidasa (tcAPE) presentes en la semilla de *T. cacao* L.

V.5.1. Diseño de iniciadores para la amplificación de posibles genes codificantes de tcAPE.

Los oligonucleótidos iniciadores GSP (Gene-Specific Primer; Oligonucleótido Gen Especifico) fueron diseñados con base en las secuencia de genes APE descrito en otros organismos. Las secuencias nucleotídicas codificantes de genes APE descritos, fueron tomadas de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y posteriormente, fueron alineadas 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 y Nicholas, 1997). El alineamiento gráfico mostró las regiones con un alto grado de identidad. Los oligonucleótidos iniciadores GSP fueron diseñados con la ayuda del software DNAMAN versión v. 3.0 (Lynnon BioSoft, 1994-1997). De esta manera, se verificó la no auto-complementariedad del iniciador y se calculó la temperatura de fusión (T_m), así como la temperatura de alineamiento (T_a).

V.5.2. Extracción de ARN total de *Theobroma cacao* L.

El ARN fue extraído a partir de diferentes órganos de la planta (radículas y cotiledones), empleando el método descrito por Da Silva Gesteira *et al.*, (2003). Previo a la extracción del RNA, todas las soluciones fueron preparadas con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1%(v/v), solo el regulador Tris fue preparado con agua tratada con DEPC. El material de vidrio, espátulas, morteros y pistilos, fueron tratados con una solución de DEPC al 0.1%(v/v) y esterilizados en calor seco durante 4 horas a 200 °C en estufa marca Blu M, antes de utilizarlas. Las muestras fueron molidas con nitrógeno líquido hasta obtener polvos finos, se transfirieron a un tubo de centrifuga de 2 mLt, se homogenizaron con 1 mLt de regulador de homogenización (ácido bórico 0.2 M, EDTA 10 mM, pH 7.6 ajustado con Tris), 20 µLt de dodecill sulfato de sodio (SDS) al 25% y 20 µLt de β-mercaptoetanol 14.3 M. La mezcla se agitó vigorosamente en vortex (Labnet VX100), durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 15,000 x g durante 10 min a 4 °C en centrifuga (Sigma 3-16K). La fase acuosa superior que contenía ácidos nucleicos y polisacáridos, fue transferida cuidadosamente a un tubo nuevo. A continuación, los ácidos nucleicos fueron extraídos con 1 mLt de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1; v/v/v), agitados en vortex (Labnet VX100) durante 10 min, y centrifugado a 15,000 x g durante 10 min a 4 °C en una centrifuga (Sigma 3-16K). La fase acuosa superior fue transferida a un nuevo tubo y se le agregó 1 mLt de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1; v/v), para eliminar trazas de fenol. A continuación, los tubos se centrifugaron a 15000 x g durante 10 min a 4° C en una centrifuga (Sigma 3-16K). Para separar los ácidos nucleicos de los polisacáridos, se realizó una primera precipitación fraccionada, para lo cual, se agregó 70 µLt de acetato de sodio 3M, pH 4.5, y 308 µLt de tert-butanol (0.4 volúmenes), se incubó en hielo durante 30 min con agitación constante. La fase superior acuosa fue transferida a un tubo nuevo (700 µLt), incubado en hielo durante 30 min con agitación constante en un agitador magnético (junior orbit shaker) y centrifugado a 15000 x g durante 10 min a 4 °C en una centrifuga (Sigma 3-16K). El sobrenadante fue recuperado y mezclado con 462 µLt de ter-butanol, incubado en hielo durante 30 min y centrifugado a 15000 x g durante 20 min a 4 °C en una centrifuga (sigma 3-16K). Finalmente, el precipitado fue

lavado con alcohol etílico al 70% y resuspendido con 900 μ Lt de regulador de homogenización. La segunda precipitación diferencial de polisacáridos fue realizada agregando 90 μ Lt de acetato de sodio 3M, pH 4.5 y 396 μ Lt de ter-butanol (0.4 volúmenes), incubados en hielo durante 30 min con agitación constante (agitador magnético junior orbit shaker) y centrifugado a 15000 x g durante 10 min a 4 °C en una centrifuga (Sigma 3-16K). El sobrenadante fue recuperado y mezclado con 594 μ l de ter-butanol, incubado en hielo durante 30 min y centrifugado a 15000 x g durante 20 min a 4 °C en una centrifuga. Finalmente, el precipitado fue lavado con alcohol etílico al 70% y resuspendido en agua tratada con DEPC (Da Silva Gesteira, et al., 2003).

V.5.3. Cuantificación del ARN total.

La pureza y concentración del ARN purificado fue determinada espectrofotométricamente midiendo la absorbencia a 260 nm y considerando que 1U A_{260} equivale a 40 μ g/mLt de ARN de cadena sencilla. La calidad del ARN se determinó por la relación de absorbancia A_{260} / A_{280} y considerando que preparaciones puras de ARN tienen una relación $A_{260}/A_{280} \geq 2.0$ (Sambrook, *et al.*, 1989).

V.5.4. Electroforesis del ARN total en geles de agarosa al 1%.

El RNA extraído fue sometiendo a electroforesis en geles de agarosa al 1% en regulador TAE 1X (Trizma Base ultrapuro 40 mM, ácido acético glacial 20mM y EDTA 1mM) tratado con DEPC. La electroforesis fue llevada a cabo a 5 Volts/cm durante 1 h. El gel fue teñido con bromuro de etidio (1 μ g/mLt). Las bandas de los ARN ribosomal 18S y 28S (ARNr 18S y 28S), se visualizaron en un transiluminador para confirmar la integridad del ARN total. La imagen fue capturada empleando el sistema fotodocumentador de imágenes MiniBIS Pro (Marca DNR).

V.5.5. Tratamiento del ARN total con DNasa I libre de RNasa

El ARN total extraído, fue tratado con DNasa I libre de RNasa (Grado amplificación; Invitrogen Carlsbad, CA, USA), para eliminar el DNA residual. Brevemente, 10 μ g de ARN (aproximadamente 1 μ g/ μ l) fueron tratados con 2 μ Lt de DNasa (1 U/ μ Lt), 5 μ Lt de

buffer de la enzima 10X. La mezcla de reacción fue llevada a un volumen final de 50 μ Lt con agua de DEPC e incubada durante 25 min a 37 °C en termoblock (Labnet). La reacción fue detenida con 2 μ Lt de EDTA 25 mM e incubada durante 15 min a 65 °C en termoblock (Labnet) para inactivar a la enzima. A continuación se agregó 150 μ lt de agua de DEPC (volumen final de 200 μ Lt). Finalmente el ARN total tratado con DNasa I libre de RNasa fue almacenado a -20° C.

El ARN total tratado con DNasa I libre de RNasa fue extraído con un volumen (200 μ lt) de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1; v/v/v). La mezcla fue agitada suavemente hasta homogenización en vortex (Labnet VX100) y centrifugada durante 5 min a 13,201 x g (12,000 rpm) a 4 °C en una centrifuga (Sigma 3-16K). La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le agregó un volumen (200 μ Lt de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1; v/v), se agitó suavemente hasta su homogenización en vortex marca Labnet VX100 y se centrifugó durante 5 min a 13,201x g (12,000 rpm) en una centrifuga (Sigma 3-16K). La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le agregó 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M y dos volúmenes de etanol absoluto (400 μ Lt), se agitó suavemente en vortex (Labnet VX100), se dejó precipitar a -70 °C durante toda la noche. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 13,201x g (12,000 rpm) a 4 °C en una centrifuga (Sigma 3-16K). El sobrenadante fue decantado y la pastilla lavada con etanol al 80%, se centrifugó durante 10 min a 13,201x g (12,000 rpm) a 4 °C en vortex (Labnet VX100). El etanol fue decantado nuevamente y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. El ARN total fue resuspendido en 12 μ Lt de agua de DEPC, incubado a 50 °C durante 5 min en termoblock (Labnet). El ARN total libre de ADN, fue cuantificado por espectrofotometría usando 2 μ Lt, fue leído a una longitud de onda de 405 nm, en un Espectrofotómetro PerkinElmer Lamda 25.

V.5.6. Amplificación del extremo 3' del ADNc por RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).

V.5.6.1. Síntesis de la primera cadena de ADNc.

La amplificación de los extremos 3' del ADNc de posibles genes tcAPE, fue llevada a cabo empleando el sistema RACE 3' (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las

recomendaciones del fabricante. El sistema fue desarrollado empleando 2 µg de ARN total tratado con DNasa I. El ARN total fue colocado en un tubo de 0.2 mL y agua tratada con DEPC a un volumen final de 11.0 µL. A continuación, se agregó 1 µL del oligonucleótido iniciador AP 10 µM (Oligonucleótido adaptador; adapter primer). La mezcla de reacción fue agitada suavemente en vortex (Labnet VX100), recolectada por centrifugación (centrifuge 5415 C) e incubada durante 10 min a 70 °C en termociclador (Techne). El tubo fue incubado en hielo durante 1 min y la mezcla fue colectada mediante una breve centrifugación (centrifuge 5415 C). A continuación, se le agregaron los siguientes componentes: 2.0 µL de regulador de RCP 10X, 2.0 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTP 10 mM y 2.0 µL de DTT 0.1 M. La mezcla fue agitada suavemente en vortex (Labnet VX100) y colectada con una centrifugación breve (centrifuge 5415 C).

La composición final de la reacción es la siguiente:

Tris-HCl 20 mM, pH 8.4

KCl 50 mM

MgCl₂ 2.5 mM

DTT 10 mM

AP 500 Nm

dATP, dCTP, dGTP y dTTP 500 µM de cada uno.

ARN total libre de ADN 2 µg

La mezcla fue equilibrada durante 5 min a 42 °C, y posteriormente se le agregó 1 µl de la enzima retrotranscriptasa SuperScript™ II RT (200 U/µl). La mezcla de reacción fue incubada a 42 °C durante 50 min, seguida de incubación a 70 °C durante 15 min para detener la reacción. El tubo fue colocado en hielo y colectada la mezcla por centrifugación (centrifuge 5415 C). Se agregó un 1 µL de RNase H, se mezcló suavemente (centrifuge 5415 C) e incubó a 37 °C durante 20 min. La incubación se realizó con el termociclador (Techne). Finalmente, la mezcla de reacción se almacena a -20 °C.

V.5.6.2. Amplificación de fragmentos de ADNc.

Los extremos 3' de fragmentos de ADNc, fueron amplificados por Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) y los iniciadores GSP diseñados por nuestro grupo de trabajo.

La mezcla de reacción se realizó con los siguientes componentes:

Componentes	Concentración
Regulador de RCP 10X	1X
MgCl ₂ 50 Mm	2.0 mM
dNTP's 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)	200 µM
Oligonucleótido Iniciador AUAP 10 Mm	0.4 µM
Oligonucleótido Iniciador GSP 10 mM	0.4 µM
Taq DNA polimerasa 5 U/µl.	1.0 U
Agua de RCP	15.3 µLt
ADNc	2.0 µLt

Cabe mencionar que también se amplificó el ADNc del Gen CPIII codificante de la Carboxipeptidasa tipo III de *T. cacao* L. Dicho gen fue usado como control interno de amplificación. Los iniciadores ensayados fueron los siguientes:

CPIII_{sense}: 5'-TCGATACATGCGAAGAAGTTG-3'

CPIII_{antisense}: 5'-CCAAAGCATAATCTGTGTAAGC-3'

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial:	5 min	94 °C	} 35 Ciclos
Desnaturalización:	1 min	94 °C	
Alineamiento:	1 min	53 °C	
Extensión:	1 min	72 °C	
Extensión final:	5 min	72 °C	

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1. Determinación bioquímica de la actividad de tcAPE durante los procesos de germinación y fermentación de la semilla de cacao (*T. cacao* L.).

Los niveles de actividad enzimática específica de tcAPE fueron reportados en U/mg de Proteína total por cada mg de PDA. Dado que la técnica reportada por Hansen *et al.*, (1998) para la determinación de tcAPE, mostró resultados nulos, fue necesario ensayar técnicas reportadas por otros autores (Mercado *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004; Bautista *et al.*, 2005, Mercado *et al.*, 2003; Suárez *et al.*, 1991). Sin embargo, en este trabajo, sólo se reportan los resultados obtenidos con la técnica de mayor sensibilidad para la determinación de la actividad enzimática específica mencionada. Cabe señalar que los ensayos fueron realizados por triplicado.

VI.1.1. Determinación de la actividad de tcAPE durante el proceso de germinación de la semilla de cacao (*T. cacao* L.).

La determinación de la actividad enzimática específica de tcAPE, fue realizada en las semillas germinadas de cacao, provenientes de tres plantas diferentes, mismas que fueron seleccionadas al azar. De acuerdo al análisis de varianza realizado con una $p \geq 0.01$ se encontraron diferencias en los niveles de actividad enzimática específica de tcAPE, durante el proceso de germinación, los resultados indican que existen proteasas con actividad enzimática de tcAPE en las semillas germinadas de *T. cacao* L. durante todo el proceso de germinación. La determinación de la actividad enzimática específica de tcAPE, indicó que el proceso de germinación inició con 4.80 U/mg de Proteína Total en el primer día. Posteriormente, la actividad enzimática específica de tcAPE alcanzó su nivel más alto con 5.59 U/mg de Proteína Total en el día 2. Posteriormente los niveles decrecieron hasta alcanzar su nivel más bajo en el día 11 (2.17 U/mg de Proteína Total). A partir del día 12, la actividad de tcAPE se incrementa nuevamente, alcanzando un nivel de 4.10 U/mg de Proteína Total en el día 14 del proceso de germinación (Cuadro 1 y Figura 5).

Lo anterior, sugiere que la síntesis de esta enzima se eleva durante la fase de crecimiento que corresponde a la última etapa del proceso de germinación de la semilla de cacao criollo del genotipo almendra blanca, cultivada en el Estado de Tabasco. Los

niveles altos en la última etapa del proceso de germinación, pueden ser explicados dado que esta etapa corresponde a la iniciación en la semilla de cambios morfológicos visibles, en concreto con la elongación del eje embrionario y emergencia de la radícula, lo que nos sugiere, que dichas enzimas pudieran estar involucradas en el desarrollo de la planta, y no se descarta la posibilidad de que dichas proteasas sean expresadas en otros órganos de la planta, además de los cotiledones de la semilla de cacao.

Cuadro 1. Actividad enzimática específica de tcAPE en semillas de cacao germinadas proveniente del genotipo de cacao criollo almendra blanca. Reportados en U/mg de Proteína total por mg de PDA.

Tiempo de germinación (Días)	U/mg Proteína total
2	5.59 a
3	5.10 ab
1	4.80 abc
4	4.64 abc
14	4.10 abc
15	4.07 abc
6	3.41 abc
7	3.28 abc
5	3.25 abc
9	2.87 abc
10	2.83 bc
12	2.62 bc
13	2.61 bc
8	2.50 bc
11	2.17 bc

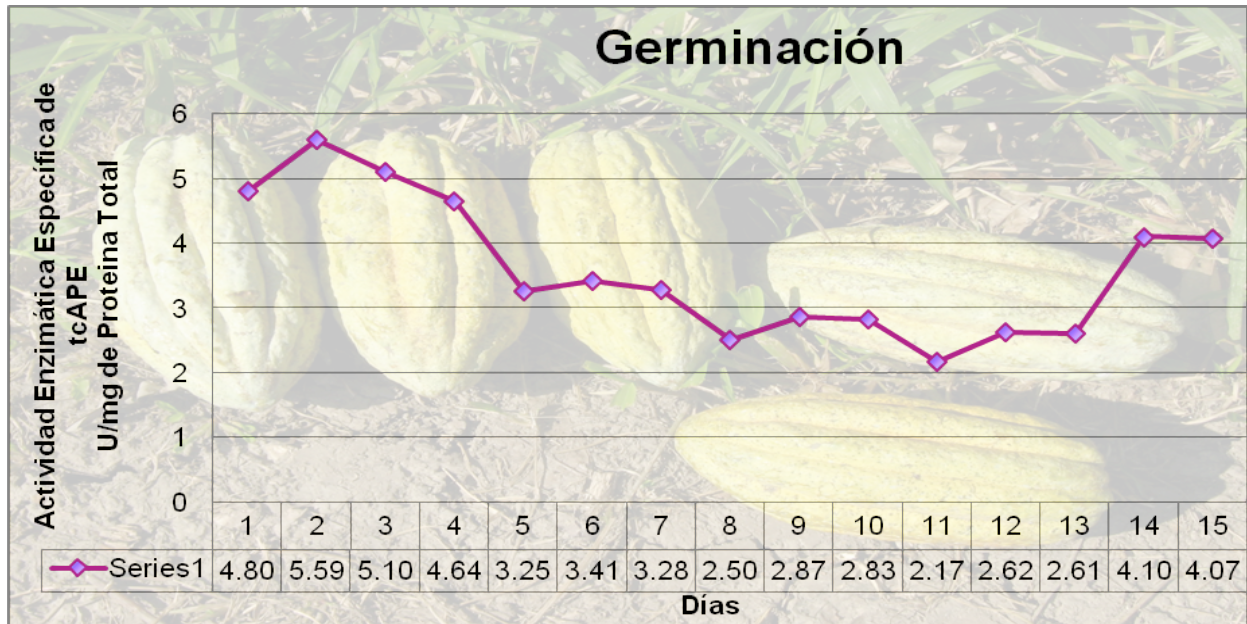


Figura 5. Actividad enzimática específica de tcAPE, fue determinada durante el proceso de germinación de semillas de cacao del genotipo criollo. Los niveles son reportados como actividad enzimática específica en U/mg de Proteína total por mg de PDA.

VI.1.2. Determinación de la actividad de tcAPE durante el proceso de fermentación de la semilla de cacao (*T. cacao* L.).

La determinación de la actividad enzimática específica de tcAPE, fue realizada en las semillas fermentadas de cacao, provenientes de tres plantas diferentes seleccionadas al azar. Los resultados indican que existen proteasas con actividad enzimática de tcAPE en semillas fermentadas de *T. cacao* L., durante todo el proceso de fermentación. La determinación de la actividad enzimática específica de tcAPE indicó, que esta enzima alcanza su nivel más alto durante el primer día del proceso de fermentación, iniciando con 10.28 U/mg de Proteína total que corresponde al 100% de actividad enzimática específica. Posteriormente, los resultados indican que los niveles enzimáticos empiezan a disminuir progresivamente, hasta alcanzar una actividad enzimática específica residual de 2.25 U/mg de Proteína total, correspondiendo al 21.88% de actividad específica residual (Figura 6, Cuadro 2 y 3).

De acuerdo al análisis de varianza realizado con una $p \geq 0.01$ se encontraron diferencias significativas de la actividad enzimática específica de tcAPE, durante el proceso de fermentación.

Uno de los objetivos de este trabajo, fue determinar los niveles de actividad enzimática específica de tcAPE, durante las diferentes etapas de los procesos de germinación y fermentación de la semilla de cacao del genotipo criollo almendra blanca. Este trabajo, ha puesto de manifiesto la participación de proteasas con actividad enzimática de tcAPE no reportadas hasta el momento, durante el proceso de germinación de la semilla de cacao. Como se ha reportado, la medición confiable y la comparación de las actividades enzimáticas en cacao es complicada, lo que obedece a variaciones debidas a diferentes genotipos, orígenes geográficos, métodos de fermentación, diferencias de mazorcas, así como la preparación de las muestras a partir del material rico en polifenoles. Otros problemas, han sido la falta de estudios sistemáticos y las dificultades en la comparación de diferentes variedades de cacao, creciendo bajo diferentes condiciones y fermentados bajo diferentes métodos de fermentación. Por lo tanto, no se ha esclarecido como se regulan los procesos enzimáticos, cuales son los substratos enzimáticos/productos que están relacionados con el buen sabor y cuales son los factores limitantes para el proceso enzimático (actividad enzimática, substrato o

disponibilidad de la enzima, fondo genético del cacao, condiciones de crecimiento o proceso de fermentación) (Hansen *et al.*, 1998).

Para el desarrollo de este trabajo, se tomo como base, la metodología propuesta por Hansen *et al.*, (1998). En este contexto, se procedió a la remoción de los polifenoles, lo cual, es esencial para la cuantificación confiable de las actividades enzimáticas. Todas las actividades enzimáticas fueron analizadas en los cotiledones, empleando el mismo conjunto de muestras de polvos secos de cotiledones, provenientes de las semillas fermentadas de tres plantas del genotipo criollo almendra blanca, cultivado en el Estado de Tabasco.

Ensayos previos, no reportados en este trabajo, corroboraron que la enzima ensayada, pudiera estar localizada en la membrana o pared celular, dado que solo pudo ser detectada agregando Triton X-100 al regulador de trabajo. Por otro lado, las actividades enzimáticas fueron ensayadas a pH 7.0, como es reportado por Hansen *et al.*, (1998), lo cual nos indica que la enzima tcAPE pudiera tener un pH óptimo cercano a la neutralidad. Cabe mencionar, que los extractos enzimáticos para la determinación de las actividades enzimáticas de tcAPE, fueron preparados a 37 °C, dado que los ensayos a 4 °C, proporcionaban niveles despreciables de actividades enzimáticas, por lo que se puede deducir que la temperatura óptima de la enzima pudiera estar alrededor de 37 °C. Por tanto, se puede concluir que las enzimas pudieran ser solubilizadas empleando el regulador con Triton X-100, pH 7.0 a temperatura de 37 °C.

Cuadro 2. Comparación de medias de la actividad enzimática específica de tcAPE en semillas de cacao fermentadas del genotipo cacao criollo almendra blanca.

Tiempo de fermentación en Días	U/mg Proteína total
1	10.28 a
2	5.54 b
3	4.90 b
5	3.31 b
4	2.66 b
6	2.25 b

Cuadro 3. Porcentaje residual de actividad enzimática específica de tcAPE en semillas de cacao fermentadas del genotipo de cacao criollo.

Tiempo de fermentación (Días)	Porcentaje de actividad enzimática específica residual (%)
1	100.00
2	53.89
3	47.67
4	25.95
5	32.22
6	21.88

Como se ha descrito previamente, la alta estabilidad de la enzima aspartil proteasa (tcAP), implica que la proteólisis puede continuar a través del proceso completo de fermentación. En el caso de la actividad enzimática de tcAPE, nuestros resultados confirman lo anterior, debido a que después de 5 y 6 días de fermentación, la actividad enzimática residual corresponde al 32.22 y 21.88 % respectivamente. Estos resultados nos indican que la tcAPE expresada en el proceso de fermentación del genotipo de cacao criollo almendra blanca, es una enzima termoestable. Sin embargo, de manera contraria a nuestros resultados, Hansen *et al.*, (1998), han reportado que esta enzima es muy sensible al proceso de fermentación, debido a que solamente el 5% de la actividad fue retenida después de dos días de fermentación.

Por otro lado, también se ha descrito que la inactivación enzimática durante la fermentación, es causada por el calor y altas concentraciones de ácido acético, etanol y polifenoles generados durante el proceso de fermentación. Se ha explicado que la fermentación y posterior muerte del grano, facilitan a la enzima la accesibilidad del sustrato, pero la inactivación sigue casi inmediatamente debido a las grandes cantidades de polifenoles liberados (Forsyth *et al.*, 1958; Holden, 1959). Sin embargo, nuestros resultados indican que la tcAPE del genotipo de cacao criollo almendra blanca, no sufre una inactivación enzimática, y la disminución gradual de los niveles enzimáticos, pudieran estar en relación con la cantidad de proteína de reserva residual presente en cada momento del proceso de fermentación.

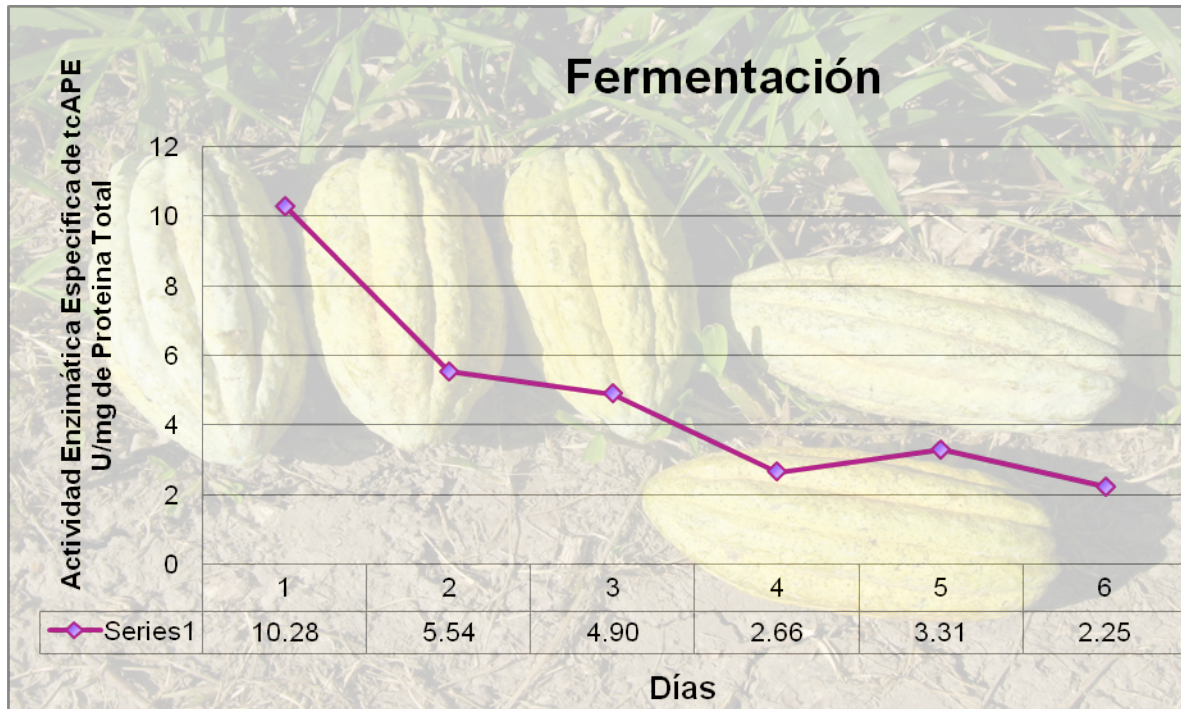


Figura 6. Actividad enzimática específica de tcAPE, durante el proceso de fermentación de semillas de cacao del genotipo criollo almendra blanca. La actividad enzimática fue determinada en semillas de cacao durante el proceso de fermentación. Los niveles son reportados como actividad enzimática específica en U/mg de Proteína total por cada mg de PDA.

VI.2. Amplificación de fragmentos de ADNc de posibles genes codificantes de proteasas con actividad de aminopeptidasa (tcAPE) presentes en la semilla de *T. cacao* L.

VI.2.1. Diseño de iniciadores gen específico (GSP) para la amplificación de ADNc de posibles genes *TcAPE*.


La amplificación de los fragmentos de ADNc de posibles genes codificantes de proteasas con actividad enzimática de aminopeptidasa (tcAPE) de *T. cacao* L. fue realizada empleando el Sistema RACE 3'. El ADN fue amplificado con el oligonucleótido iniciador AUAP (proporcionado por el fabricante) y los Oligonucleótidos Gen Específicos (GSP's), diseñados en este trabajo.

Se encontraron 9360 secuencias nucleotídicas codificantes de genes *APE*, de las cuales 72 pertenecían a plantas. Las secuencias fueron tomadas de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Instituto Nacional de Salud de E. U (National Center for Biotechnology Information; NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Dichas secuencias fueron alineadas y el dendrograma resultante del alineamiento, agrupó a las secuencias en 6 grupos, de acuerdo a su homología. Los dendrogramas fueron visualizados con ayuda del software treeview. Posteriormente, las secuencias fueron alineadas por grupos para diseñar un GSP's por cada grupo específico de secuencias *APE* de plantas (Figura 7, Figura 8, Figura 9, Figura 10, Figura 11 y Figura 12).


Finalmente, se lograron diseñar 6 GSP's denominados: APEPLANS1A SENSE, APEPLANTS1A SENSE (Cuadro 4), APEPLANTS G1B SENSE (Cuadro 5), APEPLANTS2 SENSE (Cuadro 6), APEPLANTS3A SENSE (Cuadro 7), APEPLANTS3B SENSE (Cuadro 8) y APEPLANTS4 SENSE (Cuadro 9), Cabe mencionar que dichos iniciadores incluyeron más de un cambio nucleotídico, para aumentar la posibilidad de amplificar los fragmentos de ADNc.

Cuadro 4. Dendrograma del alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes *APE* descritas de plantas, alineadas para el diseño del oligonucleótido APEPLANTASG1A SENSE.

Dendrograma		Planta	*Codigo de acceso
	NC003070	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NC003070
	DW359562	<i>Prosopis juliflora</i>	DW359562
	CD028075	<i>Pinus taeda</i>	CD028075
	CA820695	<i>Festuca arundinacea</i>	CA820695
	CA906284	<i>Phaseolus coccineus</i>	CA906284
	CV059480	<i>Hordeum vulgare</i>	CV059480
	DN830908	<i>Zea mays</i>	DN830908
	BT005680	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BT005680
	AP008210	<i>Oriza sativa</i>	AP008210
	NC008400	<i>Oriza sativa</i>	NC008400
	AP008213	<i>Oriza sativa</i>	AP008213

* Los codigos de acceso de las secuencias nucleotídicas, fueron obtenidos de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Instituto Nacional de Salud de E. U. (National Center for Biotechnology Information; NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Cuadro 5. Dendrograma del alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes *APE* descritas de plantas, alineadas para el diseño del oligonucleótido APEPLANTASG1B SENSE.

Dendrograma	Planta	*Codigo de acceso	
	CK901665	<i>Capcicum annum</i>	CK901665
	AP008217	<i>Oriza sativa</i>	AP008217
	BF717113	<i>Prunus persica</i>	BF717113
	AJ310676	<i>Lycopersicum esculentum</i>	AJ310676
	CA755384	<i>Oriza sativa</i>	CA755384
	CD777124	<i>Avicennia marina</i>	CD777124
	BV165264	<i>Medicago truncatula</i>	BV165264
	BQ697522	<i>Pinus taeda</i>	BQ697522
	AC140027	<i>Medicago truncatula</i>	AC140027
	NC003076	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NC003076
	AP008207		

	<i>Oriza sativa</i>	AP008207
--	---------------------	----------

* Los codigos de acceso de las secuencias nucleotídicas, fueron obtenidos de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Instituto Nacional de Salud de E. U. (National Center for Biotechnology Information; NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Cuadro 6. Dendrograma del alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes *APE* descritas de plantas alineadas para el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG2 SENSE.

Dendrograma	Planta	*Codigo de acceso
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AY143574
	<i>Oryza sativa</i>	AP008208
	<i>Oryza sativa</i>	AP008214
	<i>Oryza sativa</i>	AP008215
	<i>Euglena Gracilis</i>	DQ384304
	<i>Apium graveolens</i>	BU693680
	<i>Popolus trichocarpa</i>	BH860808
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	CN745933

* Los codigos de acceso de las secuencias nucleotídicas, fueron obtenidos de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Instituto Nacional de Salud de E. U. (National Center for Biotechnology Information; NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Cuadro 7. Dendrograma del alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes *APE* descritas de plantas, alineadas para el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG3A SENSE.

Dendrograma	Planta	*Codigo de acceso
	<i>Lycopersicum esculentum</i>	AF510743
	<i>Pinus pinaster</i>	BX250812
	<i>Oriza sativa</i>	AP008212
	<i>Gossypium barbadense</i>	AY239297
	<i>Hordeum vulgare</i>	AF474373
	<i>Zea mays</i>	DR906997
	<i>Pinus taeda</i>	CD018433
	<i>Betula pendula</i>	Y14777
	<i>Oiza sativa</i>	CA753071
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AB037678
	<i>Solanum tuberosum</i>	X67845
	<i>Solanum tuberosum</i>	X77015

--	--	--

* Los codigos de acceso de las secuencias nucleotídicas, fueron obtenidos de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Instituto Nacional de Salud de E. U. (National Center for Biotechnology Information; NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Cuadro 8. Dendrograma del alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes *APE* descritas de plantas, alineadas para el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG3B SENSE.

Dendrograma	Planta	*Código de acceso
	<i>Phaseolus coccineus</i>	CA906283
	<i>Brassica napus</i>	BG732235
	<i>Ananas comusus</i>	DT339275
	<i>Alstroemeria peruviana</i>	CF802396
	<i>Beta vulgaris</i>	BQ060472
	<i>Capsicum annuum</i>	CK901986
	<i>Medicago truncatula</i>	AC136953
	<i>Medicago truncatula</i>	AC152068

* Los codigos de acceso de las secuencias nucleotídicas, fueron obtenidos de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Instituto Nacional de Salud de E. U. (National Center for Biotechnology Information; NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Cuadro 9. Dendrograma del alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes *APE* descritas de plantas, alineadas para el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG4 SENSE.

Dendrograma	Planta	*Codigo de acceso	
	<i>Elaeis oleifera</i>	AY548529	
	<i>Crocus sativus</i>	BM005667	
	<i>Hordeum vulgare</i>	BM816757	
	<i>Pinus pinaster</i>	BX255516	
	<i>Ananas comusus</i>	DQ288246	
	<i>Oriza sativa</i>	AP008218	
	<i>Allium cepa</i>	BE205591	
	<i>Phaseolus acutifolius</i>	CK901519	
	<i>Beta vulgaris</i>	BI096101	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NC003071	

	<i>Malus domestica</i>	DT002375
	<i>Oriza sativa</i>	AP008209

* Los codigos de acceso de las secuencias nucleotídicas, fueron obtenidos de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Instituto Nacional de Salud de E. U. (National Center for Biotechnology Information; NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

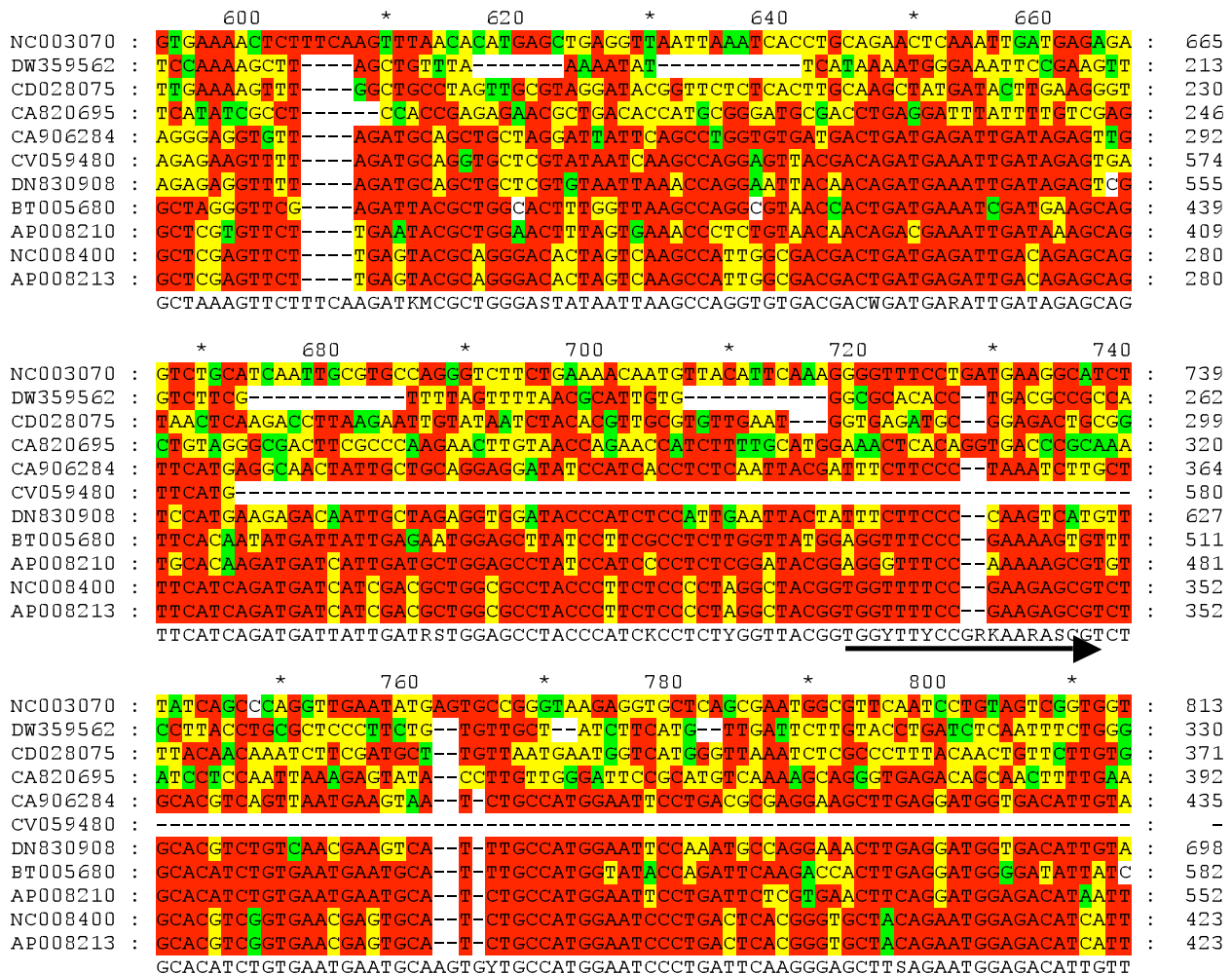


Figura 7. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de genes *APE* descritos en las plantas de *Arabidopsis thaliana* (Número de acceso GenBank: NC003070), *Prosopis juliflora* (Número de acceso GenBank: DW359562), *Pinus taeda* (Número de acceso GenBank: CD028075), *Festuca arundinacea* (Número de acceso GenBank: CA820695), *Phaseolus coccineus* (Número de acceso GenBank: CA906284), *Hordeum vulgare* (Número de acceso GenBank: CV059480), *Zea mays* (Número de acceso

GenBank: DN830908), *Arabidopsis thaliana* (Número de acceso GenBank: BT005680), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBank: AP008210), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBank: NC008400) y *Oryza sativa* (Número de acceso GenBank: AP008213), empleadas en el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG1A SENSE. Blanco, < 60% de identidad; verde, 60% de identidad; amarillo, 80% de identidad; rojo, 100% de identidad.

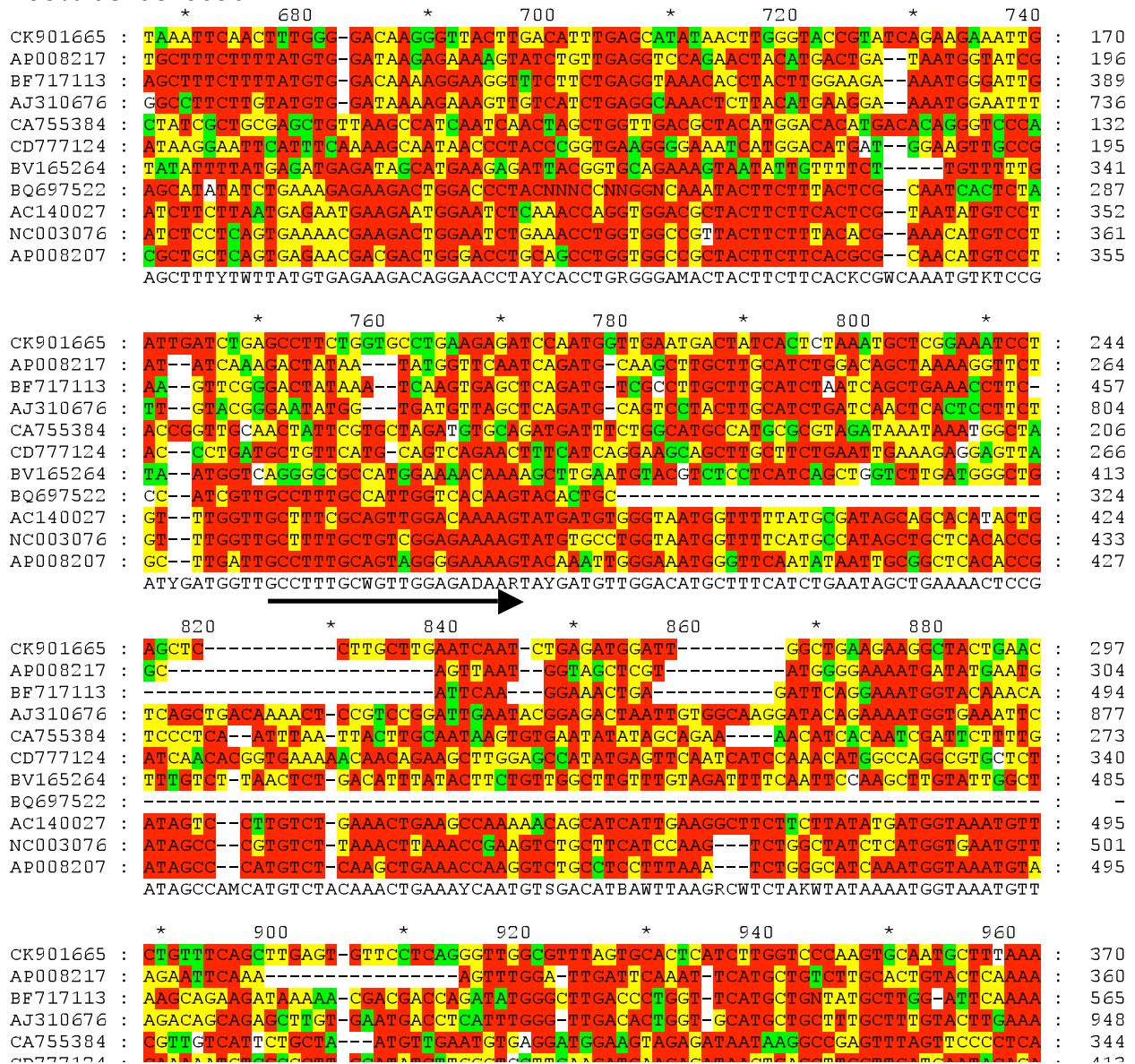


Figura 8. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de genes APE descritos en las plantas de *Capicum annuum* (Número de acceso GenBank: CK901665), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBank: AP008217), *Prunus pérsica* (Número de acceso GenBank: BF717113), *Lycopersicum esculentum* (Número de acceso GenBank: AJ310676), *Oryza sativa* (Número de acceso GenBank: CA755384), *Avicennia marina* (Número de acceso GenBank: CD777124), *Medicago truncatula* (Número de acceso

GenBank: BV165264), *Pinus taeda* (Número de acceso GenBank: BQ697522), *Mendicago truncatula* (Número de acceso GenBank: AC140027), *Arabidopsis thaliana* (Número de acceso GenBank: NC003076) y *Oryza sativa* (Número de acceso GenBank: AP008207), empleadas en el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG1B SENSE. Blanco, < 60% de identidad; verde, 60% de identidad; amarillo, 80% de identidad; rojo, 100% de identidad.

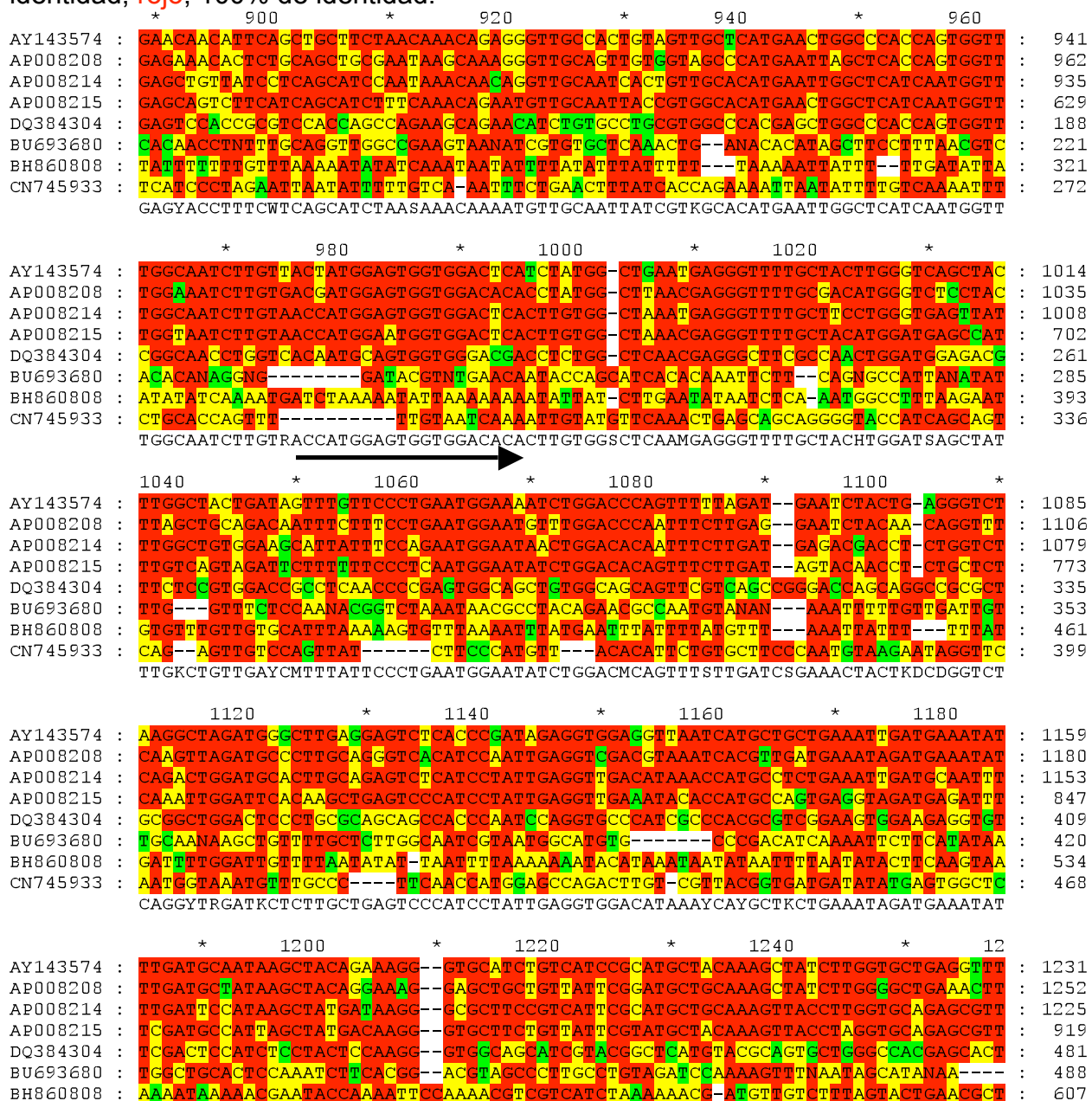


Figura 9. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de genes APE descritos en las plantas de *Arabidopsis thaliana* (Número de acceso GenBank: AY143574), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBank: AP008208), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBank: AP008214), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBank: AP008215), *Euglena Gracilis*

(Número de acceso GenBank: DQ384304, *Apium graveolens* (Número de acceso GenBank: BU693680), *Populus trichocarpa* (Número de acceso GenBank: BH860808) y *Nicotiana benthamiana* (Número de acceso GenBank: CN745933), empleadas en el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG2 SENSE. Blanco, < 60% de identidad; verde, 60% de identidad; amarillo, 80% de identidad; rojo, 100% de identidad.

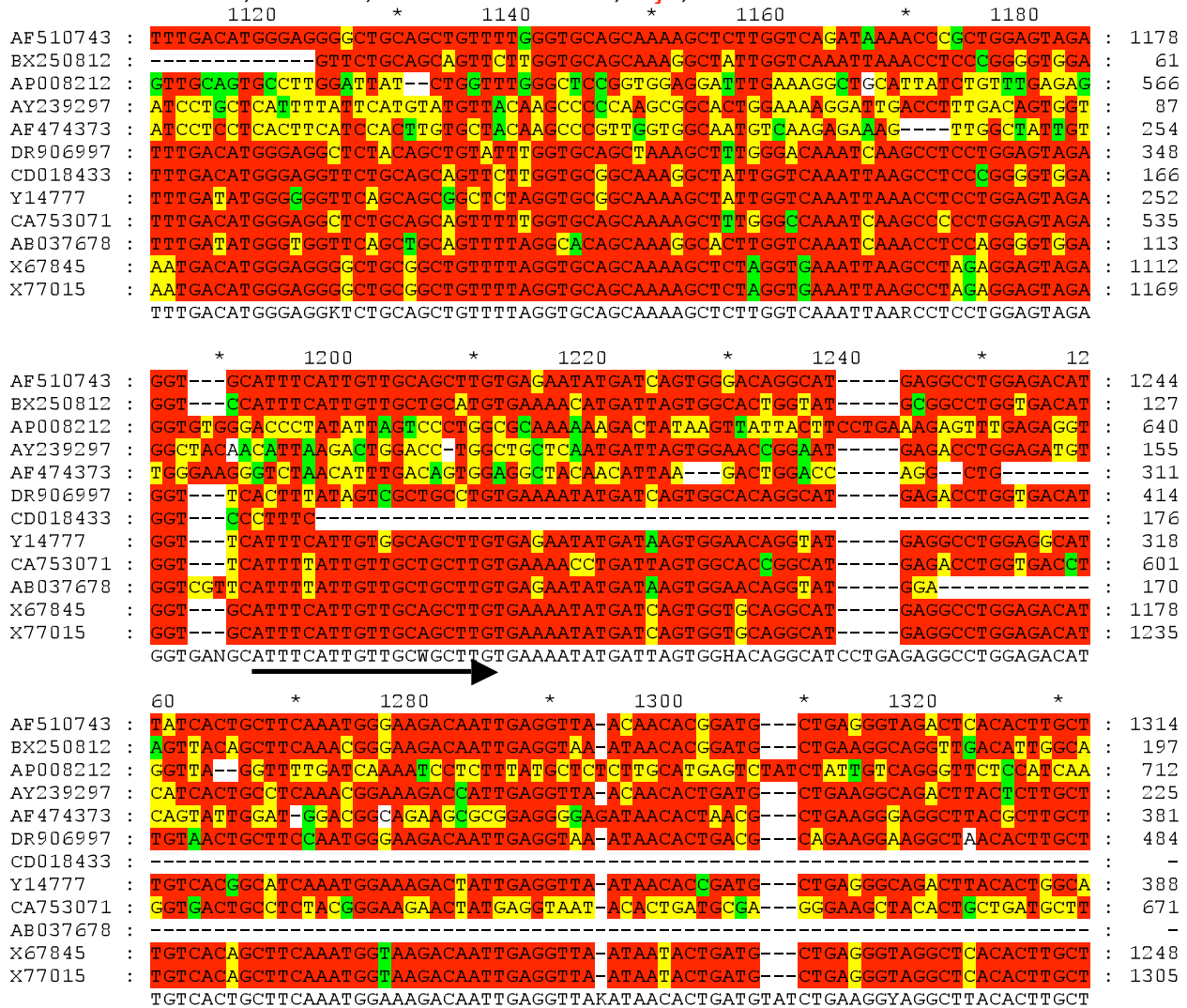


Figura 10. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de genes *APE* descritos en las plantas de *Lycopersicon esculentum* (Número de acceso GenBank: AF510743), *Pinus pinaster* (Número de acceso GenBank: BX250812), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBank: AP008212), *Gossypium barbadense* (Número de acceso GenBank: AY239297), *Hordeum vulgare* (Número de acceso GenBank: AF474373), *Zea mays* (Número de acceso GenBank: DR906997), *Pinus taeda* (Número de acceso GenBank: CD018433), *Betula pendula* (Número de acceso GenBank Y14777), *Oryza sativa* (Número de acceso GenBank: CA753071), *Phaseolus vulgaris* (Número de acceso GenBank: AB037678), *Solanum tuberosum* (Número de acceso GenBank: X67845) y

Solanum tuberosum (Número de acceso GenBank X77015), empleadas en el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG3A SENSE. Blanco, < 60% de identidad; verde, 60% de identidad; amarillo, 80% de identidad; rojo, 100% de identidad.

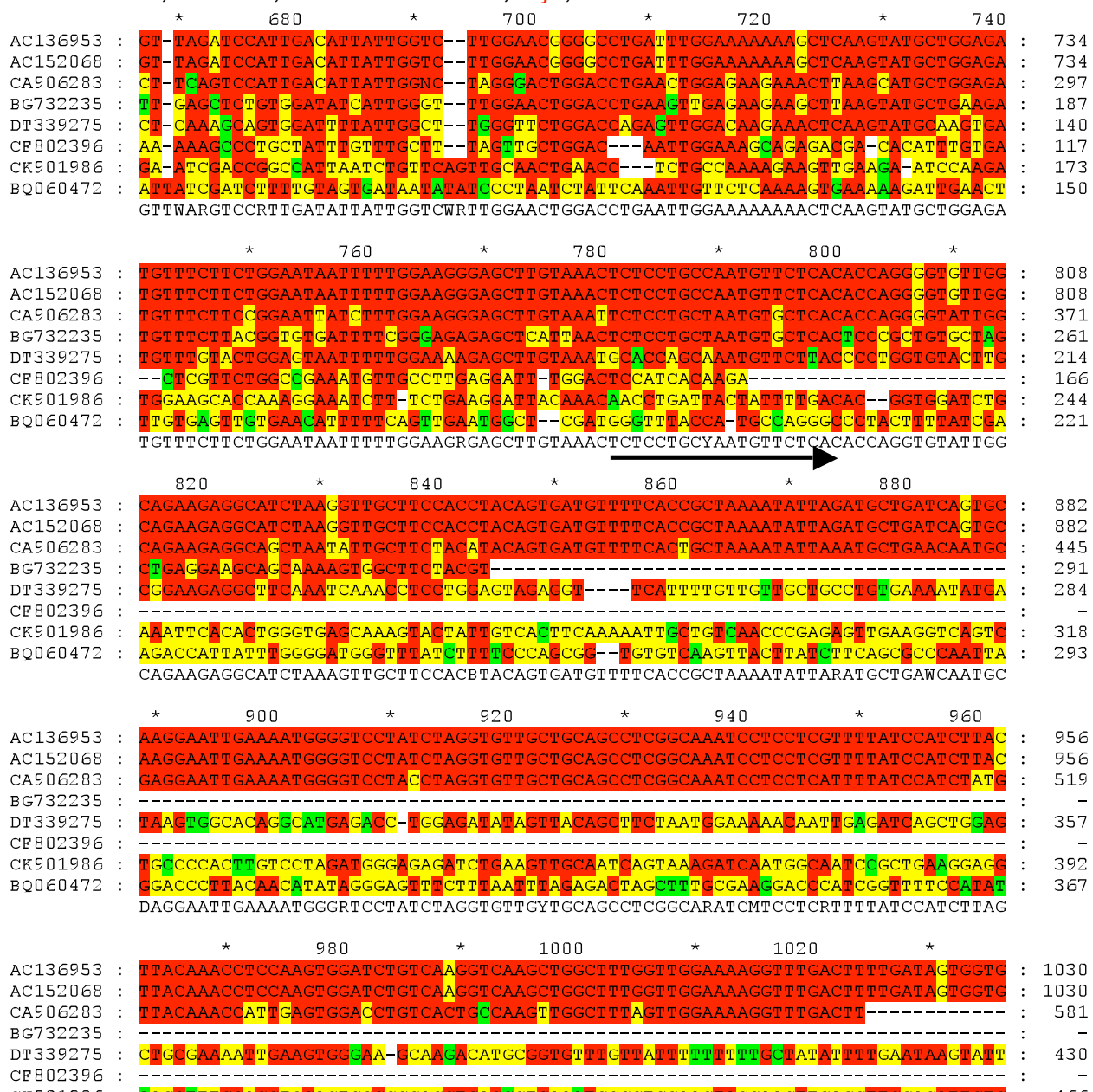


Figura 11. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de genes APE descritos en las plantas de *Medicago truncatula* (Número de acceso GenBank: AC136953), *Medicago truncatula* (Número de acceso GenBank: AC152068), *Phaseolus coccineus* (Número de acceso GenBank: CA906283), *Brassica napus* (Número de acceso GenBank: BG732235), *Ananas comusus* (Número de acceso GenBank: DT339275), *Alstroemeria peruviana* (Número de acceso GenBank: CF802396), *Capsicum annum* (Número de acceso GenBank: CK901986) y *Beta vulgaris* (Número de acceso GenBank:

BQ060472), empleadas en el diseño del oligonucleotido APEPLANTSG3B SENSE. Blanco, < 60% de identidad; verde, 60% de identidad; amarillo, 80% de identidad; rojo, 100% de identidad.

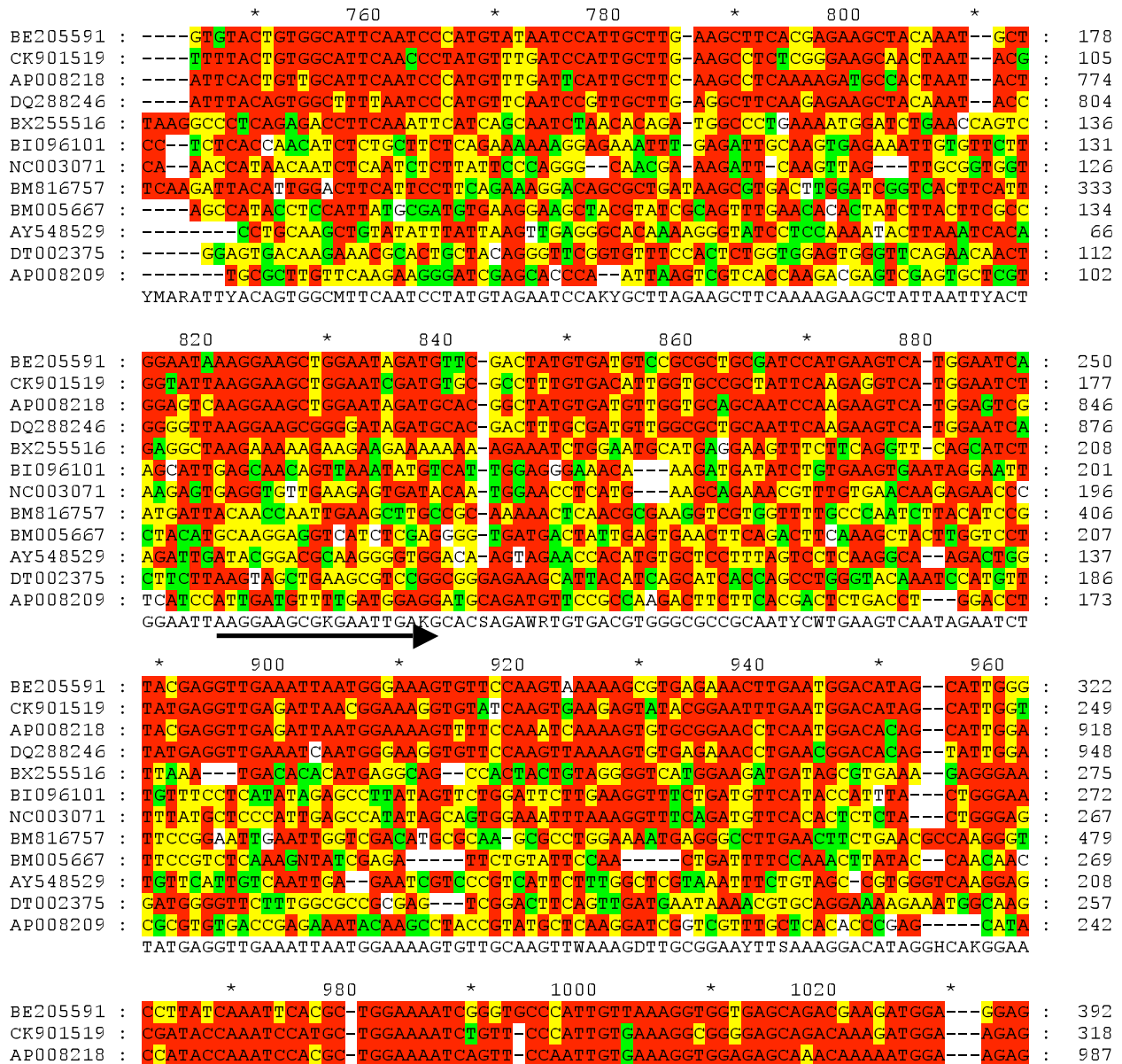


Figura 12. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de genes APE descritos en las plantas de *Allium cepa* (Número de acceso GenBank:BE205591), *Phaseolus acutifolius* (Número de acceso GenBank: CK901519), *Oriza sativa* (Número de acceso GenBank: AP008218), *Ananas comusus* (Número de acceso GenBank: DQ288246), *Pinus pinaster* (Número de acceso GenBank:BX255516), *Beta vulgaris* (Número de acceso GenBank: BI096101), *Arabidopsis thaliana* (Número de acceso GenBank: NC003071), *Hordeum vulgare* (Número de acceso GenBank: BM816757), *Crocus sativus* (Número de acceso GenBank: BM005667), *Elaeis oleífera* (Número de acceso GenBank: AY548529), *Malus domestica* (Número de acceso GenBank: DT002375) y *Oriza sativa*

(Número de acceso GenBank: AP008209), empleadas en el diseño del oligonucleótido APEPLANTSG3B SENSE. Blanco, < 60% de identidad; verde, 60% de identidad; amarillo, 80% de identidad; rojo, 100% de identidad.

Cuadro 10. Oligonucleótidos iniciadores GSP's diseñados para la amplificación de fragmentos de ADNc de posibles genes codificantes de proteasas con actividad de aminopeptidasa (tcAPE) presentes en la semilla de *T. cacao* L.

Gen	Oligonucleótido Iniciador Gen específica (GSP)	Secuencia
APE	APEPLANTSG1A SENSE	5'-ACWGATGARATTGAYARAG-3'*
APE	APEPLANTSG1B SENSE	5'-GCYTTYGCWGTTGGRSAAAAG-3'*
APE	APEPLANTSG2 SENSE	5'-ACYATGGAGTGGTGGACTC-3'*
APE	APEPLANTSG3A SENSE	5'-ATTTYATTGTKGCWGCTTGTG-3'*
APE	APEPLANTSG3B SENSE	5'-TCTCCTGCTAATGTKCTSAC-3'*
APE	APEPLANTSG4 SENSE	5'-AAGGAAGCKGGRATDGATG-3'*

* Las siguientes abreviaturas son empleadas para representar la ambigüedad en el uso de nucleótidos: M = A o C; R = A o G; W = A o T; S = C o G; Y = C o T; K = G o T; V = A, C o G; H = A, C o T; D = A, G o T; B = C, G o T; N = A, C, G o T.

VI.2.2. Extracción del ARN total de *T. cacao* L.

La técnica de extracción de ARN total a partir de muestras de radícula y cotiledón de la semilla de cacao, nos permitió obtener ARN total integro, de buena calidad y cantidad. Lo anterior, fue confirmado por la visualización de los ARN ribosomal 18 y 28S en gel de agarosa al 1% (Figura 13).

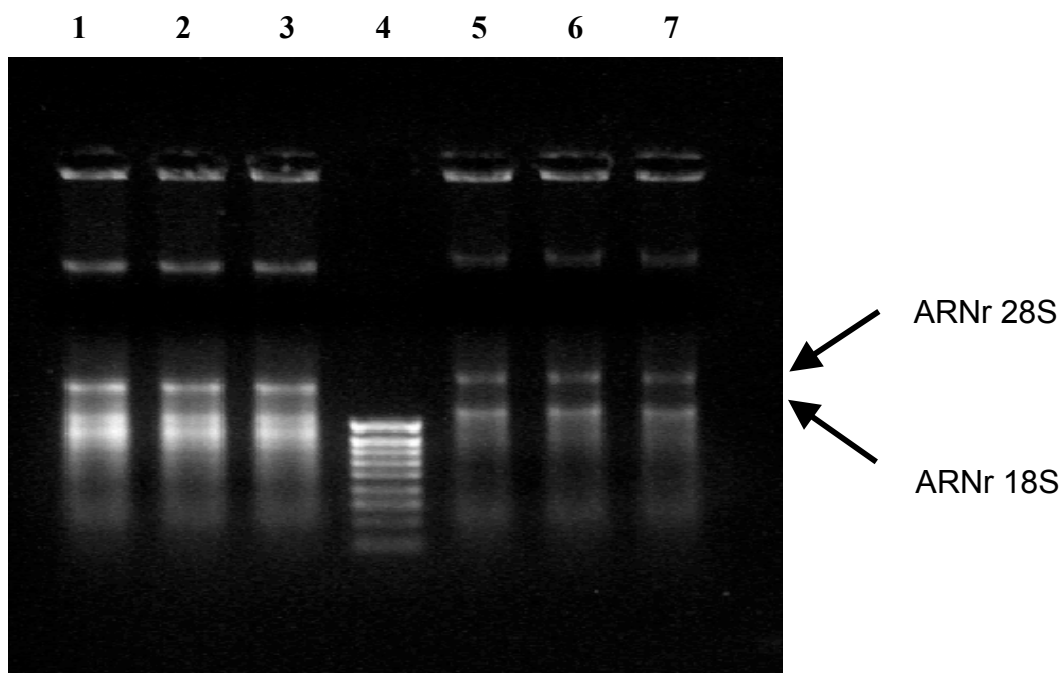


Figura 13. ARN total de muestras de cotiledón y radícula de *T. cacao* L. Carriles 1, 2 y 3) ARN total de cotiledón; carril 4) Marcador de talla molecular de ADN de 100 pb; 5, 6 y 7) ARN total de radícula. Se muestra la integridad de los ARNr 18S y 28S, indicando la calidad del ARN total extraído.

VI.2.3. Amplificación de fragmentos de ADNc de posibles genes *TcAPE* por el método del RACE 3'.

La amplificación de los fragmentos 3' del ADNc de posibles genes codificantes de proteasas con actividad enzimática de *tcAPE*, se realizó por el método de RACE 3'. La primera cadena de ADNc fue sintetizada con el oligonucleótido iniciador AP (proporcionado por el fabricante). Posteriormente, el ADNc de cadena sencilla sintetizado a partir del ARN total de radícula y cotiledón, fue empleado para la amplificación de fragmentos de ARNc de doble cadena del extremos 3' de posibles genes *APE*. El ADNc de doble cadena, fue amplificado por RCP, utilizando diferentes temperaturas de alineamiento (T_a) y los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y cada uno de los GSP's diseñados (APEPLANTSG1A SENSE, APEPLANTSG1B SENSE, APEPLANTSG2 SENSE, APEPLANTSG3A SENSE, APEPLANTSG3B SENSE y APEPLANTSG4 SENSE).

A partir del ARN total de radícula, se logró amplificar un fragmento principal de ADNc de 366 pb aproximadamente, con los oligonucleótidos iniciadores AUAP y APEPLANTSG1B SENSE; tres fragmentos principales de ADNc de 187, 239 y 343 pb aproximadamente, con los oligonucleótidos iniciadores AUAP y APEPLANTSG2 SENSE; un fragmento principal de cDNA de 280 pb aproximadamente, con los oligonucleótidos iniciadores AUAP y APEPLANTSG3A SENSE; un fragmento principal de cDNA de 339 pb aproximadamente, con los oligonucleótidos iniciadores AUAP y APEPLANTSG3B SENSE (Figura 14, Figura 15, Figura 16, Figura 17).

No fue posible amplificar fragmentos de cDNA con el oligonucleótido iniciador AUAP en combinación con cada uno de los oligonucleótidos iniciadores APEPLANTSG1A SENSE y APEPLANTSG4 SENSE (Figura 18 y Figura 19).

Cabe mencionar, que el ADNc del gen CP-III de *T. cacao* L. codificante de una proteasa con actividad enzimática de carboxipeptidasa-III, fue usado como control interno de amplificación, obteniendo un fragmento de 262 pb aproximadamente. La amplificación exitosa del extremo 3'ADNc del gen antes mencionado, nos indica que el ARN total extraído, era de buena calidad y cantidad; así mismos, las condiciones de

reacción y amplificación del ADNc, fueron ideales para la amplificación del ADNc de genes expresados en condiciones de germinación de la semilla de *T. cacao* L. (Figura 20).

Es importante mencionar que la amplificación del ADNc por RCP, fue realizada con la Ta ($T_m = [2(A + T)] + [4(C + G)]$; $T_a = T_m - 5\text{ }^\circ\text{C}$), calculada para cada GSP diseñado; sin embargo, se probaron otras Ta para tratar de obtener fragmentos de amplificación específicos (Cuadro 11).

Cuadro 11. Temperatura de fusión (T_m), temperatura de alineamiento (T_a) y T_a de amplificación del ADNc con cada uno de los GSP's.

Oligonucleótido iniciador GSP	T_m ($^\circ\text{C}$)	$T_a = T_m - 5$ ($^\circ\text{C}$)	T_a de amplificación del ADN ($^\circ\text{C}$)
APEPLANS1A SENSE	52	47	43
APEPLANTG1B SENSE	63	58	59
APEPLANTG2 SENSE	59	54	55
APEPLANTG3A SENSE	55	50	55
APEPLANTG3B SENSE	58	53	47
APEPLANTG4 SENSE	57	52	53

Las condiciones de amplificación del ADNc de posibles genes TcAPE ensayadas, se indican a continuación:

Desnaturalización inicial:	3 min	94 $^\circ\text{C}$	} 35 Ciclos
Desnaturalización:	1 min	94 $^\circ\text{C}$	
Alineamiento:	1 min	Diseñado para cada GSP	
Extensión:	1 min	72 $^\circ\text{C}$	
Extensión final:	5 min	72 $^\circ\text{C}$	

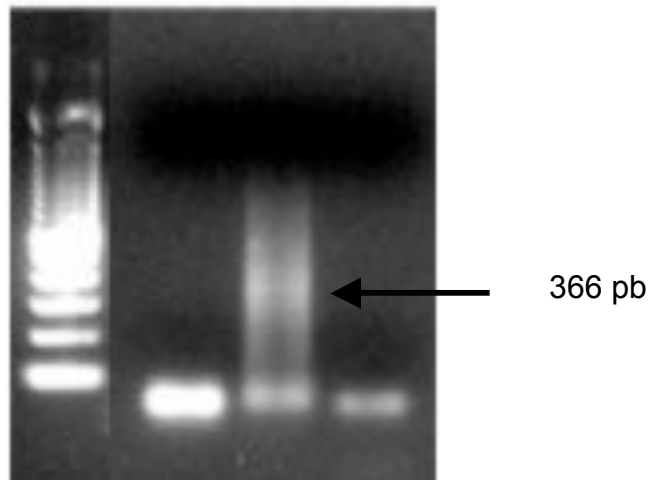


Figura14. Fragmentos de ADNc de posibles genes *TcAPE*, amplificados por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y APEPLANTSG1B SENSE. El par de oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, nos permitió amplificar un fragmento principal de ADNc de 366 pb.

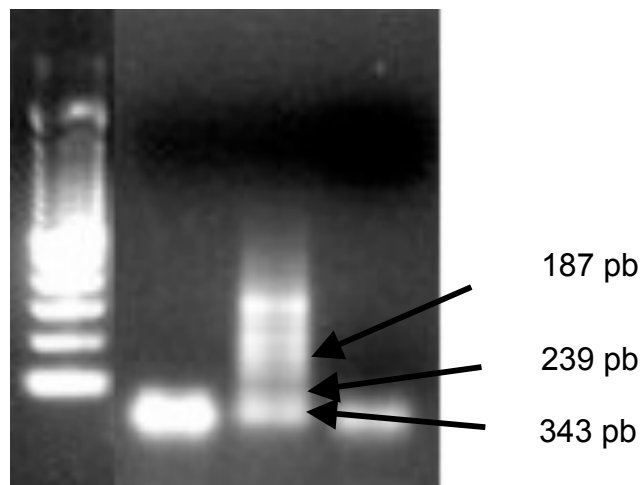


Figura 15. Fragmentos de ADNc de posibles genes *TcAPE*, amplificados por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y APEPLANTSG2 SENSE. El par de oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, nos permitió amplificar tres fragmentos principales de ADNc de 187, 239 y 366 pb.

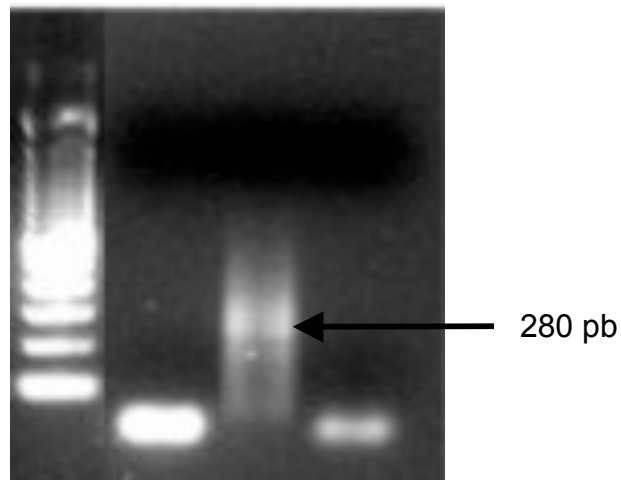


Figura 16. Fragmentos de ADNc de posibles genes *TcAPE*, amplificados por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y APEPLANTSG3A SENSE. El par de oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, nos permitió amplificar un fragmento principal de ADNc de 280 pb.

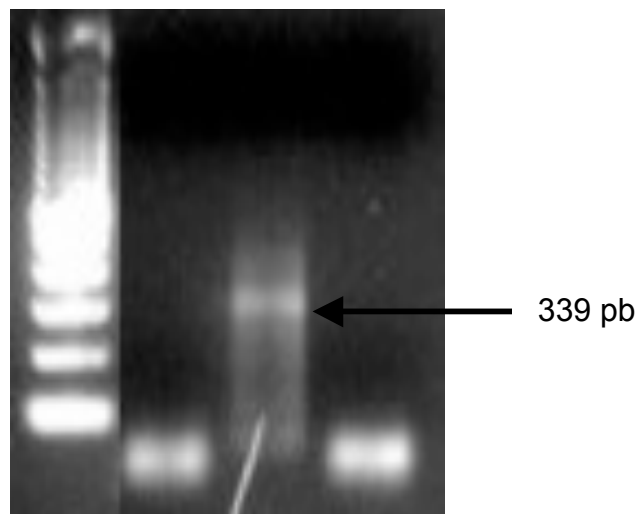


Figura 17. Fragmentos de ADNc de posibles genes *TcAPE*, amplificados por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y APEPLANTSG3B SENSE. El par de

oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, nos permitió amplificar un fragmento principal de ADNc de 339 pb.

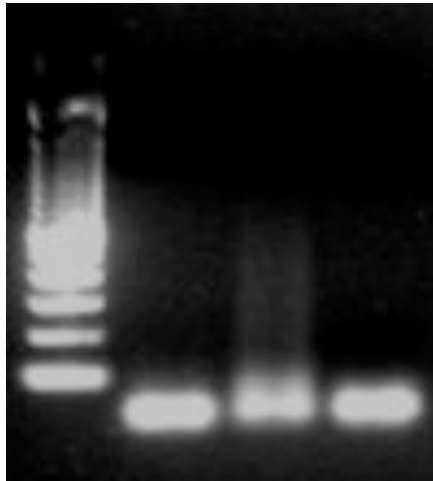


Figura 18. Fragmentos de ADNc de posibles genes *TcAPE*, amplificados por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y APEPLANSG1A SENSE. El par de oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, no nos permitió amplificar fragmentos de ADNc.

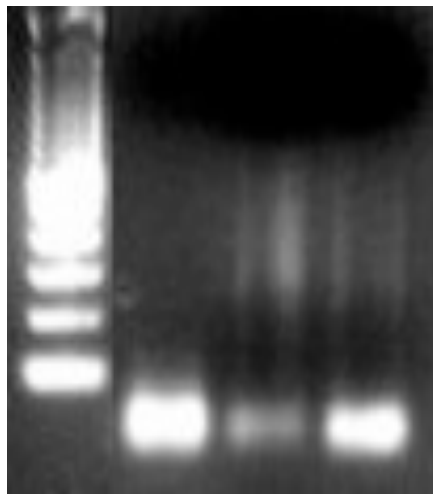


Figura 19. Fragmentos de ADNc de posibles genes *TcAPE*, amplificados por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores AUAP (proporcionado por el fabricante) y APEPLANTSG4 SENSE. El par de

oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, no nos permitió amplificar fragmentos de ADNc.

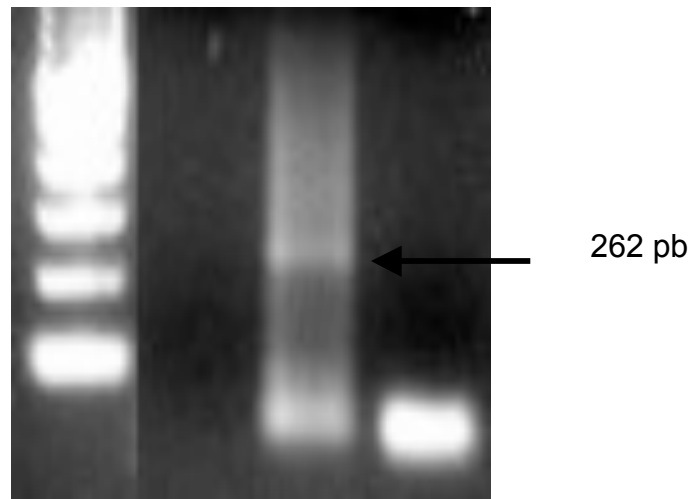


Figura 20. Fragmento de ADNc del gen CP-III de *T. cacao* L. amplificado por la técnica de RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends 3') y los oligonucleótidos iniciadores CPIII_{sense} y CPIII_{antisense}, codificante de una proteasa con actividad enzimática de carboxipeptidasa-III, usado como control interno de amplificación. El par de oligonucleótidos iniciadores antes mencionado, nos permitió amplificar un fragmento principal de ADNc de 262 pb.

En el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, se están realizando estudios moleculares para obtener la secuencia completa de los posibles genes codificantes de proteasas con actividad enzimática de tcAPE de *T. cacao* L. Los resultados bioquímicos obtenidos hasta el momento, indican que *T. cacao* L., contiene genes codificantes de proteasas con dicha actividad.

En el presente trabajo, se diseñaron GSP's que nos permitieron amplificar fragmentos de ADNc de posibles genes *TcAPE* de *T. cacao* L., sin embargo, dado que surgieron problemas técnicos, no fue posible enviar a secuenciar dichos fragmentos para obtener la secuencia completa de ADNc. Por lo anterior, no podemos concluir si dichos fragmentos amplificados, corresponden a posibles genes *TcAPE* de *T. cacao* L.

Por lo tanto, es importante repetir dichos análisis para obtener las secuencias de ADNc y realizar el respectivo análisis bioinformático que nos permitirá saber si dichas secuencias pertenecen a posibles genes *TcAPE*.

El sistema RACE 5' y 3', ha resultado ser una buena estrategia para conocer la secuencia completa de los genes *TcAP1* y *TcAP2* codificantes de proteasas con actividad enzimática de aspartil proteasas en *T. cacao* L. (Laloi *et al.*, 2002), por lo que se continuará trabajando con dicha estrategia para lograr obtener fragmentos de ADNc de posibles genes *TcAPE*.

Las APE son enzimas ampliamente distribuidas en muchos organismos. La presencia de LAP's ha sido descrita en tomate, maíz, cebada, tabaco, *Arabidopsis*, *Brassica*, soya, etc. (Chao *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 2003). En *T. cacao* L., la actividad enzimática mayoritaria detectada en trabajos previos al presente, corresponde a Leucina aminopeptidasa (LAP's), por lo anterior, es probable que las secuencias obtenidas en *T. cacao* L. hasta el momento, correspondan a este mismo tipo de enzimas.

Con respecto a la función de los posibles genes LAP's detectados en *T. cacao* L., por el momento no se puede inferir, debido a que es necesario enviar a secuenciar para realizar el análisis bioinformático respectivo. El análisis bioinformático de una secuencia nucleotídica, se realiza con softwares y bases de datos bioquímicos y moleculares de proteínas y genes muy bien caracterizados, mismos que nos permiten predecir la posible función de la proteína predicha (Bautista *et al.*, 2005).

Con respecto a la función, se ha reportado que las APE's de plantas están involucradas en la movilización de las proteínas de reserva durante la germinación de semillas (Couton *et al.*, 1991; Mikkonen, 1992; Yamahoka *et al.*, 1994), mantenimiento de la vida media de las proteínas (Amrani *et al.*, 1995), respuesta de defensa a infecciones, infestación de insectos y heridas mecánicas (Pautot *et al.*, 1993), maduración de proteínas (Giglione *et al.*, 2000) y transporte de auxinas (Murphy *et al.*, 2000). Dado que en este trabajo, las secuencias de ADNc fueron obtenidas a partir del ARNm de semilla germinadas de *T. cacao* L., es probable que dichas enzimas estén involucradas en la movilización de la proteína de reserva de la semilla.

Con respecto a la localización subcelular de las tcAPE, presentes en *T. cacao* L., como fue reportado por Hansen *et al.*, (1998), nuestros resultados indican que dichas enzimas pudieran estar ancladas a membranas, dado que la actividad enzimática con el substrato H-Leu-pNA, solo puede ser detectada cuando los extractos enzimáticos son tratados con el detergente Tritón X-100.

Los estudios sobre el aislamiento y caracterización de dos formas de Leucina-Aminopeptidasa (LAP's) en tomate, reportan la presencia de dos genes denominados LAP A y LAP N. Los estudios de expresión de ambos genes LAP A y LAP N, indican que LAP N se expresa en todos los órganos vegetativos (hojas, vástagos, raíces y cotiledones) y reproductivos (sépalos, pétalos, estambres y brotes florales) examinados, mientras que la proteína LAP-A muestra un programa de expresión distinto (Tu *et al.*, 2003). En el presente trabajo, se lograron amplificar fragmentos de ADNc con oligonucleótidos iniciadores diferentes, por lo que dicho resultado nos indica que al igual que tomate, cacao pudiera contener una batería de multigenes APE, expresados de manera diferencial durante el desarrollo de la planta, así como durante el proceso de germinación de la semilla.

VII. CONCLUSIONES

1. La actividad enzimática de tcAPE está presente durante el proceso de germinación de la semilla de *T. cacao* L., sin embargo, la síntesis de esta enzima se eleva durante la fase de crecimiento que corresponde a la última etapa del proceso de germinación de la semilla de cacao criollo del genotipo almendra blanca.
2. La actividad de tcAPE está presente durante el proceso de fermentación de la semilla de *T. cacao* L., observándose una disminución progresiva a partir del día 2 hasta el día 6, con una actividad residual del 21.88%.
3. La enzima tcAPE ensayada, pudiera estar localizada en la membrana o pared celular, dado que la actividad enzimática, solo pudo ser detectada agregando Triton X-100 al regulador de trabajo.
4. El oligonucleótido iniciador GSP1, diseñado a partir de alineamientos múltiples de genes APE de plantas descritos en la base de datos del NCBI y el Sistema RACE 3', permitió la amplificación de fragmentos de ADNc de posibles genes *TcAPE* de *T. cacao* L. cuya homología deberá ser comprobada por medio de un análisis bioinformático.

VIII. PERSPECTIVAS

1. Diseñar otros oligonucleótidos iniciadores antisentido para amplificar fragmentos de ADNc del extremos 5' de posibles genes codificantes de proteasas con actividad de tcAPE.
2. Realizar estudios de expresión "*in vitro*" por RT-PCR y/o análisis Northern de los genes que codifican proteasas con actividad de tcAPE.
3. Determinar el número de genes que codifican para cada una de las proteasas detectadas, mediante el análisis Southern.

IX. LITERATURA CITADA

Adams, S.M. and Blakesly, R. (1991) *Focus*^R 13, 56.

Amrani, A., Suire, C., Cámara, B., Caudillére, J.P., and Couee, I., (1995) Purification and Characterization of a novel aminopeptidase, Plastidial alanine aminopeptidase, from the cotyledons of etiolated sugar beet seedlings. *Plant Physiol.*, 109, 87- 94.

Bartling, D., and Nosek, J. (1994). Molecular and Immunological characterization of Leucine aminopeptidase in *Arabidopsis thaliana*: a new antibody suggests a semi-constitutive regulation of phylogenetically old enzyme. *Plant Sci.* 99, 199-209.

Bautista-Muñoz C, Hernández-Rodríguez C, 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.

Bennett, A. B. 2003. Out of the Amazon: *Theobroma cacao* enters the genomic era. *TRENDS Plant Sci.* 8: 561-563.

Berthold, M.W. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17,453.

Biehl, B., D. Passern, W. Sagemann. (1982a). Effect of acetic acid on subcellular structures of cocoa bean cotyledons. *J. Sci. Food Agric.* 33:1101-1109.

Biehl, B., H. Heinrichs, H. Ziegeler-berghausen, S. Srivastava, Q. Xiong, D. Passern, V.I. Senyuk y M. Hammor. 1993. The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. *Angew. Bot.* 67:59-65.

Biehl, B., Wewetzer, C., Passern, D. (1982b). Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 33:1291-1304.

Biehl, B., E. Brunner, D. Passern, V. C. Quesnel, y D. Adomako. (1985). Acidification, proteolysis and flavour potential in fermentating cocoa beans. *J. Sci. Food Agric.* 36:583-598.

Briggs, D. E. (1992). Barley germination: Biochemical changes and hormonal control. In: Shewry, P. R. (Ed). *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology.* CAB International, Wallingford.

Brow, M.A.D. (1990) *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications* (inns, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and white, T.J. Eds) p. 189, Academic press, San Diego.

Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A., and Prat, S. (2004). Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes & Dev.* 18, 1577-1591.

Buckler, A.J., Chang, D.D., Graw, S.L., Brook, D., Haber, D.A., Sharp, P.A., and Housman, D.E. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88, 4005.

Couton, J. M., Sarath, G., and Wagner, F. W., (1991). Purification and Characterization of a soybean cotyledon aminopeptidase. *Plant Sci.*, 75, 9-17.

Cuatrecasas, J. (1964). Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contrib US Herbarium*. 35:379-614.

Chao, W.S., Gu, Y.Q., Pautot, V., Bray, E.A., and Walling, L.L. (1999). Leucine aminopeptidases RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, abscisic acid, *Plant Physiol.* 120, 979-992.

Chao, W.S., Pautot, V., Holzer, F.M., and Walling, L.L. (2000). Leucine aminopeptidases: the ubiquity of LAP-N and the specificity of LAP-A. *Planta* 210, 563-573.

Chen, H., Wilkerson, C.G, Kuchar, J.A., Phinney, B.S., and Howe, G.A. (2005). Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 19237-19242.

Da Silva Gesteira A., Michelli F., Fortes Ferreira C. and de Mattos Cascardo J. C. (2003). Isolation and purification total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicioso*. *BioTechniques* 35: 494-500.

Dixon, M., and E. C. Webb. (1979). *Enzymes* 3ed. Longman Group Limited, Ed. Academic Press Inc. New York: 226-260.

El Amrani, A., Suire, C., Cámara, B., Caudillère, J.P., and Couee, I. (1995). Purification and Characterization of a novel aminopeptidase, Plastidial alanine aminopeptidase, from the cotyledons of etiolated sugar beet seedlings. *Plant Physiol.*, 109, 87-94

Engels, M., M. Bartley, D., G. A. Enríquez (1980). Cacao descriptors their status and modus operandi. 209 -218.

Frohman, M.A., Dush, M.K., and Martin, G.R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8998.

Frohman, M.A., and Martin. G.R. (1989) *Techniques* 1, 165.

Frohman, M.A., (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky., J.J., and White, T.J., eds.) p.28, Academic Press, San Diego.

Frohman, M.A., (1993) Rapid Amplification of complementary DNA Ends for generation of Full-Length Complementary DNAs: Thermal RACE. *Methods in Enzymology* 218:340-356.

Giglione, C., Serero, A., Pierre, M., Boisson, B., and Meinzel, T., (2000) Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of N-Terminal protein processing mechanisms. *EMBO J.*, 19, 5916-5929.

Gu, Y.Q., Holzer F.M., and Walling, L.L. (1999). Overexpression, Purification and biochemical characterization of the wound-induced Leucine aminopeptidase of tomato. *Eur. J. Biochem.* 263, 726-735.

Hansen, C. E., A. Mañez, C. Burri y A. Bousbaine. 2000. Comparison of enzyme activities involved in flavour precursor formation in unfermented beans of different cocoa genotypes. *J. Sci. Food Agric.* 80:1193-1198

Hansen, C. E., M. del Olmo y C. Burri. (1998). Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 77:273-281.

Hardy, F. (1960). *Cacao mundial*. Inter-American Institute of Agricultural Sciences. Turrialba, Costa Rica. pp. 299-352.

Hardy, F. 1969. *Manual del cacao*. IICA (Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas). Turrialba, CR. 362 p.

Harvey, R.J., and Darlison, M.G. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19, 4002.

Higgins, J. V. (1984). Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:191-221.

Kirchoff, P. M., B. Biehl, G. Crone. (1989). Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. *Food Chem.* 31: 295-311.

Laloi, M., J. McCarthy, O. Morandi, C. Gysler y P. Bucheli. (2002). Molecular and biochemical characterization of two aspartic proteinases TcAP1 y TcAP2 from *Theobroma cacao* seeds. *Planta.* 215:754-762.

Loh, Y., Elliott, J.F., Cwirla, S., Lanier, L.L., and Davis, M.M. (1989) *Science* 243, 217.

Loh, E. (1991) *Methods* 2, 11.

López, B. O. y Ramírez, E. O. (1987). Contenido de grasa en semillas de clones de cacao *Theobroma cacao* L., seleccionadas en la costa de Chiapas. *In: Agricultura Técnica en México.* 13:117-121. *In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry* 5. Trees II. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York Tokio. pp. 203-221.

López-Andrade, P. A., V. H. Delgado-Nuñez, y A. Azpeitia-Morales. (1996). El cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tabasco. INIFAP-Huimanguillo, México.

López-Andrade, P. A., V. H. Delgado-Nuñez, A. Azpeitia-Morales, J. I. López-Arroyo, J. A. Jiménez Chong, A. Flores Rodríguez, L. Fraire-Sierra y R. Castañeda-Ceja. (2003). El cacao en Tabasco: Manejo y producción. ISPROTAB, Tabasco.

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

Matarasso, N., Schuster, S., and Avni, A. (2005). A novel Plant cysteine protease has a dual function as a regulator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression. *Plant Cell* 17, 1205-1216.

Matsui, M., Jonathan H. Fowler and Walling, L. (2006). Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol. Chem.*, 387, pp. 1535-1544.

Mercado-Flores, Y., C. Hernández-Rodríguez, Ruíz-Herrera, J. y L. Villa-Tanaca. 2003. Proteinases and exopeptidases from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mycología*. 95:327-339.

Mercado-Flores, Y., Y. Noriega-Reyes, B. Ramírez-Zavala, C. Hernández-Rodríguez y L. Villa-Tanaca. 2004. Purification and characterization of aminopeptidase (pumAPE) from *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 234:247-253.

Mikkonen, A., (1992) Purification y Characterization de Leucine aminopeptidase from Kidney bean cotyledons. *Physiol. Plant.*, 84, 393-398.

Miranda, F. (1962). Wild cacao in the Lacandona Forest, Chiapas, México. *Cacao* (Turrialba), 7:7. CATIE: Costa Rica.

Mora, U. (1959). Origen y variabilidad del cacao cultivado en América Tropical. *Turrialba*. 8 (1).

Moore, B. (2004). Bifunctional and moonlighting Enzymes: lighting the way to regulatory control. *Trends plant Sci.* 9, 221-228.

Murphy, A., Peer, W, A., and Taiz, L., (2000) Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta*, 211, 315-324.

Nicholas, K. B. y Nicholas H. B. Jr. (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.

Niepage, N. (1961). Versuche zur Fraktionierung und Bausteinanalyse der Proteine in unfermentierten und fermentierten kakaobohnen. *Gordian*. 1445:13-20.

Ohara, O., Dorit, R.T., and Gilbert, W (1989) *Proc. Natl Acad. Sci, Usa* 86, 5673.

Osborne, T. B. (1924). The vegetable proteins, 2nd edn. Longmans, Green & Co., London.

Pautot, V., Holzer, F. M., Reisch, B., and Walling, L. L., (1993) Leucine aminopeptidase: An inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 9906-9910.

Pechan, T., Cohen, A., Williams, W.P., and Luthe, D.S. (2002). Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillar. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 13319-13323.

Pence, V. C. (1989). Cacao (*Theobroma cacao* L.).

Pérez-García, F y J. B. Martínez-Laborde (1994). Germinación de semillas. En: Introducción a la fisiología vegetal. Eds. Mundi-Prensa. España, pp. 153-170.

Ramírez-Zavala, R., Y. Mercado-Flores, C. Hernández-Rodríguez, L. Villa-Tanaca. 2004. Purification and characterization of a serine carboxypeptidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Int. J. Food Microbiol.* 91:245-252.

Rohan T. A. (1964). The precursors of chocolate aroma: a comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. *J. Food Sci.* 29:456-459.

Ruiz-Rivero, O.J. and Prat, S. (1998). A -308 deletion of the tomato *LAP* promoters is able to direct flower-specific and MeJA-Induced expression in transgenic plants. *Plant Mol. Boil.* 36, 639-648.

Ryan, C.A. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 112-121.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.t., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985) *Science* 230, 1350.

Saiki, R. K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988) *Science* 239, 487.

Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Nueva York.

SAS, SAS. 2003. User's Guide, version 9.1.3. SAS Institute Inc. Cary, N.C. USA.

Shotwell, M. A. y B. A., Larkins, (1988). The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. In *The Biochemistry of Plants. A. Comprehensive Treatise*, Vol. 15, ed. A. Marcus. Academic. Press, New York, pp. 297-345.

- Spencer, M. E. y R. Hodge. (1991). Cloning and sequencing of the cDNA encoding the major albumin of *Theobroma cacao*. *Planta*. 183:528-535.
- Spencer, M. E. y R. Hodge. (1992). Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage protein of *Theobroma cacao*. Identification of the proteins as members of the vicilin class of storage proteins. *Planta*. 186:567-576.
- 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 eucaryotic cell. *FEMS. Microbiol. Rev.* 54:17-46.
- Suárez-Rendueles, P., L. Villa, M. J. Arbesu y B. Escudero. 1991. The proteolytic system of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* 81: 215-220.
- Swarbrick J.T., Toxopeus H. and Hislop E. C. (1964). Estate cacao in Fernando Po. *World Crops*. 1964; 35-40 Coffee and cacao. *J.* (1965): 151-164-167.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876-4882.
- Toxopeus, H. (1969). Cacao. *In: Fewerda, F. P. y Wit, F. (Eds.)*. Outlines of perennial crop breeding in the tropics. Veenman, H. y Zonen, N., Wageningen, V. The Netherlands.
- Toxopeus, H. (1987). Genotecnia de cultivos tropicales perennes. Primera edición en español. AGT Editor, S. A. pp. 53-83.
- Trease, G. E. y Evans, W. Ch. (1976). Drogas de origen botánico. *In: Trease, G. E. y Evans, W. Ch. (eds)*. Farcognosia. CECSA. pp. 369-703.
- Tu, C.-J., Park, S.-Y., and Walling, L.L. (2003). Isolation and Characterization of the neutral Leucine aminopeptidase (LapN) of tomato. *Plant Physiol.* 132, 243-255.
- Urquhart, D. H. (1961). Cocoa. Formerly director of agricultura in Ghana. Ed. Longmans. Great Britain. pp. 7-17.
- Voigh, J. y B. Biehl. (1993). The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. *Food Chem.* 47:145-151.
- Voigt, J., B. Biehl, H. Heinrichs, S. G. Marsoner y A. Hugi. (1994a). In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chem.* 49:173-180.

Voigt, G., B. Biehl, H. Heinrichs y J. Voigt .1997. Aspartic proteinase levels in seeds of different angiosperms. *Phytochemistry* 44:389-392.

Voigt, J., H. Heinrichs, G. Voigt. Y B. Biehl. (1994b). Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. *Food Chem.* 50:177-184.

Voigt, J.y B. Biehl. (1995). Precursors of the cocoa-specific aroma components are derived from the vicilin-class (7S) globulin of the cocoa seeds by proteolytic processing. *Bot. Acta* 108:283-289.

Walling, L.L. (2004). Leucyl aminopeptidase (plant). In: *Hand-book of Proteolytic Enzymes*, 2nd Edition, A.J. Barrett, N.D. Rawlings, and J.F. Woessner, eds. (San Diego, USA: Elsevier Academic Press), pp. 901-904.

Walling, L.L. (2006). Regulation The role amino-terminal modifying enzymes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 227-233.

Wood, G. A. R. (1975). *Cocoa*. Third edition previous by D. H. Urquhart. Printed in Great Britain. Pp. 7-69.

Yamahoka, Y., Takeuchi, M., and Morohashi, Y., (1994) Purification and partial Characterization of an aminopeptidase from mung bean cotyledons. *Physiol. Plant.*, 90, 729-733.

Yamauchi, Y., Ejiri, Y., Sugimoto, T., Sueyoshi, K., Oji, Y., and Tanaca, K., (2001). A high molecular weight glutamyl endopeptidase and its endogenous inhibitors from cucumber leaves. *J. Biochem.*, 130, 257-261.

Yang, L.T., Mickelson, S., See, D., Blade, T.K., and Fischer, A.M. (2004). Genetic analysis of the function of major leaf proteases in barley (*Hordeum vulgare* L.) nitrogen remobilization. *J. Exp. Bot.* 55, 2607-2616.

Zak, D. F. y P. G. Keeny. (1976a). Extraction and fractionation of cocoa proteins as applied of several varieties of cocoa beans. *J. Agric. Food Chem.* 24:479-482.

Zak, D. F. y P. G. Keeny. (1976b). Changes in cocoa proteins during ripening of fruit, fermentation, and further processing of cocoa beans. *J. Agric. Food Chem.* 24: 483-486.