



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE ENDO-
1,3(4)- β -GLUCANASA Y AMPLIFICACIÓN DE GENES ENDO-1,3(4)- β -GLUCANASA
A PARTIR DE *Moniliophthora roreri***

HÉCTOR SÁNCHEZ SÁNCHEZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

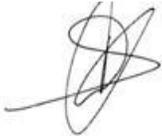
H.CÁRDENAS, TAB. MÉXICO

2011

La presente tesis, titulada: Determinación de la actividad enzimática extracelular endo-1,3 (4)- β -glucanasa y amplificación de genes endo-1,3 (4)- β -glucanasa a partir de *Moniliophthora roreri*, realizada por el alumno: Héctor Sánchez Sánchez, 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	 DR. JESÚS ALBERTO RAMOS JÚAREZ
ASESOR	 DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

H. Cárdenas, Tabasco, 30 de septiembre de 2011

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE ENDO-1,3(4)- β -GLUCANASA Y AMPLIFICACIÓN DE GENES ENDO-1,3(4)- β -GLUCANASA A PARTIR DE *Moniliophthora roreri*

Héctor Sánchez Sánchez, MC.

Colegio de postgraduados, 2011

Se estudio la cinética de fermentación del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* en un sistema de fermentación en estado solido (FES) utilizando bagazo de caña de azúcar (BCA) como sustrato inductor. Los tratamientos (T) evaluados fueron: T1 bagazo de caña con inóculo de *M. roreri*; T2: Bagazo de caña sin inóculo. Se evaluó la actividad enzimática endo 1, 3(4)- β -glucanasa, pH y biomasa durante un período de 30 días. El hongo fitopatógeno *M. roreri* se identificó mediante la prueba de PCR y secuenciación del gen 18S ADNr, así como la región ITS1-5.8S-ITS2. Se diseñaron oligonucleótidos iniciadores para amplificar el gen codificante de la enzima, endo 1, 3(4)- β -glucanasa, a partir de secuencias de genes codificantes de esta enzima reportadas en otros hongos fitopatógenos. La actividad enzimática endo 1, 3(4)- β -glucanasa más alta se encontró el día 28 con 258.57 mU/mg de proteína total y con un pH de 7.22, lo que demostró ser el pH óptimo. Se obtuvo un fragmento de 1768 (pb) de la amplificación de la secuencia del gen 18S ADNr y se registró con el número de acceso JF730693 en GenBank (NCBI, E.U.A.). El fragmento amplificado presentó 99% de identidad máxima con respecto a la secuencia AY916745 depositada en GenBank correspondiente a *M. roreri*. La amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 generó un fragmento de 758 pb y se registró con el número de acceso JF769489 en el GenBank, presentando 100% de identidad máxima con respecto a la secuencia GU457437 depositada en el GenBank. Se obtuvo un fragmento de 747 pb del gen (*MrGLU1*) que codifica la enzima endo 1, 3(4)- β -glucanasa y se registró con el número de acceso JN029800 en el GenBank. Dicho fragmento fue traducido a la secuencia de proteína, obteniéndose un fragmento de proteína (mrGLU1) de 249 aminoácidos, que presentó una identidad máxima de 87% con respecto a la secuencia de aminoácidos con número de acceso XP002389355 de endo-1,3(4)- β -glucanasa putativa de *M. pernicioso*, depositada en el GenBank.

Palabras clave: *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora pernicioso*, endo-1,3(4)- β -glucanasa.

DETERMINATION EXTRACELLULAR ACTIVITY ENZYMATIC OF ENDO-1, 3(4)- β -GLUCANASE AND GENE AMPLIFICATION ENDO-1, 3(4)- β -GLUCANASE FROM *Moniliophthora roreri*

Héctor Sánchez Sánchez, MC.

Colegio de postgraduados, 2011

Was study the fermentation kinetics of the phytopathogenic fungus *Moniliophthora roreri* in a solid state fermentation (SSF) using sugarcane bagasse (BCA) as a substrate inducer. Treatments (T) were evaluated: T1 bagasse inoculums of *M. roreri*; T2: uninoculated cane bagasse. Enzymatic activity was evaluated endo 1, 3 (4)- β -glucanase, pH and biomass over a period of 30 days. The phytopathogenic fungus *M. roreri* test was identified by PCR and 18S rDNA gene sequencing and the ITS1-5.8S region, ITS2. Oligonucleotide primers were designed to amplify the gene encoding the enzyme, endo 1, 3 (4)- β -glucanase, from sequences of genes encoding this enzyme reported in other fungal pathogens. The enzyme activity endo 1, 3 (4)- β -glucanase was found highest with 258.57 on 28 mU / mg of total protein and a pH of 7.22, which proved to be the optimum pH. We obtained a fragment of 1768 base pairs (bp) amplification of the sequence of 18S rDNA gene and registered with the access number JF730693 in GenBank (NCBI, USA). The amplified fragment showed 99% identity with maximum respect to the sequence deposited in GenBank AY916745 for *M. roreri*. Amplification of the ITS1-5.8S region, ITS2 generated a fragment of 758 bp and was registered under the accession number in GenBank JF769489, presenting maximum 100% identity with respect to the sequence deposited in GenBank GU457437.

On the other hand obtained a fragment of 747 bp of the gene (MrGLU1) encoding the enzyme endo 1, 3 (4)- β -glucanase and registered under the accession number in GenBank JN029800. This fragment was translated into protein, obtaining a protein fragment (mrGLU1) of 249 aminoacids, which presented a maximum of 87% identity with respect to the amino acid sequence with access number XP002389355 endo-1, 3(4)- β -glucanase putative *M. pernicioso*, deposited in GenBank.

Key words: *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora pernicioso*, endo-1,3 (4)- β -glucanase.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por permitirme cumplir uno más de mis propósitos en esta vida.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado durante el transcurso de la Maestría.

Agradezco al Colegio de Postgraduados así como a la Línea de investigación No. 5 Biotecnología microbiana, vegetal y animal por el financiamiento a la presente tesis.

Agradezco sinceramente a los miembros mi consejo particular por todo su esfuerzo, dedicación, tiempo y apoyo brindado para la realización de la presente tesis.

Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz, Dr. Jesús Alberto Juárez Ramos, Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera.

Al mismo tiempo deseo agradecer al Dr. Xavier Boldo León por su valioso apoyo en los recursos tecnológicos y sugerencias para la realización de la presente tesis.

Deseo agradecer los laboratorios Fitopatología, Ciencia Animal, LASPA, Tecnología de Alimento, Ciencia Ambiental y Biología Molecular del Colpos Campus Tabasco y al Laboratorio de Genómica de División Académica Ciencias de la Salud de la UJAT. Por su contribución para la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mí querida esposa Francis por todo su amor y apoyo incondicional, porque es la razón de mi vida.

A mis padres Eliseo y Lesvia por su apoyo incondicional y por todo el amor que me dan.

A mis hermanos Bernabé, Baltazar, Elida (q.p.d), María Urania, Javier y Froylan por todo su apoyo, por estar conmigo en todo momento.

A mis cuñadas, suegros y sobrinos.

A mis compañeros y amigos de generación, por su valiosa amistad.

CONTENIDO

	Pág.
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
I.2. OBJETIVO GENERAL.....	3
I.2.1. OBJETIVO PARTICULAR.....	3
I.3. HIPÓTESIS.....	4
I.4. ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	5
I.5. LITERATURA CITADA.....	6
CAPITULO II.....	11
REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
II.1. Origen y distribución de <i>Moniliophthora roreri</i>	11
II.2. Taxonomía de <i>Moniliophthora roreri</i>	13
II.3. Morfología básica de <i>Moniliophthora roreri</i>	14
II.4. Descripción morfológica del cultivo de <i>Moniliophthora roreri</i> in vitro.....	15
II.5. Ciclo de vida de <i>Moniliophthora roreri</i>	16
II.6. Síntomas de la infección.....	16
II.7. Disponibilidad de tejido susceptible.....	19
II.8. Fuente de inóculo.....	19
II.9. Mecanismos de dispersión.....	20
II.10. Epidemiología.....	21
II.11. Clasificación de las enzimas celulasas.....	22
II.12. Uso de las enzimas celulasas en la industria de alimentos.....	23
II.13. Fermentación en estado sólido.....	30
II.14. LITERATURA CITADA.....	32
CAPÍTULO III.....	39
Identificación molecular del hongo fitopatógeno <i>M. roreri</i> , mediante la amplificación y secuenciación deL gen 18S ADNr y LA región ITS1-5.8S-ITS2.....	39
III.1. INTRODUCCIÓN.....	39
III.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
III.2.1. Aislamiento de <i>M. roreri</i>	41
III.2.2. Medio de cultivo.....	41
III. 2.3 Extracción de ADN cromosómico.....	42
III.2.4. Amplificación del gen 18S ADNr y la región ITS1-5.8S-ITS2 por PCR.....	43
III.2.5. Electroforesis del ADN.....	44
III.2.6. Purificación de los fragmentos de ADN amplificados.....	44
III.2.7. Secuenciación del ADN purificado.....	45
III.2.8. Alineamiento múltiple de secuencias de genes 18SADNr descritos en hongos.....	45
III.2.9. Relaciones de similitud entre las secuencias de genes 18S ADNr y la región ITS1-18S ADNr-ITS2 de la cepa MRO1 de <i>M. roreri</i> y de otros hongos descritos.....	45
III.3. RESULTADOS.....	46
III.3.1. Identificación molecular de la cepa MRO1.....	46

III.4. DISCUSIÓN.....	55
III.5. CONCLUSIÓN.....	56
III.6. LITERATURA CITADA	57
CAPÍTULO IV	60
AMPLIFICACION Y SECUENCIACION DE GENES CODIFICANTES DE ENZIMAS EXTRACELULARES ENDO-1,3 (4)- β -GLUCANASA A PARTIR DE <i>Moniliophthora roreri</i>	60
IV.1. INTRODUCCION	60
IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
IV. 2.1. Extracción de DNA cromosómico.....	61
IV.2.2. Amplificación de genes codificantes de enzimas extracelulares endo-1,3(4)- β -glucanasa a partir de <i>M. roreri</i>	61
IV.2.3. Secuenciación del ADN purificado	62
IV.2.4. Alineamiento múltiple de aminoácidos de la secuencia parcial del gen putativo MrGLU1 de la cepa MRO1 de <i>M. roreri</i> y genes endo-1,3(4)- β -glucanasa descritos en otros hongos	62
IV.2.5. Relaciones de similitud entre la secuencia parcial de aminoácidos del gen putativo MrGLU1 de la cepa MRO1 de <i>M. roreri</i> y la secuencia aminoácídica de genes endo-1,3(4)- β -glucanasa descritos en otros hongos.....	62
IV.3. RESULTADOS.....	63
IV.3.1. Amplificación y secuenciación del gen MrGLU1 de <i>M. roreri</i>	63
IV.3.2. Relaciones de similitud entre secuencias de genes codificantes de enzimas endo-1,3(4)- β -glucasas descritos en hongos.....	66
IV.4. DISCUSIÓN	69
IV.5. CONCLUSION	71
IV.6. LITERATURA CITADA.....	72
CAPITULO V	74
CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES ENDO-1,3(4)- β -GLUCANASA DELHONGO FITOPATÓGENO <i>Moniliophthora roreri</i> CULTIVADO BAJO EL SISTEMA DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO USANDO BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR COMO SUSTRATO INDUCTOR	74
V.1. INTRODUCCIÓN	74
V.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	76
V.2.1. Medios de cultivo	76
V.2.2. Determinación pH.....	77
V.2.3. Determinación de actividad enzimática	78
V.2.4. Determinación de la proteína total	78
V.2.5. Diseño experimental.....	78
V.3. RESULTADOS.....	79
V.4. DISCUSIÓN	84
V.5. LITERATURA CITADA.....	88
CAPITULO VI	92
VI.1. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES GENERALES.	92
VI.1.1. CONCLUSIONES.....	92
ANEXOS.....	93

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Iniciadores empleados en las reacciones de secuenciación del gen 18S ADNr.	43
Cuadro 2. Porcentaje de identidad de la secuencia del gen 18S ADNr (Número de acceso GenBank JF730693) de la cepa MRO1 con las secuencias de referencia de los parientes más próximos.	52
Cuadro 3. Porcentaje de identidad de la secuencia de la región espaciador transcrito interno 1, gen 5.8S ADNr, espaciador transcrito interno 2; secuencia parcial del gen 28S ADNr del gen 18S ADNr (Número de acceso GenBank JF769489) de la cepa MRO1 con las secuencias de referencia de los parientes más próximos.	54
Cuadro 4. Iniciadores empleados en las reacciones de amplificación y secuenciación del gen <i>MrGLU1</i> de la cepa MRO1 de <i>M. royeri</i> .	64
Cuadro 5. Efecto de la fermentación del bagazo de caña de azúcar con y sin inóculo y los días de fermentación en el cambio de pH.	81
Cuadro 6. Efecto de los días de la fermentación del bagazo de caña de azúcar con un inóculo en la actividad enzimática específica extracelular de endo-1,3(4)- β -glucanasa.	82
Cuadro 7. Efecto de los días de la fermentación del bagazo de caña de azúcar con un inóculo en la biomasa.	83

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Probable diseminación cronológica de la moniliasis del cacao en América (indicado por la línea remarcada). Línea roja = diseminación inicial.	12
Figura 2. Proceso de infección de mazorcas de <i>Theobroma cacao</i> L., infectadas con <i>M. royeri</i> : a) Mazorca sana, b) Gibas o abultamientos sobre el fruto (infecciones tempranas). c) Puntos aceitosos pequeños que crecen hasta formar manchas de bordes irregulares. d) Madurez prematura (infecciones tardías). e) Manchas chocolate. f) Esporulación del hongo sobre las manchas.	18
Figura 3. Síntomas internos: descomposición de tejidos	19
Figura 4: Estructura del ADNr nuclear de los organismos eucariontes. (González, 2008)	41
Figura 5. Amplificación por PCR del gen18S ADNr de la cepa MRO1 de <i>M. royeri</i> , aislada de mazorcas infectadas. 1. Marcador de talla molecular de ADN de 1 kb, 2. Fragmento de PCR.	46
Figura 6. Secuencia nucleotídica parcial de 1768 pb del gen 18S ADNr de la cepa MRO1 de <i>M. royeri</i> (Número de acceso GenBank: JF730693), aislada de mazorcas de cacao infectadas. La numeración del lado izquierdo indica el numero de bases nucleotídicas.	47
Figura 7. Amplificación por PCR dela secuencia parcial del gen 18S ADNr; espaciador transcrito interno 1, gen 5.8S ADNr, espaciador transcrito interno 2; secuencia parcial del gen 28S ADNr de la cepa MRO1 de <i>M. royeri</i> , aislada de mazorcas infectadas.1. Marcador de talla molecular de ADN de 100 pb, 2. Fragmento de PCR.	48
Figura 8. Secuencia nucleotídica de 758 pares de bases que contiene la secuencia parcial del gen 18S ADNr; espaciador transcrito interno 1, gen 5.8S ADNr, espaciador transcrito interno 2; secuencia parcial del gen 28S ADNr de la cepa MRO1 de <i>M. royeri</i> (Número de acceso GenBank: JF769489), aislada de mazorcas de cacao infectadas. La numeración del lado izquierdo indica el numero de bases nucleotídicas.	49
Figura 9. Relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del gen 18S ADNr de la cepa MRO1 aislada de frutos de cacao y las secuencias nucleotídicas de los genes 18S ADNr de otros hongos relacionados. La comparación filogenética se basó en el análisis de 1740 posiciones nucleotídicas por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P), el método de agrupamiento fue Neighbor-joining. La significancia de las relaciones se realizó mediante 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos. El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje.	51
Figura 10. Relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas dela región que comprende al gen 18S ADNr; espaciador transcrito interno 1,	

- gen 5.8S ADNr, espaciador transcrito interno 2; secuencia parcial del gen 28S ADNr de la cepa MRO1 de *M. roreri*, aislada de frutos de cacao y las secuencias nucleotídicas de la región espaciador transcrito interno 1, gen 5.8S ADNr, espaciador transcrito interno 2; secuencia parcial del gen 28S genes 18S ADNr de otros hongos relacionados. La comparación filogenética se basó en el análisis de 660 posiciones nucleotídicas por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P), el método de agrupamiento fue Neighbor-joining. La significancia de las relaciones se realizó mediante 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap con 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap, por medio de métodos de distancia y usando el índice P (Poisson) y el método de agrupamiento de Neighbor-joining. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos. El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje. 53
- Figura 11. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *MrGLU1* de la cepa MRO1 de *M. roreri*, aislada de mazorcas infectadas. 1. Marcador de talla molecular de ADN de 1 kb, 2. Fragmento de PCR. 64
- Figura 12. Secuencia nucleotídica parcial de 747 pb del gen *MrGLU1* (Número de acceso GenBank: JN029800) amplificado a partir de ADN de la cepa MRO1 de *M. roreri*. La numeración del lado izquierdo indica el número de bases nucleotídicas. 65
- Figura 13. Secuencia predicha 249 de aminoácidos de la proteína *mrGLU1*, deducida a partir del gen *MrGLU1* (Número de acceso GenBank: JN029800) de la cepa MRO1 de *M. roreri*. La numeración del lado izquierdo indica el número de bases nucleotídicas. 65
- Figura 14. Relaciones de similitud entre las secuencias de aminoácidos de la proteína predicha *mrGLU1* (referencia 221103) deducida a partir del gen *MrGLU1* de *M. roreri* y proteínas de genes endo 1-3(4)- β -glucanas descritos en otros hongos. Las secuencias fueron tomadas de la base de datos GenBank de la NCBI. La comparación filogenética se basó en el análisis de 247 posiciones aminoacídicas por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P), el método de agrupamiento fue Neighbor-joining. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos. El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje. 68
- Figura 15: Comportamiento del pH y Actividad enzimática específica pH Tes \times pH Prob* actividad enzimática específica \ominus . 80

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Registro GenBank NCBI de <i>Moniliophthora roreri</i> Cepa MRO1 No. Acceso JF730693 gen 18S ADNr.....	93
Anexo 2: Registro GenBank NCBI de <i>Moniliophthora roreri</i> Cepa MRO1 No. acceso JF769489 gen 18S ADNr ITS1-5.8-ITS2.....	94
Anexo 3: Registro GenBank NCBI de <i>Moniliophthora perniciosa</i> FA553 No. Acceso XM_002389314. Secuencia utilizada para el diseño de los oligonucleótidos iniciadores para la amplificación del gen Endo 1, 3(4)- β -glucanasa.	95
Anexo 4: Registro GenBank NCBI de <i>Moniliophthora perniciosa</i> FA553 No. Acceso XM_002392166. Secuencia utilizada para el diseño de los oligonucleótidos iniciadores para la amplificación del gen Endo 1, 3(4)- β -glucanasa.	96
Anexo 5: Registro GenBank NCBI de la secuencia MrGLU1 No. Acceso JN029800 que codifica la proteína mrGLU1 con función Endo 1, 3(4)- β -glucanasa.	97
Anexo 6: Alineamiento de las secuencias de <i>Moniliophthora perniciosa</i> FA553 No. Acceso XM_002392166 y XM_002389314. Utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos iniciadores para la amplificación del gen Endo 1, 3(4)- β -glucanasa.	98
Anexo 7: Formula para calcular la actividad enzimática.....	100

ABREVIATURAS

%: Por ciento.

% w/w: Porcentaje peso peso.

(NH₄)₂SO₄: Sulfato de amonio.

°C: Grados centígrados.

A: Adenina.

A₂₆₀: Absorbencia doscientos sesenta nanómetros.

API: Sistema para identificación de microorganismos.

Aw: Actividad de agua.

BCA: Bagazo de caña de azúcar.

BGL: β-1,4-glucanasa.

C: Citosina.

C1: Exo-β-1,4-glucanasa.

Cx: Endo-β-1,4-glucanasa.

CaCl₂: Cloruro de calcio.

Cb: β-1,4-glucosidasa o celobiasa.

cm²:Centímetros cuadrados.

CuSO₄ 5H₂O: Sulfato de cobre pentahidratado.

DNAr: Acido desoxiribonucleico ribosomal.

DNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfatos.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EG: Endoglucanasa.

Fe(NH₄)₂ SO₄:Sulfato de fierro amónico.

FES: Fermentación estado solido.

FeSO₄: Sulfato de fierro.

g/kg: Gramos por kilogramos.

G: Guanina.

GC: Guanina citocina.

GenBank: Banco de Genes.

HCl: Ácido clorhídrico.

HGT: Horizontal gene transfer.

HPO₄: Ácido fosfórico.
ITS: Espacio interno transcripto.
ITS1-F/ITS4: Iniciadores.
K₂HPO₄: Fosfato monobásico de potasio.
KB: Kilo base.
KH₂PO₄: Fosfato di básico de potasio
Km: Kilómetros.
KNO₃: Nitrato de potasio.
LSU4-B/LR6: Iniciadores.
MDH: Hidrolasa metalodependiente.
MgCl₂: Cloruro de magnesio.
MgSO₄ 7H₂O: Sulfato de magnesio heptahidratado.
MgSO₄: Sulfato de magnesio.
mM: Mili molar.
MnSO₄ 4H₂O: Sulfato de manganeso tetrahidratado.
MPDH: Mannitol 1-phosphate 5-dehydrogenase.
Na₂SO₄: Sulfato de sodio.
NaCl: Cloruro de sodio.
NaNO₃: Nitrato de sodio.
NCBI: Centro Nacional para Información de Biotecnología.
NEP's: Necrosis-Inducing Proteins.
NH₄NO₃: Nitrato de amonio.
pb: Pares de bases.
PCR: Reacción en cadena de polimerasa.
pH: Potencial Hidrogeno.
ppm: Partes por millón.
RAPD: Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN.
RCE1: Gen endoglucanasa.
RCE2: Gen endoglucanasa.
RFLP: Longitud de fragmentos de restricción.
RNAse: Enzima del ácido ribonucleico.

SDS: Dodecyl sulfato de sodio.

SmF: Sustrato de fermentación sumergida.

T: Timina.

Taq DNA: Enzima polimerasa.

T_m: Temperatura de fusión.

U/mg: Unidad por miligramo.

U/ml: Unidad por mililitro.

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.

UV: Luz ultra violeta.

VITEK: Sistema para identificación de microorganismos.

WBD: Witches' broom disease.

ZnSO₄·7H₂O: Sulfito de zinc heptahidratado.

α: Alfa.

μm: Micras.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En años recientes, el interés en celulasas y hemicelulasas se ha incrementado debido a las numerosas aplicaciones potenciales de estas enzimas. Las xilanasas tienen una variedad de aplicaciones tales como el blanqueo de la pulpa del papel, clarificación de jugos y vinos, separación del almidón y producción de ingredientes de alimentos funcionales, mejora de la calidad de los productos de panadería, y en la biotecnología de la alimentación animal (Bhat, 2000), así como en la formulación de detergentes en polvo, en la industria textil (Cavaco-Paulo, 1998; Rau, *et al.*, 2008) y en la extracción de jugos de vegetales y frutas (Gusakov *et al.*, 2000; Camassola *et al.*, 2007)

Las celulasas son enzimas inducibles, que son sintetizadas por muchos microorganismos durante su crecimiento en materiales celulósicos. Ejemplo de microorganismos que se conocen producen celulasas incluyen a las especies bacterianas de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*, así como especies de hongos filamentosos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma* (Persson *et al.*, 1991).

Se ha reportado que algunas especies del género *Penicillium* poseen potencial para producir celulasas (Jorgensen *et al.*, 2003; Camassola *et al.*, 2004; Kroghet *et al.*, 2004; Jorgensen *et al.*, 2005; Jorgensen *et al.*, 2006). Sin embargo, cepas de *P. funiculosum* rara vez han sido reportadas como productoras de celulasas. Van Wyk, (1999) comparó el potencial hidrolítico de las celulasas producidas por *P. funiculosum* y *Trichoderma reesei*, e indicó que cuando se usaron por separado, la celulasa producida por *P. funiculosum*, liberó niveles más altos de glucosa con todos los diferentes sustrato celulíticos ensayados.

Fusarium oxysporum es un hongo fitopatógeno de gran interés económico ya que ocasiona grandes pérdidas en numerosos cultivos. Se ha reportado que este hongo produce una batería de enzimas capaces de degradar polisacáridos complejos de las paredes celulares vegetales. Como se sabe, las paredes vegetales tienen tres

constituyentes poliméricos fundamentales: celulosa, hemicelulosa (polisacáridos no celulíticos que incluyen glucanos, mananos y xilanos) y lignina, que posee una estructura polifenólica compleja (Vázquez *et al.*, 1992). Por otro lado se conoce que el bagazo de la caña de azúcar ha mostrado ser un posible inductor para la síntesis del complejo enzimático celulasa debido a su contenido celulósico, aunque es necesario un tratamiento químico que vuelve a la celulosa más disponible para el ataque por hongos (Aguar, 2001).

M. roreri es el agente causal de la moniliasis del cacao, considerada como una de las más importantes afecciones del cultivo en muchos países del Centro y Sur América por los daños que ocasiona (Suárez, 2005). Se considera que *M. roreri* debe producir una batería de enzimas incluidas las endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucanasas, capaces de degradar los polisacáridos complejos de las paredes celulares vegetales. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes sobre la producción de enzimas celulolíticas en *M. roreri*.

I.2. OBJETIVO GENERAL

Amplificar y secuenciar posibles genes codificantes de enzimas extracelulares endo-1,3(4)- β -glucanasas y estudiar la cinética de producción de las mismas, a partir del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* cultivado bajo el sistema de fermentación en estado sólido usando bagazo de caña de azúcar como sustrato inductor.

I.2.1. OBJETIVO PARTICULAR

1. Realizar el aislamiento y la identificación molecular del hongo *Moniliophthora roreri*.
2. Determinar la cinética de producción de biomasa del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* bajo el sistema de fermentación en estado sólido usando bagazo de caña de azúcar como sustrato inductor.
3. Estudiar la cinética de producción de enzimas extracelulares endo-1,3(4)- β -glucanasas, a partir del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* bajo el sistema de fermentación en estado sólido usando bagazo de caña de azúcar como sustrato inductor.
4. Diseñar iniciadores para la amplificación y secuenciación de posibles genes codificantes de enzimas extracelulares endo-1,3(4)- β -glucanasas, a partir del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*.
5. Amplificar y secuenciar posibles genes codificantes de enzimas extracelulares endo-1,3 (4)- β -glucanasas a partir del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*.

I.3. HIPÓTESIS

El hongo *Moniliophthora roreri* es un fitopatógeno capaz de producir enzimas extracelulares endo-1,3(4)- β -glucanasas inducidas en un sustrato mediante fermentación en estado sólido.

I.4. ESTRUCTURA DE LA TESIS

El presente trabajo está organizado en cuatro capítulos, en el CAPITULO: I Se hace una introducción general y se describen los objetivos e hipótesis generales de este trabajo. En el CAPITULO II Se presenta la revisión de literatura presentando las generalidades de *M. roreri* y de las enzimas celulasas. En el CAPÍTULO III: Identificación molecular de *M. roreri*, se describen las metodologías empleadas para la identificación molecular de la cepa MRO1, mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento de cada gen 18S ADNr y región ITS1-5.8S-ITS2. En el CAPÍTULO IV: Se describe la amplificación y secuenciación de genes codificantes de enzimas extracelulares endo-1,3 (4)- β -glucanasa a partir de *Moniliophthora roreri*, así mismo, se analizan las secuencias obtenidas en este trabajo y se envían al GenBank de la NCBI para su registro. En el CAPÍTULO V: Se analiza la cinética de producción de enzimas extracelulares endo-1,3(4)- β -glucanasa del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* cultivado bajo el sistema de fermentación en estado sólido usando bagazo de caña de azúcar como sustrato inductor. Por último, se muestran las conclusiones generales y las recomendaciones derivadas de los diferentes ensayos realizados en el presente trabajo.

I.5. LITERATURA CITADA

- Aguiar, C. L. 2001. Biodegradación de celulosa de bagazo de caña de azúcar por hongos celulíticos. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 3: 117-121.
- Antunez, M. G. 2003. Genetic engineering of *Theobroma cacao* and molecular studies on cacao defense responses. Universidad Pensilvania.
- Bateman, P.R., Hidalgo, E., Garcia, J., Arroyo, C., Ten, M.H.G., Adonijah, V., y Krauss, U. 2005. Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Ann. Appl. Biol.* 147: 129-138.
- Beguín, P y Aubert, J.P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol.* 13:25-28.
- Bhat, M.K. 2000. Celulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18: 355-383.
- Biesebeke, R., Ruijter, G., Rahardjo, Y., Hoogschagen, M. J., Heerikhuisen M., Levin, A., Hondel, K., Ronzema, A. y Punt, P.J. 2002. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation. *FEMS Yeast Res.* 2: 245-248.
- Bowers, J.H., Bailey, B. A., Hebbar, P. K., Sanogo, S., y Lumsden, R. D. 2001. The impact of plant diseases on world chocolate production. *Plant Health Prog.*
- Brizuela, M. 1998. Enriquecimiento proteico de residuos de cosecha cañera por FES con hongos filamentosos, *LABORAT-acta.* X. 3.
- Camassola, M y Dillon, A. J.P. 2007. Production of cellulases and hemicellulases by *penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid stated fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 103:2196-2204.
- Camassola, M., y Dillon A. J. P. 2009. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *penicillium echinulatum*. *Industrial Crops and Products.* 29: 642-647.
- Camassola, M., Bittencourt, R. S., Shenen, N. T., Andreaus, J y Dillon, A. J. P. 2004. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. *BioCAT Biotrans* 22:391-396.
- Cao, J., Sun, W., Pan, Y., y Chen, S. 2000. High-producers of polygalacturonase selected from mutants resistant to rifampin in alkalophilic *Bacillus* sp. *NTT33. Enzyme Microb. Technol.* 27:545-548.

- Carrasco, T., Valiño, E., Ibarra, A., Garcia, Y y Perez T. 2003. Efecto negativo de la humedad en la fermentación en estado solido del bagazo de caña. *Ciencia Agricola*.1:37-41.
- Cavaco-Paulo, A. 1998. Mechanism of cellulase action in textile processes. *Carbohydrate polymers*. 37: 273-277.
- Couto, S. R y Sanromán,M. A. 2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *J. Biochem. Eng.* 22: 211–219.
- Crozier, J., Thomas S. E.,Aime,M. C.,Evans,M. C. y Holmes, K. A. 2006. Molecular characterization of endophytic morpho-species isolated from cocoa (*Theobroma cacao*): a potential source of biocontrol agents. Proceedings of the 1st International Conference on Plant-Microbe Interactions: Endophytes and biocontrol agents, Saariselka, Lapland, Finland. April: 18-22.
- Duran, A.1996. INRA-Dijon reactors for Solid state fermentation: designs and applications. *J. Scient. Ind. Res.* 55:317-332.
- Figueroa, V y Ly, J. 1990. Alimentación porcina no convencional. *GEPLECEA*. 215.
- Griffith, G. W., Nicholson, J., Nenninger, A.,Birch,N. R. y Hedger, N. 2003. Witches brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand J. Bot.* 41(3): 423- 435.
- Gusakov, A.V., Berlin, A. G.,Popova, N.,Okunev,O.N.,Sinitsyn,A. P. 2000. A comparative Study of Different Cellulase Preparations in the Enzymatic Treatment of Cotton Fabrics*Appl. Biochem.Biotechnol.* 88:119-126.
- Hölker, U y Lenz, J. 2005. Solid state fermentation are there any biotechnological advantages *Curr.Opin.Microbiol.* 8:301–306.
- Hölker, U., Hofer, M y Lenz, J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:175–186.
- Jorgensen, H., Eriksson, T., Borjensson, J., Tjerneld, F y Olsson L. 2003.Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillum brasilianum* IBT 20888.*Enzyme Microb. Technol.* 32:851-861.
- Jorgensen, H., Morkeberg, A., Krogh, K.B.R y Olsson L. 2005. Production cellulases and hemicellulases by three *Penicillum* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme Microb. Technol.* 36:42-48.

- Jorgensen, H y Olsson, L. 2006. Production cellulases by *Penicilliumbrasilianum* IBT 20888-Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme Microb. Technol.* 38:381-390.
- Kapoor, M., Beg, Q W., Bhushan, B., Dadhich, K.S y Hoodal, G.S. 2000. Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. *Process Biochem.*36: 467–473.
- Kashyap, D. R., Soni S.K y Tewari, R. 2003. Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation. *Bioresour. Technol.* 88:251–254.
- Krogh K.B.R., Morkeberg, A. H., Jorgensen, J., Frisvad, C y Olsson, L.2004. Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol* 116:389–401.
- Mandebvu, P., West, J. W., Froetschel, M. A., Hatfield, R. D., Gates, R. N., y Hill, G. M.1999. Effect of enzyme or microbial treatment of bermudagrass forages before ensiling on cell wall composition, end products of silage fermentation and in situ digestion kinetics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 77, 317-329.
- Mitchell, D.1999. Scale-up Strategies for Packedbed Bioreactors for Solid-state Fermentation, *Process Biochem.* 35:167-178.
- Moo-Young M., Moreira, A. R y Tengerdy, R. P. 1983. Principles of the Solid Substrate fermentation, In *Filamentous Fungi*.4 Ed. J. E. Smit, D.R. Berry and B. Kristianse, Edward Arnold.117-144.
- Moo-Young M.,y Cannel, E.1980. Solid State Fermentation Systems. *Process Biochem.*24-28.
- Pandey A., Soccol, C. R., Nigam, P y Soccol, V. T. 2000. Biotechnological potential of agroindustrialresidues I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 74, 69–80.
- Pascual S., De Cal, A., Magan, A., y Melgarejo, P. 2000. Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and submerged cultures. *J. Appl. Microbiol.* 89:847–853.
- Persson, I., Tjerneld, F y Hahn-Hagerdal, B.1991. Fungal cellulolytic enzyme production: a review. *Process Biochem.* 26:65-74.
- Prakasham, R.S., Rao,C. S y Sarman, P.2006. Green gram husk an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 97:1449–1454.

- Rau, M., Heidemann, C., Pascoaling, A. M., Ximenes Filho E., Camassola, M y Dillon, A. J. P. 2008. Application of cellulases from *Acrophialophora nainiana* and *Penicillium echinulatum* in textile processing of cellulosic fibres. *Biocatalysis and Biotransformation*. 26: 383-390.
- Rojan, P.J., Nampoothiri, M. K y Pandey, A. 2006. Solid-state fermentation for lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochem*. 41:759–763.
- Rosillo, C. F y Walter, A. 2006. Global market for bioethanol: historical trends and future prospects. *Energy for Sustainable Development*. 1:18-30.
- Ruijter, G. J., Visser, J y Rinzema, A. 2004. Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. *Microbiology* 150:1095–1101.
- Sabu, A., Augur, C., Swati, C y Pandey, A. 2006. Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 undersolid stated fermentation. *Process Biochem*. 41: 575-580.
- Samuels, J. G., Suárez, C., Solis, K., Holmes, A.K., Thomas, E. S., Ismaiel, A y Evans, C. H. 2006. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycol. Res*. 110: 381-392.
- Santos, M. M., Rosa, A. S., Dalboit, S., Mitchell, D. A., y Kriger, N. 2004. Thermal denaturation: is solid state fermentation really a good technology for the production of enzymes. *Bioresour. Technol*. 93: 261–268.
- Sheehan, J y Himmel, M. E. 1999. Enzymes, energy and the environment: Cellulase development in the emerging bioethanol industry. *Biotechnology Progress*, 15: 817-827.
- Socol, C y Vandenberghe, L. 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *J. Biochem. Eng*. 13: 205-218.
- Suarez, C., y Ly, Y. 2005. Extracción y purificación del AND de *Moniliophthoralaroreri* hongo que ataca el cacao, en el norte de Santander. *Respuestas* 10: 2.
- Sun, Y y Chen, J. 2002. Hydrolysis lignocellulosic materials for etanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83:1-11.
- Tolan, J y Foody, B. 1999. Cellulase from submergerged fermentation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 65:40-47.
- Van Wyk, J. P. H. 1999. Saccharification of paper products by cellulase from *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma reesei*. *Biom Bioen* 16:239–242.

- Vazquez, C., Sellek, R., y Fernandez, N. 1992. Enzimas que degradan paredes vegetales en *Fusarium oxysporum*. Biol. San. Veg. Plagas. 18:693-698.
- Viniegra, G. G. 1997. Solid Stated Fermentation: Difinition, Characteristics, Limitations and Monitoring, Ed. Advances in solid Stated Fermentation, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Chapter 2. 5-22.
- Virupakshi, S., Gireesh, B.K., Gaikwad, S. R y Naik, G. R. 2005. Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in solid state fermentation. Process Biochem. 40: 431–435.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

II.1. Origen y distribución de *Moniliophthora roreri*

Theobroma cacao L., (cacao) es una planta perenne que es cultivada por sus granos, los cuales son usados para la elaboración del chocolate y manteca de cacao. El cacao es una planta que se desarrolla bajo sombra, no soporta temperaturas bajas, siendo su temperatura límite promedio anual de 21°C y óptima de 25°C. La humedad relativa también es importante ya que puede contribuir a la propagación de algunas enfermedades del fruto ocasionadas principalmente por los hongos fitopatógenos *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri* (Bowers *et al.*, 2001; Antunez, 2003; Griffith *et al.*, 2003; Bateman *et al.*, 2005; Crozier *et al.*, 2006; Samuels *et al.*, 2006).

Ecuador fue considerado inicialmente como el probable centro de origen de la moniliasis del cacao. Sin embargo, Phillips-Mora (2003), mediante estudios de genética poblacional y el uso de marcadores moleculares, demostró que las regiones geográficas del noroeste de Colombia contienen la mayor diversidad genética que supera a la encontrada en Ecuador, por lo que se ubica a esta área como el centro de origen más probable.

La distribución de *M. roreri*, está actualmente restringida a América (Phillips-Mora *et al.*, 2007) donde ha sido reportado sucesivamente en 11 países en un periodo de casi 200 años, iniciando en Colombia en 1817 (Phillips-Mora, 2003), Ecuador en 1917 (Rorer, 1918), Venezuela en 1941 (Muller, 1941) y Perú en 1950 (McLaughlin, 1950). La aparición de *M. roreri* en Panamá en 1956 (Orellana, 1956), marcó una expansión geográfica significativa del hongo y este ha sido dispersado a través de Mesoamérica (Phillips-Mora *et al.*, 2007). Durante los últimos 50 años, *M. roreri* se dispersó más de 2500 km abarcando seis países: Costa Rica en 1978 (Enríquez y Suárez, 1978), Nicaragua en 1980 (López y Enríquez, 1980), Honduras en 1997 (Porras y Enríquez, 1998), Guatemala en el 2002 (Phillips-Mora y Wikilson, 2007), Belice en el 2004 (Phillips-Mora *et al.*, 2006b) y México en el 2005 (Phillips-Mora *et al.*, 2006a), alcanzando así el límite norte del cultivo del cacao en el continente americano (Figura.

1). Es de notar que en México, la dispersión se dio en un salto de aproximadamente 400 km, a la posición más al norte que se conoce. Posteriormente, regresa al sur de Chiapas (Tapachula), cercano a la frontera sur-oeste de Guatemala. La forma en que se dispersó la moniliasis del cacao hacia México, y al interior del territorio Mexicano, sustenta la teoría de que este evento fue mediado por el hombre (Phillips-Mora *et al.*, 2006a).

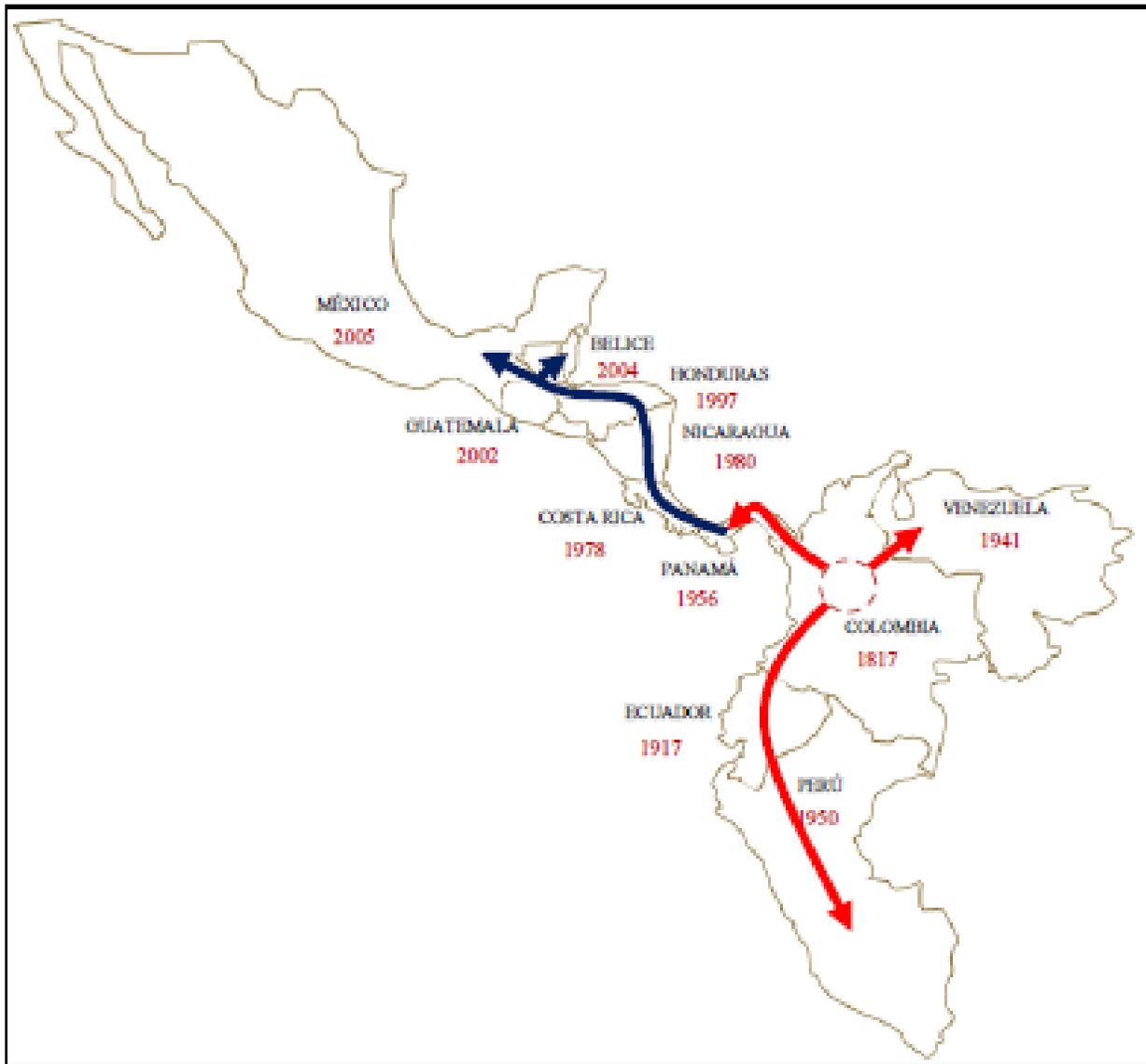


Figura 1. Probable diseminación cronológica de la moniliasis del cacao en América (indicado por la línea remarcada). Línea roja = diseminación inicial.

II.2.Taxonomía de *Moniliophthora roreri*

El agente causal de la moniliasis fue identificado por Smith en 1918, como una especie del género *Monilia*. Ciferri y Parodi en 1933, revisaron la taxonomía del hongo y confirmaron la identificación temporal hecha por Smith, clasificando al hongo como sigue:

Clase	Deuteromycetes
Orden	Hyphales
Genero	<i>Monilia</i>
Especie	<i>roreri</i>

Evans *et al.*(1978), observaron la presencia de características morfológicas típicas de los Basidiomicetes, por lo que propusieron su agrupación dentro de este grupo y crearon un nuevo nombre para denominar la especie: *Moniliophthora*. La ausencia de estructuras sexuales en el hongo impidió una clasificación taxonómica más exhaustiva por casi 25 años. Usando técnicas moleculares, Phillips-Mora (2003), recientemente confirmó que el hongo es un Basidiomicete y determinó que pertenece al orden de los Agaricales y probablemente a la familia Tricholomataceae. Además, también demostró que este hongo es muy cercano genéticamente a *Crinipellis pernicioso*, agente causal de la escoba de bruja. Evans *et al.* (2002), propusieron que el nombre *Moniliophthora roreri* debía ser cambiado a *Crinipellis roreri*; sin embargo, es necesario realizar algunos estudios complementarios para confirmar la validez de este cambio.

De acuerdo con Evans *et al.* (1978), Aime y Phillips-Mora (2005), la clasificación taxonómica de *M. roreri* es la siguiente:

Clase	Deuteromycetes
Orden	Hyphales
Familia	Tricholomataceae
Genero	<i>Monilia</i>
Especie	<i>roreri</i> .

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

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

Por otro lado de acuerdo al Index Fungorum (<http://www.speciesfungorum.org/>) *M. roreri* es clasificado de la siguiente forma:

Nombre: *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson y Benny, *Can. J. Bot.* 56 (20): 2530 (1978).

Sinónimo: *Crinipellis roreri* (Cif.) H.C. Evans, en Evans, Holmes, Phillips y Wilkinson, *Mycologist* 16(4): 151 (2002); *Monilia roreri* Cif.in Ciferri y Parodi, *Phytopath. Z.* 6 (5): 542 (1933).

Posición en clasificación: Marasmiaceae, Agaricales, Agaricomycetidae, Agaricomycetes, Agaricomycotina, Basidiomycota, Fungi.

II.3.Morfología básica de *Moniliophthora roreri*

En ciertos hongos la conidiofora o conidióforo, es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidias. Las conidioforas se localizan al extremo de hifas las cuales levantas la conidiofora en el aire con el fin de esparcir las esporas con más eficiencia. *M. roreri* posee micelio septado

con doliporos típicos. Las esporas también llamadas conidias, se producen en cadenas con maduración basipétala (Evans, 1981) y se desprenden fácilmente del micelio; su pared es gruesa y son amarilla-pálido o café cuando forman masas de esporas. Las esporas son principalmente globosas y elipsoides, las cuales se presentan en una proporción aproximada al 60% y 30% con un diámetro promedio de 9 μm y de 8.6 x 11.8 μm , respectivamente (Phillips-Mora, 2003).

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

II.4. Descripción morfológica del cultivo de *Moniliophthora roreri in vitro*

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

II.5. Ciclo de vida de *Moniliophthora roreri*

De acuerdo con Evans *et al.*(1978), *M. roreri* representó el estado mitótico (anamorfo) de un basidiomiceto desconocido. Posteriormente, Evans, (1981) especuló que el teleomorfo (estado reproductivo sexual que típicamente desarrolla un cuerpo fructífero) podría ser una especie del género *Crinepellis*, dado el inusual ciclo vital pleomórfico, hemibiotrófico que presenta *M. roreri*, el cual también es observado en otro de los patógenos importantes del cacao: *C. perniciosa*.

Evans *et al.* (2002), encontraron evidencias de que la meiosis ocurre dentro de las esporas, un fenómeno que tiene coherencia con el contenido nuclear variable de las mismas; por lo que proponen que la fase reproductiva observada en *M. roreri* es sexual, y que este patógeno corresponde a un teleomorfo modificado. De acuerdo con estos autores, durante la esporogénesis y germinación ocurre la meiosis, la cual da lugar a la formación de hifas infectivas monocarióticas. La fase parasítica haploide se da sólo en el tejido vivo (biotrófico), en la que el hongo crece y se alimenta intercelularmente sin activar los mecanismos de defensa del hospedero. Una señal no identificada (asociada con la edad del fruto) estimula la transición a la fase diploide necrotrófica, la cual induce los síntomas característicos de la moniliaisis (Evans *et al.*, 2002). De acuerdo con Griffith *et al.* (2003), lo anterior parece indicar que un antepasado de *M. roreri* perdió la capacidad de formar basidiocarpos pero no la capacidad de experimentar división nuclear meiótica (Griffith *et al.*, 2003).

II.6. Síntomas de la infección

Los frutos, son los únicos órganos que pueden ser infectados naturalmente por *M. roreri*. La infección, normalmente ocurre cuando estos son jóvenes, y se tornan más resistentes cuando maduran. Las esporas se depositan sobre el fruto, germinan si hay agua o mueren por la radiación/desecación. El período de incubación es largo, generalmente mayor a un mes. El daño se extiende internamente conforme los frutos crecen, y posteriormente, el organismo emerge a la superficie para esporular. Algunos frutos que están muy dañados internamente, a veces no muestran evidencias externas de la enfermedad conocida como infecciones ocultas (Figura 2a-e), pero pueden ser

reconocidos porque pesan más, debido a que están llenos de agua por la descomposición interna que sufren (Evans, 1981).

Los **síntomas externos** de la enfermedad (Figura 2), inician con la aparición de pequeños puntos aceitosos (Figura 2c) sobre los frutos de 30-45 días de edad. Estos puntos usualmente no son detectados hasta que incrementan su tamaño, formando manchas necróticas también llamadas manchas chocolate (Figura 2d) aproximadamente a los 75 días después de la infección (Merchán, 1981). Otros síntomas iniciales son la deformación o la muerte de frutos pequeños, la cual en algunos casos se puede confundir con la muerte fisiológica de los mismos. También es frecuente que algunas mazorcas en diferentes estados de desarrollo, presentan una maduración prematura en toda o en parte de su superficie (Suarez, 1971).

Aproximadamente 4-5 días después de la aparición de las manchas chocolate, sobre estas se observan los signos del hongo que se caracterizan por la presencia de un micelio blancuzco que se va tornando un poco más oscuro conforme las esporas maduran. Durante las semanas siguientes, los frutos se deshidratan (Figura 2f) y momifican gradualmente (Phillips-Mora, 2004).

En el caso de los **síntomas internos**, el hongo produce una necrosis progresiva de los tejidos internos (Figura 3). En los estados avanzados de la enfermedad, el interior de los frutos (tejidos centrales, pulpa, semillas), forma una sola masa compacta acuosa que es difícil de distinguir en sus partes originales. Sin embargo, dependiendo del momento en que los frutos fueron infectados, las semillas podrían presentar un mayor o menor nivel de deterioro (Desroiser y Suarez, 1974).



a



b



b



d



e



f

Figura 2. Proceso de infección de mazorcas de *Theobroma cacao* L., infectadas con *M. roleri*: a) Mazorca sana, b) Gibas o abultamientos sobre el fruto (infecciones tempranas). c) Puntos aceitosos pequeños que crecen hasta formar manchas de bordes irregulares. d) Madurez prematura (infecciones tardías). e) Manchas chocolate. f) Esporulación del hongo sobre las manchas.



Figura 3. Síntomas internos: descomposición de tejidos

II.7. Disponibilidad de tejido susceptible

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

II.8. Fuente de inóculo

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

Las esporas se producen abundantemente sobre los frutos enfermos, en cantidades que alcanzan 44 millones de esporas/cm² (Campuzano, 1981, citados por Phillips-Mora, 2004). Así, un fruto de tamaño adulto, puede producir más de 7,000 millones de esporas. Los frutos infectados pueden producir varios ciclos de esporulación. Inclusive las momias en el árbol o sobre el suelo son capaces de esporular aún cuando estén muy cerca de su descomposición (Ram, 1989, citado por Phillips-Mora, 2003; Evans, 1981).

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

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

II.9.Mecanismos de dispersión

El viento es el principal modo de dispersión de las esporas, aunque también pueden ser diseminadas por el agua, insectos y otros animales. Las esporas secas, se desprenden fácilmente de las mazorcas mediante cualquier estímulo físico, y son llevadas por el viento, el cual puede moverlas a distancias considerables, mientras no existan importantes barreras naturales. Sin embargo, aunque el hongo está muy bien adaptado a la dispersión por el viento, debido a que poseen esporas que se secan con facilidad y tienen paredes gruesas, se ha sugerido que su movilización y sobrevivencia es limitada por el peso de las mismas y por su susceptibilidad a la radiación solar (Porras y Enriquez, 1998).

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

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

Diferentes especies de animales como monos, ardillas, ratas, murciélagos, venados, pericos y otros tipos de aves, podrían tener un papel importante en la diseminación de la moniliasis. Estos animales, podrían favorecer la dispersión del hongo en dos vías: llevando las esporas sobre sus cuerpos o dentro de sus tractos digestivos o bien, transportando frutos enfermos o parte de ellos de un sitio a otro (Wood y Lass, 1985)

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

II.10. Epidemiología

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

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

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

II.11. Clasificación de las enzimas celulasas

El principal componente estructural de los vegetales es la celulosa. Este polisacárido, está formado por unidades de glucosa anhidra, las cuales se mantienen unidas mediante enlaces β -1,4-glucosídicos. Pero además, la configuración β le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales no se presentan aisladas sino unidas entre sí mediante enlaces de hidrógeno intramolecular formando una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis (Chou *et al.*, 1981; Fan *et al.*, 1982; Ljungdahl y Eriksson, 1985). Los procesos de extracción de compuestos de interés, se realiza mediante la aplicación de enzimas celulasas o preparados con actividad enzimática múltiple (celulasa, hemicelulasa y pectinasa), debido a su efecto sinérgico y por el potencial que tienen sobre la hidrólisis de los componentes estructurales de la pared celular de los vegetales (Sreenath *et al.*, 1987; Sreenath *et al.*, 1995; Chauhan *et al.*, 2004).

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa (Lee, 1997).

El sistema para la conversión de celulosa a glucosa involucra tres tipos de enzimas celulasas: la endo- β -1,4-glucanasa identificada como Cx (1,4- β -D-glucan glucano hidrolasa E.C.3.2.1.4), la exo- β -1,4-glucanasa conocida como C1 (1,4- β -D-glucan celobio hidrolasa E.C.3.2.1.91) y la β -1,4-glucosidasa o celobiasa también denominada Cb y cuya clasificación es β -D-glucósido glucohidrolasa E.C.3.2.1.21 (Ladisich *et al.*, 1983; Bataille y Toussaint, 1985; Marsden y Gray, 1986; Lee, 1997; Hahn-Hägerdal y Palmqvist, 2000).

El mecanismo propuesto en la literatura para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas:

En la primera etapa, la endo β -1,4-glucanasa, actúa al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierten las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración β de su estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la posterior acción de C1 (Ryu y Mandels, 1980; Chou *et al.*, 1981; Philippidis y Smith, 1995; Lee, 1997).

En la segunda etapa, actúa la exo β -1,4-glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa o glucosa (Ryu y Mandel, 1980; Marsden y Gray, 1986; Philippidis y Smith, 1995; Bhat y Bhat, 1997; Lee, 1997). Ambas enzimas endoglucanasa y exoglucanasa, son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis (Lee, 1997; Hahn-Hägerdal y Palmqvist, 2000).

Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa (Beldman *et al.*, 1988). Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la β -1,4-glucosidasa o Cb, porque las glucanasas son inhibidas por la celobiosa (Ladisich *et al.*, 1983; Ljungdahl y Eriksson, 1985; Philippidis y Smith, 1995; Lee, 1997).

II.12. Uso de las enzimas celulasas en la industria de alimentos

El interés sobre el estudio de la aplicación de enzimas en la industria de la extracción de productos vegetales, se ha incrementado de manera importante en las últimas dos décadas, debido a que ha mostrado ser una herramienta factible para facilitar la liberación de los componentes de las células del tejido en proceso y al mismo tiempo se incrementa la producción (Ovando y Waliszewski, 2005).

En el proceso de extracción de jugos, los preparados enzimáticos tienen un enorme potencial de aplicación por dos razones: por un lado, se incrementa el porcentaje de extracción de los jugos; y por otro lado, el jugo presenta un sabor más agradable. Das *et al.* (1994), registraron el efecto del uso individual de dos preparados enzimáticos comerciales: Cellulast (con actividad celulasa) y Ultrazyme (con actividad pectinasa); así como la mezcla de ellos sobre la extracción del jugo de naranja a partir de la pulpa del fruto. Ellos observaron que el pre tratamiento de la pulpa de naranja en una relación pulpa/agua de 1:1, a una temperatura de incubación de 45°C, durante 1 h, con la enzima Ultrazyme a una concentración de 0.32 UI/30 g de pulpa, provocó un aumento en el contenido de los sólidos solubles de 1.4 °Brix, comparado con la muestra testigo (sin enzima). El aumento de los sólidos solubles, fue atribuido a que las enzimas pectinasas solubilizaron la pectina y las membranas de la pared de las células que contienen el jugo, lo cual provocó un ablandamiento del tejido de la pulpa, y aumentó la producción de jugo. Sin embargo, cuando ellos evaluaron el efecto de la mezcla de las enzimas comerciales (Cellulast y Ultrazyme) en la extracción del jugo de naranja, observaron un incremento de 1.8 °Bx en el contenido de los sólidos solubles comparado con el tratamiento testigo. Lo anterior, fue atribuido a la sinergia que ejerció el uso combinado de las enzimas. La enzima celulasa adicionada sola, en las condiciones de estudio, no presentó un efecto significativo ($p > 0.05$) con respecto al tratamiento testigo (sin enzima). Por lo tanto, los autores concluyeron que la efectividad de las enzimas dependerá de la naturaleza química del sustrato analizado. Además, estos autores detectaron que durante la pre digestión enzimática de la pulpa de naranja, se liberaron otros componentes importantes de la fruta, como son los aceites esenciales, además de los azúcares que juntos le imparten un sabor mas agradable al jugo (Ovando y Waliszewski, 2005).

Otra aplicación del uso de enzimas en la industria de alimentos, es la maceración enzimática de frutas y vegetales como la zanahoria. Es una etapa previa y muy importante en cualquier proceso industrial, en donde se utiliza el tratamiento térmico, por dos razones: 1) Evitar o disminuir la pérdida de los componentes nutricionales presentes en el tejido vegetal, 2) Evitar el deterioro de las propiedades sensoriales del producto como son la textura y el sabor. Por ejemplo, durante el procesamiento

industrial del jugo de zanahoria, se recomienda una temperatura menor a 55 °C, para evitar la inactivación de las enzimas endógenas de la zanahoria. Por lo tanto, la ventaja de la maceración enzimática de la zanahoria, radica en que las enzimas pectinasas solubilizan la pectina y las membranas de la pared de las células que contienen el jugo provocando así un ablandamiento del tejido; de tal manera, que se facilita la extracción del jugo durante el proceso industrial, además de que permite disminuir la temperatura mejorando la palatabilidad del jugo (Dinnella *et al.*, 1998).

Por otro lado, Bargaballo *et al.* (2004), menciona que en la industria de alimentos y particularmente en el sector vinícola, se ha incrementado el interés en enzimas glucohidrolasas, especialmente pectinasas y glucosidasas (Bargaballo *et al.*, 2004). Lo anterior, obedece a que muchos compuestos naturales que son componentes importantes del sabor y aroma (monoterpenoles, C13 norisoprenoides y derivados) se acumulan en muchas frutas como precursores de sabor con enlaces mono o diglucosídico. Estos requieren hidrólisis química o enzimática para la liberación de las fragancias y sabores (Christine *et al.*, 1998). La hidrólisis enzimática de los glucósidos del vino de uva involucran la operación secuencial de las reacción de rhamnosidasa (EC 3.2.1.40), arabinosidasa (EC 3.2.1.55) y la β -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.21), esta última cataliza la liberación de componentes del sabor a partir de monosacáridos y directamente incrementa el aroma del vino (Bargaballo *et al.*, 2004).

Vora *et al.* (1999), describe el efecto de la mezcla de dos preparados enzimáticos comerciales con actividad mixta: Rohament Max (pectinasa, hemicelulasa y celulasa) y Rohament PL (poligalacturonasa) producidos por Enzymes Australia Pty. Ltd. El efecto de dichos preparados fue estudiado para la producción de jugo de zanahoria a partir de la pulpa. Los resultados indicaron que la mezcla de los preparados enzimáticos en una proporción de 25:75 (Rohament PL: Rohament Max), provocó un incremento marcado en el porcentaje de jugo de zanahoria extraído, comparado con el porcentaje de jugo obtenido de la pulpa de zanahoria no tratada con la enzima. También, estos autores observaron que el porcentaje de jugo de zanahoria obtenido de la pulpa tratada enzimáticamente, varió con la concentración de enzima analizada (75, 150, 300 y 500 ppm) y el tiempo de tratamiento enzimático (30, 60, 90, 180 y 300 minutos). Las condiciones óptimas, para la extracción del jugo de zanahoria, registradas fueron una

concentración de enzima de 150 ppm y un tiempo de incubación de 90 minutos, donde el porcentaje de jugo extraído fue de 77.6 % y además presentó un bajo contenido de sólidos (< 0.2 %, límite permitido de sólidos en el jugo). Adicionalmente, ellos observaron un incremento marcado en la extracción de α -carotenos (3.6 veces mayor) y β -carotenos (4.4 veces mayor) en el jugo de zanahoria tratado enzimáticamente en comparación con el jugo no tratado (testigo), donde el contenido de α -carotenos y β -carotenos fue de 3.0 ppm y 3.2 ppm, respectivamente. Asimismo, el porcentaje de jugo de zanahoria extraído de la pulpa no tratada con la mezcla enzimática fue de sólo 36.0 %. Por lo tanto, los investigadores concluyeron que la maceración enzimática de la pulpa de zanahoria, además de mejorar la extracción del jugo, tuvo un efecto positivo sobre la calidad del jugo; ya que obtuvieron una mejor extracción de carotenoides, sin alterar significativamente ($p = 0.05$) el color del jugo, comparado con el jugo obtenido de zanahoria no tratada con la mezcla enzimática.

La extracción de colorantes es otra aplicación atribuida a algunos preparados enzimáticos, específicamente de luteína a partir de las flores de caléndula. Delgado-Vargas y Paredes-López (1997), utilizó cinco preparados comerciales con actividades mixtas principalmente de celulasa, hemicelulasa y pectinasa: Econasa-Cep y Pectinasa-Cep suministradas por Enzyme Development Corp., Cytolasa-0 y Cytolasa-M129 obtenidas de Genencor Internacional (Rochester, NY) y Rapidasa-Press de Gist Brocades (Seelin, Francia). El tratamiento de las flores de caléndula con cualquiera de éstos preparados enzimáticos, permitió una mayor extracción de la luteína, comparado con el tratamiento testigo (sin enzima). Excepto con Rapidasa-Press, la cual no degradó las flores de caléndula en las condiciones estudiadas. El preparado comercial Econasa-Cep, que presentaba también actividad β -glucosidasa, fue el que provocó un mayor rendimiento en la extracción del carotenoide, a una concentración de 0.1 % w/w y un tiempo de incubación de 120 h, incrementando el contenido de luteína extraída de la caléndula de 1.7 a 7.4 g/kg en base seca.

Por otro lado, se ha descrito que el tratamiento enzimático es una alternativa viable para mejorar la producción de xantofilas extraídas de los pétalos de caléndula. El porcentaje obtenido de xantofilas representó un incremento del 53.9 % superior con respecto a la cantidad obtenida con el proceso comercial, debido a que la reacción

enzimática conduce a la degradación de los componentes de la pared celular (principalmente celulosa y hemicelulosa), lo que provoca un incremento en la permeabilidad de las células que mejora la transferencia de masa de los componentes hidrosolubles presentes en el tejido de las flores de la caléndula hacia la fase líquida “extracto enzimático” (Navarrete-Bolaños *et al.*, 2005).

Otros investigadores han demostrado que ciertos preparados enzimáticos con actividades mixtas también son factibles para la liberación de compuestos antioxidantes fenólicos. Los resultados de estas investigaciones han mostrado, por ejemplo, que el preparado enzimático comercial Grindamyl pectinasa, con actividad mixta principalmente pectinasa, pero también celulasa y hemicelulasa, producido por *Aspergillus niger* (Danisco Ingredients), no sólo fue efectivo al aumentar la extracción de los fenoles debido a la degradación de los polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectina) que constituyen la pared celular de la cáscara de uva, sino que mejoró también la actividad antioxidante de los extractos fenólicos, ya que la oxidación de las lipoproteínas se retrasó por un mayor tiempo (62 minutos) comparado con el tratamiento sin enzima (47 minutos), lo cual fue atribuido a la liberación selectiva de los fenoles antioxidantes o a la conversión de los glucósidos fenólicos en compuestos antioxidantes potentes, por la presencia de otras actividades en el preparado enzimático (Meyer *et al.*, 1998).

Jeya *et al.* (2010), realizaron la purificación y caracterizaron de una enzima endo β -1,4-glucanasa a partir de *Penicillium pinophilum* cultivado en medio líquido suplementado con diferentes fuentes de carbono (celulosa, glucosa, lactosa, maltosa, sucrosa, celobiosa, carboximetilcelulosa, xilano, almidón de arroz y avicel) y nitrógeno (extracto de levadura, peptona, maíz en polvo, urea, triptona, KNO_3 y NaNO_3). Los niveles más altos de actividad enzimática (5.0 U/mg de proteína) de endo β -1,4-glucanasa, fueron obtenidos usando almidón de arroz y polvo de maíz, a valores de pH y temperatura óptimo de 5.0 y 28°C respectivamente. Los autores concluyen que aunque existen muchos reportes de microorganismos productores de endo β -1,4-glucanasa, los niveles altos de actividad enzimática producidos por este hongo, indica la posibilidad de ser considerado como un buen candidato para aplicaciones industriales como la sacarificación para la producción de alcohol a partir de biomasa lignocelulítica.

Recientemente, ha cobrado importancia el uso de enzimas exógenas para incrementar la digestibilidad de las paredes celulares (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002a) y/o del almidón (Mora *et al.*, 2002; Buendía *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2005a; Gutiérrez *et al.*, 2005b; Rojo *et al.*, 2005).

Las enzimas exógenas, son aquellas que no pertenecen al sistema digestivo endógeno del animal, por lo que deben ser incorporadas en el alimento. Las enzimas digestivas amilolíticas están involucradas en todas las reacciones metabólicas que implican la conversión de las moléculas complejas de almidón (amilosa y amilopectina) a sus constituyentes más simples, como ejemplos glucosa, maltosa e isomaltosa. Las enzimas exógenas representaron una importante alternativa para incrementar la productividad y reducir los costos en los sistemas de producción de rumiantes (Schingoethe *et al.*, 1999).

Durante las últimas dos décadas, la tecnología de producción de enzimas, y en especial las de origen microbiano, ha permitido que estas sean actualmente comercializadas para diversos usos industriales (Klibanov, 1983). Actualmente, 515 microorganismos del género de *Bacillus* destacan entre los distintos microorganismos estudiados y modificados genéticamente para la producción de amilasas de uso industrial (Declerk *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 1993a, 1993b). Particularmente, *Bacillus licheniformis* sobresale, ya que degradó un amplio tipo de carbohidratos (Shariati *et al.*, 1995; Bose y Das, 1996).

A la fecha, las enzimas exógenas que con mayor frecuencia se han utilizado en la alimentación de rumiantes son las fibrolíticas. La aplicación de estas enzimas a la dieta mejoró la unión con el sustrato e incrementa la colonización microbiana del alimento, además de aumentar la resistencia de estas enzimas a la proteólisis ruminal microbiana y prolongar su tiempo de vida media en el rumen (Yang *et al.*, 1998). Así, diversos estudios *in vitro* han mostrado efectos benéficos de las enzimas fibrolíticas sobre la degradación ruminal de los forrajes (Feng *et al.*, 1996; Beauchemin *et al.*, 1998; Titi *et al.*, 1998; Tricarico *et al.*, 1998; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2001).

También, estas enzimas han producido efectos positivos importantes sobre la producción de leche de ganado especializado (Dawson y Tricarico, 1999; Schingoethe *et al.*, 1999; Pinos-Rodríguez y González, 2001), lo cual ha demostrado que el uso de

enzimas fibrolíticas permite aprovechar una mayor cantidad de energía de la fracción de la fibra potencialmente degradable en el rumen y así reducir la cantidad de granos incorporados en las raciones de vacas lecheras.

El uso de las enzimas amilolíticas termoestables, también tienen características potenciales para usarse como aditivo para mejorar la digestión ruminal del almidón. Las amilasas del *B. licheniformis* actuaron por difusión en los gránulos de almidón (Helbert *et al.*, 1996) y presentaron una gran actividad en un intervalo de pH entre 4 y 9, y de temperatura entre 30 a 90°C con un óptimo de 76°C. El rumen tiene condiciones de pH cercanas a la neutralidad con una temperatura constante de 39°C, por lo que las amilasas industriales termoestables podrían actuar sinérgicamente con las enzimas producidas por los microorganismos ruminales y con la acción de ambos tipos de enzimas incrementar la degradabilidad ruminal del almidón (Ingle y Erickson, 1978; Dobрева *et al.*, 1994).

En la nutrición de rumiantes, las amilasas termoestables se usan principalmente en el análisis del contenido de almidón y en la determinación del contenido de paredes celulares en alimentos ricos en almidón, de las cuales algunas de ellas presentan características potenciales para usarse como aditivo dietario en rumiantes, como es el caso de las amilasas del *B. licheniformis* (Rojo *et al.*, 2005).

Las amilasas termoestables de *B. licheniformis* y *A. niger*, son tanto del tipo endo amilasas como exoamilasas, las que actúan por difusión a través del gránulo del almidón y podrían hidrolizar las células de aleurona inmersas en el ectodermo donde se encuentra el almidón. Las amilasas actuaron en el grupo final no reductor del polímero de amilosa o amilopectina, específicamente sobre los enlaces α -1,4 o α -1,6 glucosídicos, y produjeron desde polisacáridos de alto peso molecular hasta residuos de cinco moléculas de glucosa, maltotriosa, maltosa y glucosa (Ingle y Erickson, 1978; Helbert *et al.*, 1996).

Las alfa-amilasas termoestables de *B. licheniformis* presentan actividad alta a pH de 4 a 9 (óptimo de 7.0) y temperaturas de 30 a 90°C con un óptimo de 76°C. Aún cuando las condiciones fisicoquímicas del rumen no son las óptimas, aunado a su potencial degradación por acción de las proteasas microbianas, los resultados obtenidos han demostrado que estas amilasas pueden ser útiles y podrían actuar sinérgicamente con

las enzimas extracelulares sintetizadas por las bacterias amilolíticas presentes en el rumen (Ingle y Erickson, 1978; Dobрева *et al.*, 1994; Bose y Das., 1996).

II.13. Fermentación en estado sólido

En la industria azucarera, el principal producto de la fracción insoluble de la caña de azúcar, después de extraído el jugo, es el bagazo, y representa cerca del 25% de la caña cultivada, destinándose básicamente a sustituir combustible fósil (Figuroa y Ly, 1990).

La fermentación en estado sólido (FES) del bagazo de la caña de azúcar, mediante la acción de microorganismos que degradan la celulosa y la lignina presentes en su composición, es muy benéfica. A partir de dicho proceso, se obtiene alimento para animales suplementado con proteína unicelular, enzimas microbianas (fitasas, pectinasas, celulasas y xilanasas), además de contribuir al saneamiento del medio ambiente (Carrasco *et al.*, 2003).

Moo-Young *et al.* (1980 y 1983), definen a la FES como un proceso en donde la humedad presente se encuentra retenida de forma compleja dentro de la matriz sólida. Posteriormente se incluyeron a todos los procesos que utilizan materiales insolubles en agua para el crecimiento de microorganismos en ausencia de agua libre, al igual que Mitchell *et al.* (1999).

Duran *et al.* (1996), describen a la FES como un método de cultivo de microorganismos sobre y/o dentro de partículas sólidas. El líquido ligado a las partículas debe ser en una cantidad que asegure la actividad de agua adecuada para el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos, pero sin exceder el máximo poder de retención de agua de matriz sólida

Viniegra (1997), define a la FES como un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles, haciendo énfasis en que esta definición abarca a procesos donde el soporte sólido es inerte y los sustratos que utilizan los microorganismos pueden ser sustancias solubles en agua.

Por su parte, Pandey *et al.* (2000), señala que frecuentemente se han usado los términos fermentación en estado sólido y fermentación en sustrato sólido ambiguamente, y que deben distinguirse. El término fermentación en sustrato sólido,

debe usarse solo en los procesos donde el sustrato actúe como fuente de carbono y energía en ausencia o casi en ausencia de agua libre, y la fermentación en estado sólido debe definir una fermentación que ocurra en ausencia o casi en ausencia de agua libre, empleando un sustrato natural como el caso anterior o usando un material inerte como soporte sólido.

La FES es uno de los métodos más prometedores para la producción de proteína no convencional, a partir de los residuos lignocelulósicos. Lo anterior, está determinado principalmente por los grandes volúmenes de estos residuos que se producen anualmente en el mundo, así como las ventajas que tiene el sistema de FES sobre las fermentaciones sumergidas convencionales (Brizuela *et al.*, 1998).

El bagazo de caña de azúcar (BCA) es uno de los mayores subproductos lignocelulósicos agroindustriales. Se compone aproximadamente de celulosa (50%), hemicelulosa (25%) y lignina (25%) (Soccol *et al.*, 2003), los cuales pueden ser utilizados para la producción microbiana de celulasas y xilanasas (Bhat, 2000).

II.14. LITERATURA CITADA.

- Aime, M.C. y Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot on cocoa (chocolate *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*. 97: 1012-1022.
- Barros, O. 1977. Investigaciones sobre el hongo *Monilia roleri* Cif y Par, causante de la pudrición acuosa de la mazorca del cacao: sus daños y su control. *El cacaotero Colombiano*. 3: 42-43.
- Bargaballo, R. N., Spagna, G., Palmeri, R., Restuccia, C. y Giudici, P. 2004. Selection, characterization and comparison of β -glucosidasa from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme Microb. Technol.* 35:58-66.
- Bataille, P. F y Toussaint, P. 1985. The effect of pretreatment on the enzymic hydrolysis of cellulosic industrial waste. *J. Chemical Technol. Biotechnol.* 35B: 205-215.
- Beauchemin, K. A., Yang, Z. W y Rode, M. L. 1998. Effects of fibrolytic enzyme additive on extent of digestion and milk production of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81 (Suppl. 1): 358.
- Belman, G., Voragen, A.G.J., Rombouts, F.M y Pilnik W. 1988. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biotechnol. Bioeng.* 31:173-178.
- Bhat, M. K. y Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 15: 583-601.
- Bose, K., y Das, D. 1996. Thermoestable alpha-amylase production using *Bacillus licheniformis*. NRRL B14368. *Indian J. Exp.* 34: 1279-1282.
- Buendía, R.G., Mendoza, M.G.D., Bárcena, G.J.R., Ortega, C. M.E., Hernández, S. J y Lara, B. A. 2003. Efecto de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* en la digestibilidad "in vitro" de maíz y sorgo. *Agrociencia* 37: 317- 322.
- Castro, G. R., Ferrero, M. A., Mendez, B. S y Sineriz, F. 1993b. Screening and selection of bacteria with amylolytic activity. *Acta Biotechnological* 13: 197-201.
- Castro, G. R., Méndez, B. S., y Sineriz, F. 1993a. Amylolytic enzymes produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. MIR-41 in batch and continuous culture. *J. Chem. Tech. Biotech.* 56: 289-294.
- Chauhan, A. S., Afroze, S. G., Ramesh, M. N. R., Avula, R. Y.M., Rekha, N., y Ramteke, R.S. 2004. Optimization of enzymatic liquefaction of papaya (*Carica*

papaya L.) and jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) pulp using response surface methodology. Food, Agric. Environ. 2: 108-113.

Christine, R.J.M.S., Marie-Jose, V., Ziya, G y Pierre, B. 1988. Purification, characterization, and substrate specificity of novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillusoryzae*. Appl. Environ. Microbiol. 64:3607-3614.

Chou, T. Y. C., Chang, M. M y Tsao, G. T. 1981. Structure, pre-treatment and hydrolysis of cellulose. Adv. Biochem. Eng. 20: 16-42.

Ciferri, R. y Parodi, E. 1933. Descrizione del fungo che causa la "moniliase" del cacao. Phytopathologische. Zeitschrift. 6: 539-542.

Das, K., Solehah, A., Balaumani, VT y Amiza, M.A. 1994. Enzymes for improved extraction y stabilization of colour and flavor of orange juice. J. Food Sci. Technol. 31:508-510.

Dawson, K. A y Tricarico, J. M. 1999. The exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the rumen and the performance of ruminant animals. En: Lyond TP, Jacques KA (eds) Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of the Fifteenth Annual Symposium. Nottingham University Press, Loughborough: 303-312.

Declerk, N., Machius, M., Chambert R., Wiegand, G., Huber, R y Gallardi, C. 1997. Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase: thermodynamic studies and structural interpretation. Protein Engineering 10: 541-549.

Delgado-Vargas, F y Paredes-López, O. 1997. Effects of enzymatic treatments on carotenoid extraction from marigold flowers (*Tagetes erecta*). Food Chemistry 58: 255-258.

Desroiser, R y Suarez, C. 1974. DeMoniliapod rot of cacao. Pp. 273-277. In Gregory P.H. (ed.) *Phytophthora* Diseases of Cocoa. Logman Group, London.

Dinnella, C., Lanzarini, GyMonteleone, E. 1998. Enzymatic carrot tissue maceration: optimization by response surface analysis. Sciences Des Aliments 18: 497-505.

Dobrevá, E., Ivanova, Vy Emanuilova, E. 1994. Effect of temperature on some characteristics of the thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. World J. Microb. Biotech. 10: 547-550.

Enríquez, G y Suárez, C. 1978. Monilia disease of cocoa in Costa Rica. Turrialba 28:339-340.

- Evans, H. C., Stalpers, J.A., Samson, R. A., y Benny, G. L. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Can. J. Bot.* 56: 2528-2532.
- Evans, H. C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. London, UK: Commonwealth Micrological Institute. *Phytopathological papers no. 24.* 44p.
- Evans, H. C. 1986. A reassessment of *Moniliophthora (Monilia)* pod rots of cocoa. *Cocoa Growers' Bulletin* 37: 34-43.
- Evans, H. C., Holmes, K.A y Phillips- Mora, W., Wilkinson, J. 2002. What's in a name: *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Mycologist.* 16 (Part 4), 148-152.
- Fan, L.T., Lee, Y.H y Gharpuray, M.M. 1982. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem Eng* 23:158-187.
- Feng, P., Hunt, C. W., Protchard, G T y Julien, W. E. 1996. Effect of enzyme preparations on "in situ" and "in vitro" degradation and "in vivo" digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 74: 1349-1357.
- Griffith, W. G., Nicholson, J., Nenninger, A., Birch N. R., y Hedger, J. 2003. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany* 41:423-435.
- Gutiérrez, C. L.C., Mendoza, M. G.D., Ricalde, R., Melgoza, L. M., y Plata, F. 2005a. Effects of exogenous amylases or glucoamylase dose on in situ ruminal digestion of corn and sorghum. *J. Appl. Anim. Res.* 27: 7-10.
- Gutiérrez, C.L.C., Mendoza, M. G.D., Pinos, R. J.M., Ricalde, R., Aranda, E., y Miranda, L. A. 2005b. Effects of storage time and processing temperature of grains with added amylolytic enzymes on in situ ruminal starch digestion. *J. Appl. Anim. Res.* 27: 39-44.
- Hahn-Hägerdal, B., y Palmqvist, E. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* 74: 25-33.
- Helbert, W., Schulein, M y Henrissat, B. 1996. Electron microscopic investigation of the diffusion of *Bacillus licheniformis* alpha-amylases into corn starch granules. *Intl. J. Biol. Macr.* 19: 165-169.
- Ingle M.R y Erickson, R. J. 1978. Bacterial alpha-amylases. *Adv. Appl. Microbiol.* 24: 257-278.

- Jeya, M., Joo, A. R., Lee, K. M., Sim, W.I., Oh, D.K., Kim, Y. S., Kim, I.W., Lee, J. K. 2010. Characterization of endo β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium pinophilum* KMJ601. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:1005-1014.
- Klibanov, A. M. 1983. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Adv. Appl. Microbiol.* 39: 1-28.
- Ladisch, M. R., Lin K. W., Voloch, M., y Tsao, G. T. 1983. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microb. Technol.* 5: 82-102.
- Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.* 56: 1-24.
- Ljungdahl, L. G y Eriksson, K. E. 1985. Ecology of microbial cellulose degradation. *Adv. Microbiol. Ecol.* 8: 237-299.
- López, G. M. A., y Enríquez, V. O. 1980. Presencia de *Monilia roleri* Cif. et Par. en el cacao, *Theobroma cacao* L. en la frontera de Costa Rica-Nicaragua. Managua, Nicaragua. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. 150 p.
- Marsden, W. L y Gray P. P. 1986. Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials. *Crit. Rev. Biotechnol.* 3: 235-274.
- McLaughlin, H. 1950. Observation on cacao in Peru. *Cacao Information Bulletin* 2:3-4.
- Meyer, A. S., Jepsen, S. M y Sorensen, N. S. 1998. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *J. Agric. Food Chemistry* 46: 2439-2446.
- Mora, J. G., Bárcena, G. J. R., Mendoza, R. G. D., González, M. S.S y Herrera, S. J.F. 2002. Respuesta productiva y fermentación ruminal en borregos alimentados con grano de sorgo tratado con amilasas. *Agrociencia* 36:31-92.
- Muller, A. 1941. El reconocimiento de las enfermedades de las plantas cultivadas de Venezuela. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales* 8:99-113.
- Navarrete-Bolaños J. L., Rangel-Cruz, C. L., Jiménez-Islas, H., Botello-Alvarez, Ey Rico-Martínez, R. 2005. Pretreatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane. *Food Research International* 38: 159-165.
- Orellana, R. G. 1956. La moniliasis y otras enfermedades del cacao en el este de Panamá. *Boletín Fitosanitario. FAO* 4:168-169.
- Ovando, C. H. S. L y Waliszewski, K. N. 2005. Preparativos de celulas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia.* 42:113-122

- Philippidis, G. P., y Smith, T. K. 1995. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52: 117- 124.
- Phillips-Mora, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.*, as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. PhD thesis. Department of Agricultural Botany, School of Plant Sciences. The University of Reading, RG6, UK. 349 p.
- Phillips-Mora, W. 2004. La moniliasis del cacao: una seria amenaza para el cacao en México. *In: Memoria del Simposio Nacional de Manejo Fitosanitario de Cultivos Tropicales*. Tabasco, México. 170 pp.
- Phillips-Mora, W., Coutiño, A., Ortiz C.F., López, A P., Hernández, Jy Aime, M. C. 2006a. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology* 55:584.
- Phillips-Mora, W y Wilkinson, M. J. 2007. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97:1644-1647.
- Phillips-Mora W., J. Cawich., W. Garnett., and M. Aime C. 2006b. First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. *Plant Pathology* 55:584.
- Phillips-Mora, W., Ortiz C. F., y Aime, M. C. 2007. Fifty years of frosty pod rot in Central America: Chronology of its spread and impact from Panama to Mexico. *Proceedings of the 15th International Cocoa Research Conference, Vol. I*, pp. 1039-1047.
- Pinos-Rodríguez, J. M., González, S.S., Mendoza, M. G.D., Bárcena, G. R y Cobos, P. M. 2002^a. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad in vitro de la pared celular del heno de alfalfa (*Medicago sativa*) o de ballico (*Lolium perenne*). *Interciencia*. 27: 28-32.
- Pinos-Rodríguez, J. M., González, S. S., Mendoza, G., Bárcena, R y Cobos, M. 2001. Efecto de enzimas fibrolíticas glucosiladas en la digestibilidad in vitro de MS y MO de alfalfa (*Medicago sativa*) y ballico (*Lolium perenne*). *Revista Científica, FCV-LUZ*. 11(6): 505-509.
- Pinos-Rodríguez, J. M y González, S. S. 2001. Uso de enzimas fibrolíticas glucosiladas en la alimentación de rumiantes. En: Gutiérrez ML, Hoyos LG (eds) *Biotecnología en la Industria de la Alimentación Animal*. Volumen VIII. Alltech, México. D.F: 57-73.

- Porras, V. H y González, L. C. 1984. Epifitología de la moniliasis del cacao (*Monilia roleri*) y su relación con el ciclo de producción en la zona de Matina, Costa Rica. *Fitopatología*. 19(2): 78-84.
- Porras, V. H y Enríquez, G. 1998. Spread of monilia pod rot of cocoa through Central America. IICA, San José, Costa Rica. 20 p.
- Rojo, R. R. 2005. Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 655-665.
- Rorer, J. B. 1918. Enfermedades y plagas del cacao en Ecuador y métodos modernos apropiados al cultivo del cacao. Guayaquil, Ecuador: Asociación de Agricultores, pp. 17-40.
- Ryu, D. D Y., y Mandels, M. 1980. Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 91- 102.
- Schingoethe, D. J., Stegeman, G. A y Treacher, R. J. 1999. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. *J. Dairy Sci.* 82: 996-1003.
- Shariati, P., Mitchell, W., Boyd, A y Priest, F. G. 1995. Anaerobic metabolism in *Bacillus licheniformis*. *Microbiol.* 141: 117-1124.
- Sreenath, H. K., Nanjundaswamy, N M y Sreekantiah, K. K. 1987. Effect of various cellulases and pectinases on viscosity reduction of mango pulp. *J. Food Sci.* 52: 230-321.
- Sreenath H., K., Sudarshana, K. R y Santhanam, K. 1995. Enzymatic liquefaction of some varieties of mango pulp. *J. Food Sci.* 28: 196-200.
- Suarez, C. 1971. Estudio del mecanismo de penetración y proceso de infección de *Monilia roleri* Cif y Par. en frutos de cacao (*Theobroma cacao L*). Tesis Ing. Agr. Universidad de Guayaquil, Ecuador. 59p.
- Titi, H. H. R., Richardson, C. R y Cobb, C. W. 1998. Effects of fibrolytic enzyme treatment on forage dry matter and organic matter disappearance. *J. Anim. Sci.* 76 (Suppl. 1): 293.
- Tricarico, J. M., Dawson K. A., y Newman, K. E. 1998. Effects of a microbial enzyme preparation (Fibrozyme) on ruminal digestion of fescue hay. *J. Anim. Sci.* 76 (Suppl. 1): 286.
- Vora, H. M., Kyle, W. S. A y Small, D. M. 1999. Effect of enzyme treatment of carrot pulp on juice yield and quality. *Food Australia* 51: 146-147.

Wood, G.A.R. y Lass; R.A.1985. Cocoa. 4^a ed. Cornwall, UK: Blackwell Science, 620 p.

Yang, W. Z., Rode,L. M y. Beauchemin,K. A. 1998. Effects of fibrolytic enzyme additives on milk production of dairy cows. J. Dairy Sci. 81 (Suppl. 1): 320.

CAPÍTULO III

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL HONGO FITOPATÓGENO *M. royeri*, MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN 18S ADNr Y LA REGIÓN ITS1-5.8S-ITS2

III.1. INTRODUCCIÓN

La identificación de microorganismos particularmente hongos, con base a las características morfológicas de los aislamientos en medio de cultivo y la tasa de crecimiento miceliar, es difícil de lograr, debido a que su aspecto morfológico puede variar incluso entre los aislados de una misma especie (Hughes *et al.*, 2000).

La identificación de hongos como las especies del género *Aspergillus*, con base en los métodos morfológicos, requiere de la adaptación del cultivo para la evaluación de las características microscópicas y morfología colonial. Por lo general, el cultivo de un hongo, requiere alrededor de 5 días o más, para la identificación de las formas anamórficas (Sampson, 1994).

Las características morfológicas y estructuras reproductivas empleadas en la identificación de hongos aislados, puede tomar desde días hasta semanas para lograr el desarrollo en cultivo, así mismo, la evaluación de estas características requiere experiencia en micología (Pfaller y Wenzel, 1992). Algunos métodos comerciales usados para la identificación de levaduras patógenas, son los sistemas API y VITEK. Son sistemas de identificación que asocia una galería bioquímica miniaturizada y una base de datos, estos sistemas incorporan reactivos disecados en cavidades plásticas dentro de las cuales se coloca una suspensión del organismo en estudio, con un inóculo abundante, dichos sistemas requieren de 2 a 3 días para que las reacciones químicas puedan ser interpretadas, además, las bases de datos para la interpretación de los resultados son muy costosas (Dooley *et al.*, 1994; Fenn *et al.*, 1994; Ramani *et al.*, 1998).

Las técnicas moleculares utilizadas para la amplificación de blancos de ADN proporcionan un método alternativo para el diagnóstico e identificación (Kurtzman y Robnett, 1997). La detección de secuencias de ADN de hongos basados en pruebas de PCR, puede ser rápido, sensible y específica (Makimura *et al.*, 1994). La región

codificante de los genes nucleares 18S, 5.8S y 28S rRNA, evolucionan lentamente y están relativamente conservados entre hongos, proporcionan una base molecular para establecer su relación filogenética (White *et al.*, 1990). Entre las regiones codificantes están las regiones espaciadoras internas transcritas 1 y 2 (ITS1 y ITS2 respectivamente) como se muestra en figura 4, los cuales evolucionan más rápidamente y por lo tanto, puede variar entre diferentes especies dentro de un género. Así la amplificación por PCR puede facilitar la identificación de la región ITS de la secuencia de ADN con suficiente polimorfismo para ser usado en la identificación de especies de hongos (White *et al.*, 1990).

Se ha descrito que los blancos moleculares para la detección de *Aspergillus* a nivel de género, pueden incluir el gen 18S rRNA, ADN mitocondrial, la región espaciadora intergénica y las regiones espaciadoras transcrita (ITS). Las regiones ITS están localizadas entre los genes 18S y 28S rRNA y ofrece distintas ventajas sobre otros blancos moleculares, incluyendo el incremento de la sensibilidad al doble, debido a la existencia de aproximadamente 100 copias por genoma. El gen rRNA del RNA 5.8S, separa las dos regiones ITS. La variación de la secuencia de la región ITS ha permitido su uso en estudios filogenéticos de muchos microorganismos diferentes (Guarro *et al.*, 1999; White *et al.*, 1990).

Otros métodos de biología molecular utilizados como herramienta principal para identificar especies de microorganismo son RAPD (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990), AFLP (Majer *et al.*, 1996), amplificación de la región ITS y digestión posterior con enzimas de restricción (Snyder y Jones, 1999; Förster y Adaskaveg, 2000) y otros tipos de marcadores moleculares.

Aime y Phillips-Mora(2005) mencionaron que la identificación de *M. roreri* se ha realizado mediante la amplificación por PCR de la secuencia del ITS, así como el gen 28S rRNA, empleando los iniciadores específicos ITS1-F/ITS4 y LSU4-B/LR6 respectivamente. Las secuencias obtenidas (Número de acceso del GenBank: DQ222923–26) fueron 100% homólogas a la de las cepas del hongo encontradas en diferentes partes de Centro América.

Por lo anterior, con la finalidad de realizar la identificación molecular de la cepa MRO1, aislada de mazorcas de cacao con signos y síntomas de moniliasis, el gen 18S rRNA y

la región ITS1-5.8S-ITS2 fueron amplificados, secuenciados y comparados con las secuencias registradas en el GenBank de la NCBI.

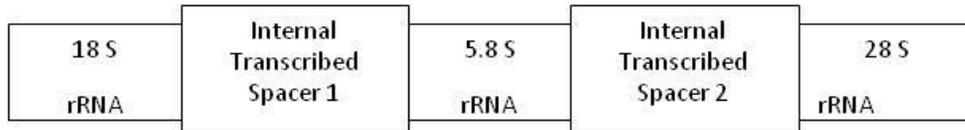


Figura 4: Estructura del ADNr nuclear de los organismos eucariontes. (González, 2008)

III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación, tiene como objetivo estudiar la producción de enzimas extracelulares de endo-1,3(4)- β -glucanasas y la amplificación de un fragmento de un gen responsable de esta actividad enzimática, a partir del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*. El trabajo fue realizado empleando la cepa MRO1 de *M. roreri*, misma que fue aislada a partir de mazorcas de cacao infectadas con el hongo. Previo al trabajo de investigación, la cepa MRO1 fue identificada mediante la amplificación y secuenciación del gen 18S RNAr (Número de acceso GenBank: JF730693) y el cassette ITS1-5.8S RNAr-ITS2 (Número de acceso GenBank: JF769489) y las secuencias fue publicadas en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (National Center for Biotechnology Information; NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

III.2.1. Aislamiento de *M. roreri*

El presente trabajo se desarrolló con la cepa MRO1 del hongo fitopatógeno *M. roreri*, aislada a partir de una mazorca de cacao infectada. La superficie de la mazorca que mostraron manchas necróticas, fueron esterilizadas con etanol y cortadas longitudinalmente cerca de la mancha necrótica. A partir de la parte interna del corte, se extrajeron pequeñas secciones de tejido. Los tejidos fueron sembrados en placas petri con medio de cultivo mineral mínimo. Las placas petri fueron incubadas durante 15 días a temperatura ambiente en un periodo de luz-obscuridad de 12 h cada uno.

III.2.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado para la conservación y purificación específica de cepas de *M. roreri* fue el medio mineral mínimo: reguladores de fosfatos ($1.54 \text{ g l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$,

0.26 gl^{-1} HPO_4), sales minerales y micro elementos (2.0 gl^{-1} NH_4NO_3 , 0.4 gl^{-1} Na_2SO_4 , 0.15 gl^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 gl^{-1} $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.02 gl^{-1} $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.02 gl^{-1} $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), solución de hierro (0.15 gl^{-1} $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$), solución de calcio (1.10 gl^{-1} CaCl_2), 30 gl^{-1} glucosa, 2 gl^{-1} extracto de levadura y 2 gl^{-1} peptona. El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 6.0 con HCl. Los medios sólidos fueron preparados agregando 1.8% de agar bacteriológico. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

III. 2.3 Extracción de ADN cromosómico

La cepa MRO1 de *M. roreri* se cultivó en medio mínimo mineral en cajas de petri, hasta alcanzar 8.5 cm de diámetro (15-21 días). A continuación, se preparó una suspensión de esporas, agregando 5 ml de medio mineral mínimo líquido a cada caja de petri, y removiendo cuidadosamente los conidios con un pincel. La suspensión fue transferida a un matraz de 150 ml con 50 ml de medio de cultivo y se incubó a temperatura ambiente, en un agitador orbital a 150 rpm durante 48 horas (Phillips-Mora, 2003).

Las células fueron cosechadas por filtración. La biomasa obtenida se homogeneizó con 10 ml de regulador de lisis (Tritón X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100mM, Tris 10mM (pH8.0) y EDTA 1mM), aplicando pulsos de 30,000 rpm durante 1 minuto de homogenización y 1 minuto en baño de hielo.

Posteriormente, la muestra (células homogenizadas) se distribuyó en microtubos de 1.7 ml, agregando volúmenes de 1 ml. Las células se sometieron a lisis mecánica, agregando 0.3 g de perlas de vidrio (Ballotini 0.5 μm diámetro) y 400 μl de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1). La muestra se agitó vigorosamente en vortex durante 20 minutos que comprendieron 20 ciclos con pulsos de 30 segundos en agitación y 30 segundos en baño de hielo. Se adicionaron 400 μl de regulador TE (Tris 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM) y se sometió a centrifugación. La fase acuosa se transfirió a otro tubo de 1.7 ml al que se le agregaron 200 μl de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1), nuevamente se agitó en vortex por 30 segundos y se centrifugó. El sobrenadante se recuperó y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto, enfriado a -20°C. La muestra se incubó a -20°C durante 2 h, se centrifugó y eliminó el etanol residual por evaporación a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en 400 μl de

regulador TE y se trató con 10 µg RNAsa (Gibco BRL), a partir de una solución patrón de 10 mg ml⁻¹ en Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5 y NaCl 0.015 M.

La mezcla se incubó a 37°C, durante 15 minutos, posteriormente, el ADN fue precipitado con 10 µL de acetato de amonio 4 M y dos volúmenes de etanol absoluto, a continuación se mezcló por inversión y se incubó a -20°C durante 2 h, el etanol absoluto se decantó y la pastilla de ADN se lavó con 500 µL de etanol al 75%. El ADN se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril e incubado a 50°C por 10 minutos.

Para evaluar la calidad, concentración y pureza del ADN, se determinó la absorbencia a 260 nm y considerando que 1U A₂₆₀ equivale a 50 µg mL⁻¹ de ADN de doble cadena. La calidad del ADN se determinó por la relación de absorbencias A₂₆₀/A₂₈₀. (Sambrook *et al.*, 1989).

III.2.4. Amplificación del gen 18S ADNr y la región ITS1-5.8S-ITS2 por PCR

La cepa aislada fue identificada mediante la amplificación y secuenciación del gen 18S ADNr y la región ITS1-5.8S-ITS2.

El gen 18SADNr se amplificó empleando los iniciadores universales LV1 (oligo sentido; diseñado a partir de la secuencia de la cadena 5'-3') y LV2 (oligo antisentido; diseñado a partir de la secuencia de la cadena 3'-5') descrito por Bautista-Muñoz *et al.* (2005):

LV-1: 5' CCT GCC AGT AGT CAT ATG CTT GTC T 3'

LV-2: 5' CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC GAC T 3'

El fragmento amplificado se envió a secuenciar con los iniciadores LV1, LV2, así como los iniciadores 246 Forward, 354 Forward, 750 Forward, 1160 Forward, 1559 Forward (García *et al.*, 2010), a partir de la secuencia del gen 18S ADNr de *M. roreri* (Número de acceso GenBank: AY916745) mostrado en cuadro 1.

Cuadro 1. Iniciadores empleados en las reacciones de secuenciación del gen 18S ADNr.

Nombre	Rango de secuencia	Posición	5'-Secuencia-3'	Tm(°C)	Longitud (pb)
Primer 246 Forward	201-400	246	TCGAATCGCATGGCCTTGT	65	19
Primer 354 Forward	401-800	354	AGGGTTTCGATTCCGGAGAG	61.513	19
Primer 750 Forward	801-1200	750	GTGTTCAAAGCAGGCCTATG	58.379	20
Primer 1160 Forward	1201-1600	1160	CCTGCGGCTTAATTTGACTC	59.845	20
Primer 1559 Forward	1601-1779	1559	CGAGGAATACCTAGTAAGCG	54.5	20

Por otro lado, la región ITS1-5.8S-ITS2 se amplificó empleando los iniciadores MITS1F (García *et al.*, 2010), a partir de la secuencia con número de acceso GenBank: GU108605 de *M. roleri* y pITS4 previamente descrito por White *et al.* (1990).

1. mITS1F 5'-TTTCCGTAGGTGAACCTGC-3'

2. pITS4 5'- GAATACCAGAGGCGCAAGG -3'

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 10 ng del ADN molde, en un volumen final de 25 μ L bajo la siguiente formulación: 16.3 μ L de agua grado PCR, regulador de reacción 1X, MgCl₂ 2mM, dNTPs 200 mM, iniciadores 0.4 mM y 1U de Taq ADN polimerasa. El ADN se amplificó en un termociclador Techgene[®] con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de una desnaturalización a 94°C por 1 minuto; alineamiento a 67°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 minuto; y una extensión final a 72°C por 5 minutos (Bautista-Muñoz *et al.*, 2005).

III.2.5. Electroforesis del ADN.

Los fragmentos de ADN amplificados fueron sometidos a electroforesis convencional en geles de agarosa, siguiendo el método descrito por Meyers *et al.* (1976). Se prepararon geles horizontales de agarosa al 1.3 % en regulador TAE 1X (Tris Base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM). El corrimiento electroforético se llevo a cabo a 80 V, durante 1.5 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 μ g mL⁻¹ en regulador TAE 1X, durante 15 min. Finalmente los geles se expusieron a luz UV en un transiluminador UV/Vis (MiniBis, Bio Imaging Systems), para visualizar los fragmentos de ADN amplificados. El tamaño de los fragmentos de ADN amplificados se calculó por comparación con un marcador de ADN de talla molecular (Invitrogen) y con la ayuda del software Gel quant Versión 2.7.

III.2.6. Purificación de los fragmentos de ADN amplificados

Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron empleando el kit QIAquick Gel Extraction de QUIAGEN (QUIAGEN Group, HmbH, Germany), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

III.2.7. Secuenciación del ADN purificado

El producto de PCR purificado se envió a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. Las secuencias de ADN fueron analizadas con el software BioEdit Sequence Alignment Editor, versión 7.0 y alineadas con las secuencias de genes homólogos depositadas en la base de datos de la NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov).

III.2.8. Alineamiento múltiple de secuencias de genes 18SADNr descritos en hongos

Las secuencias nucleotídicas codificantes de genes 18S ADNr y la región ITS1-18S ADNr-ITS2 de hongos descritas y depositadas en la base de datos de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se alinearon con la secuencia del gen 18S ADNr y la región ITS1-18S ADNr-ITS2, ambas amplificadas a partir de la cepa MRO1. Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas se realizaron con el programa CLUSTAL X versión 1.8 (Thompson *et al.*, 1997). La edición de los alineamientos se realizó con el programa GeneDoc versión 2.3 (Nicholas *et al.*, 1997).

III.2.9. Relaciones de similitud entre las secuencias de genes 18S ADNr y la región ITS1-18S ADNr-ITS2 de la cepa MRO1 de *M. royeri* y de otros hongos descritos

Se efectuaron cinco alineamientos múltiples consecutivos y el último alineamiento se usó para establecer un filograma con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) utilizando el método de agrupamiento de Neighbor-joining con el índice Poisson (P). Para valorar estadísticamente la significancia de las relaciones presentadas en el filograma, se hicieron 1000 aleatorizaciones tipo "bootstrap".

III.3. RESULTADOS

III.3.1. Identificación molecular de la cepa MRO1

III.3.1.1. Amplificación y secuenciación nucleotídica del gen 18SADNr

Los iniciadores LV1 y LV2 específicos, se diseñaron para amplificar el gen 18S del ADNr de hongos (Bautista-Muñoz *et al.*, 2005). Dichos iniciadores permitieron la amplificación de un fragmento cuya secuencia contiene 1768 pb (Figura 5) a partir del ADN de la cepa MRO1 aislada. La secuencia se registro en la base de datos GenBank y está disponible con el número de acceso JF730693 (Figura 6, anexo 1).

El análisis Blast (Basic Local Alignment Search Tool) realizado en el servidor de la NCBI, indicó que la secuencia parcial del gen 18S ADNr amplificada a partir del ADN de la cepa MRO1 corresponde a la del hongo *Moniliophthora roreri* con un 99% de identidad máxima con respecto a la secuencia AY916745 depositada en la base de datos GenBank de la NCBI.

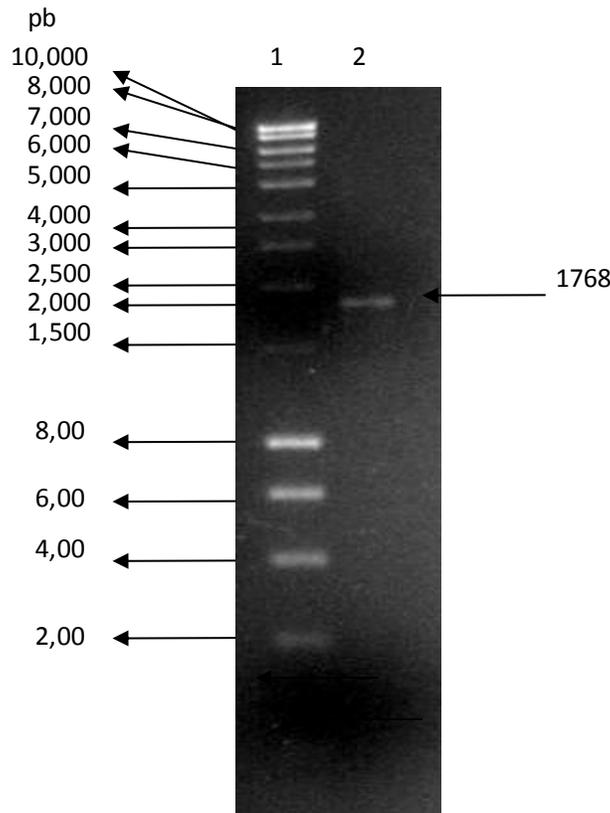


Figura 5. Amplificación por PCR del gen18S ADNr de la cepa MRO1 de *M. roreri*, aislada de mazorcas infectadas. 1. Marcador de talla molecular de ADN de 1 kb, 2. Fragmento de PCR.

```

1      AGTAGTCATA TGCTTGTCTC AAAGATTAAG CCATGCATGT CTAAGTATAA ACAAGTTTGT
61     ACTGTGAAAC TGCGAATGGC TCATTAATC AGTTATAGTT TATTTGATGA TACCTTGCTA
121    CATGGATAAC TGTGGTAATT CTAGAGCTAA TACATGCATT AAAGCCCCGA CTTCTGGGAG
181    GGGTGTATTT ATTAGATAAA AAACCAACGC GGCTCGCCGC TCACTTGGTG ATTCATAATA
241    ACTTCTCGAA TCGCATGGCC TTGTGCCGGC GATGCTTCAT TCAAATATCT GCCCTATCAA
301    CTTTTCGATGG TAGGATAGAG GCCTACCATG GTTTCAACGG GTAACGGGGA ATAAGGGTTC
361    GATTCCGGAG AGGGAGCCTG AGAAACGGCT ACCACATCCA AGGAAGGCAG CAGGCGCGCA
421    AATTACCCAA TCCCCACACG GGGAGGTAGT GACAATAAAT AACAATATAG GGCTCTTTTG
481    GGTCTTATAA TTGGAATGAG TACAATTTAA ATCCCTTAAC GAGGAACAAT TGGAGGGCAA
541    GTCTGGTGCC AGCAGCCGCG GTAATTCCAG CTCCAATAGC GTATATTTAA GTTGTTCAG
601    TTATAAAGGT CGTAGTTGAA CTTCAGGCCT GGTTGGGCGG TCCGCTTAAC GGCGTGTACT
661    GTCTGACTGG GTCTTACCTC TTGGTGAGCC GGCTGCCCCT TTATTGGTGT GCGTCGGGGA
721    ACCAGGACTT TTACCTTGAG AAAATTAGAG TGTTCAAAGC AGGCCTATGC CTGAATACAT
781    TAGCATGGAA TAATAGAATA GGACGTGCGG TTCTATTTTG TTGGTTTCTA GAGTCGCCGT
841    AATGATTAAT AGGGATAGTT GGGGGCATTG GTATTGAGTC GCTAGAGGTG AAATTCTTGG
901    ATTGACTCAA GACCAACTAC TGCGAAAGCA TTTGCCAAGG ATGTTTTTCAT TAATCAAGAA
961    CGAAGGTTAG GGGATCGAAA ACGATCAGAT ACCGTTGTAG TCTTAACAGT AAATATGCC
1021   GACTAGGGAT CGGACGACCT CAATTTTGAT GCGTCGTTTCG GCACCTTACG AGAAATCAAA
1081   GTCTTTGGGT TCTGGGGGGA GTATGGTCGC AAGGCTGAAA CTTAAAGGAA TTGACGGAAG
1141   GGCACCACCA GGTGTGGAGC CTGCGGCTTA ATTTGACTCA ACACGGGGAA ACTCACCAGG
1201   TCCAGACATA ACTAGGATTG ACAGATTGAT AGCTCTTTCA TGATTTTATG GGTGGTGGTG
1261   CATGGCCGTT CTTAGTTGGT GGAGTGATTT GTCTGGTTAA TTCCGATAAC GAACGAGACC
1321   TTAACCTGCT AAATAGACAG GCCGACTTTG GTTGGCCTCC GTCTTCTTAG AGGGACTGTC
1381   AGCGTCTAGC TGACGGAAGT TTGAGGCAAT AACAGGTCTG TGATGCCCTT AGATGTTCTG
1441   GGCCGCACGC GCGCTACACT GACAGAGCCA GCGAGTGTC ACCTTGGCCG AAAGGTCTGG
1501   GTAATCTTGT GAAACTCTGT CGTGCTGGGG ATAGAGCATT GCAATTATTG CTCTTCAACG
1561   AGGAATACCT AGTAAGCGCA AGTCATCAGC TTGCGTTGAT TACGTCCCTG CCCTTTGTAC
1621   ACACCGCCCG TCGCTACTAC CGATTGAATG GCTTAGTGAG GTCTCCGGAT TGGCTTCGGG
1681   GAGCCGGCAA CGGCACCTG TCGCTGAGAA GTTGATCAAA CTTGGTCATT TAGAGGAAGT
1741   AAAAGTCGTA ACAAGGTTTC CGTAGGTG

```

Figura 6. Secuencia nucleotídica parcial de 1768 pb del gen 18S ADNr de la cepa MRO1 de *M. royeri* (Número de acceso GenBank: JF730693), aislada de mazorcas de cacao infectadas. La numeración del lado izquierdo indica el número de bases nucleotídicas.

La región ITS1-5.8S-ITS2 se amplificó utilizando los oligonucleótidos iniciadores mITS1F y pITS4R, obteniendo un fragmento amplificado cuya secuencia contiene 758 pb (Figura 7). La secuencia se registró en la base de datos GenBank de la NCBI y está disponible con el número de acceso JF769489 (Figura 8, anexo 2).

El análisis Blast (Basic Local Alignment Search Tool) realizado en el servidor de la NCBI, indicó que la secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 amplificada a partir del DNA de la cepa MRO1, corresponde a la del hongo *Moniliophthora roreri* con un 100% de identidad máxima con respecto a la secuencia GU457437 depositada en la base de datos GenBank de la NCBI.

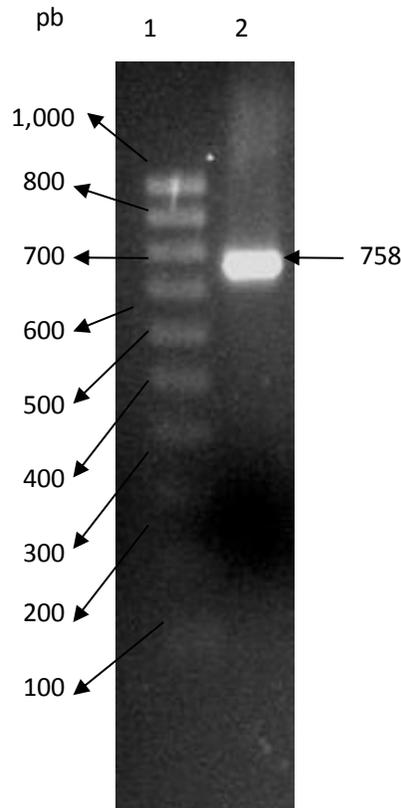


Figura 7. Amplificación por PCR de la secuencia parcial del gen 18S ADNr; espaciador transcrito interno 1, gen 5.8S ADNr, espaciador transcrito interno 2; secuencia parcial del gen 28S ADNr de la cepa MRO1 de *M. roreri*, aislada de mazorcas infectadas. 1. Marcador de talla molecular de ADN de 100 pb, 2. Fragmento de PCR.

```

1      TTTCCGTAGG TGAACCTGCG GAAGGATCAT TATTGAAAAC ATTGTAAAGG AGGTTTTGAG
61     CTGGCTCTTC TTAGGGGCAT GTGCTCGCCG ACTTTCAATC TTCATCCACC TGTGAACCTT
121    TTGTAGTGGA TTCTGGAACG GGAGGCGCTT GCGTTTTTCTC AGTACGGAGT CTCACTATGT
181    TTTAACACAC ACTTAATGTA TGTTTAGAAT GTGTATTTTA TTGGGACTTA ATTGACCCTT
241    TAAAACTAT  ACAACTTTCA GCAACGGATC TCTTGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGCAG
301    CGAAATGCGA TAAGTAATGT GAATTGCAGA ATTCAGTGAA TCATCGAATC TTTGAACGCA
361    CCTTGCGCCT CTTGGTATTC CGAGAGGCAT GCCTGTTTGA GTGTCATTAA ATTCTCAACC
421    TCAAAAAGCT TTTTCGGCTT TGTTGAGGA TTGGATGTGA GGGTTGCTGG CTTTTTGAAT
481    AAAGAGTCGG CTCCTTGAA ATGCATTAGT GGAAACCGGT TGGTAGACCA CATTGGTGTG
541    ATAATTATCT ATGCCATTAG TCTACGTTTT TTCGAATGTT GGCCTAGCTA ACACTTCGGT
601    TTGGGGGGGC TTGCAAGTTT GTAATGAACC TGCTCTCTCT GTTATTGAAC GGTATCTGCT
661    TCAAACGTGC CTAAGTTTAT TGGACAACAA TTAGATCATT TTGACCTCAA ATCAGGTAGA
721    ACTACCCGCT GAAATTAAGC ATATCAATAA GCGGAGGA

```

Figura 8. Secuencia nucleotídica de 758 pares de bases que contiene la secuencia parcial del gen 18S ADNr; espaciador transcrito interno 1, gen 5.8S ADNr, espaciador transcrito interno 2; secuencia parcial del gen 28S ADNr de la cepa MRO1 de *M. roreri* (Número de acceso GenBank: JF769489), aislada de mazorcas de cacao infectadas. La numeración del lado izquierdo indica el número de bases nucleotídicas.

III.3.1.2. Relaciones de homología entre secuencias de genes 18S ADNr y la región ITS1-5.8S-ITS2 de la cepa MRO1 de *M. roreri* y de otros hongos previamente descritos

El filograma (Figura 9), muestra las relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del fragmento del gen 18S ADNr amplificado a partir del ADN de la cepa MRO1, aislada de mazorcas de cacao, con las secuencias nucleotídicas de genes 18S ADNr de hongos reportadas en GenBank de la NCBI y cuyo porcentaje máximo de identidad compartido fluctúa entre el 97 al 99% (cuadro 2): *Moniliophthora roreri* strain C21 (Número de acceso AY916745), *Moniliophthora* sp. MCA2500 (Número de acceso AY916753), *Moniliophthora perniciosa* strain DIS71 (Número de acceso AY916739), *Crinipellis zonata* strain OKM25450 (Número de acceso AY916691), *Marasmius* sp. MCA1708 (Número de acceso AY916719), *Chaetocalathus liliputianus* (Número de acceso AY916681), *Marasmius oreades* isolate AFTOL-ID1559 (Número de acceso DQ457644), *Marasmius* sp. MCA1506 (AY916732), *Marasmius rotula* isolate AFTOL-ID 1505 (Número de acceso DQ113912), *Marasmius* sp. MCA1577 (Número de acceso

AY916710), *Crinipellis* sp. VPI4021 (Número de acceso AY916697, *Gymnopus contrarius* isolate AFTOL-ID 1758 (Número de acceso DQ440643), *Marasmius* sp. MCA1611 (Número de acceso AY916724), *Tricholomataceae* sp. ATCC28344 (Número de acceso AY445117), *Anthracophyllum archeri* voucher WTU: PBM 2201 (Número de acceso NG013183), *Omphalotus olearius* isolate AFTOL-ID 1718 (Número de acceso DQ459374), *Marasmius alliaceus* voucher TENN: 55620 (Número de acceso NG013179), *Agaricales* sp. 3034 (Número de acceso AY445116), *Chaetocalathus cf. columellifer* MCA2538 (Número de acceso AY916685), *Campanella* sp. MCA1689 (Número de acceso AY916669), *Coprinus comatus* voucher UC<USA-CA>ECV 3198 (Número de acceso NG016488).

El filograma (Figura 10), muestra las relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del fragmento del gen 18S ADNr; espaciador transcrito interno 1, gen 5.8S ADNr, espaciador transcrito interno 2; secuencia parcial del gen 28S ADNr amplificado a partir del ADN de la cepa MRO1, aislada de mazorcas de cacao, con las secuencias nucleotídicas de genes 18S ADNr de hongos reportadas en GenBank de la NCBI y cuyo porcentaje máximo de identidad compartido fluctúa entre el 88 al 100% (Cuadro 3): *Moniliophthora roreri* (Numero de acceso JF769489), *Moniliophthora roreri* (Numero de acceso AY194150), *Crinipellis roreri* var. Gileri (Numero de acceso AY230255), *Crinipellis roreri* var. roreri (Numero de acceso AY230254), *Moniliophthora roreri* strain MCA2954 (Numero de acceso DQ222927), *Moniliophthora roreri* strain MCA2953 (Numero de acceso DQ222925), *Moniliophthora roreri* strain Mg_florum (Numero de acceso EU047937), *Moniliophthora roreri* strain MCA2952 (Numero de acceso DQ222923), *Moniliophthora roreri* isolate magdiel (Numero de acceso GU108605), *Moniliophthora roreri* strain HT-ITV01 (Numero de acceso HQ231236), *Moniliophthora roreri* isolate GU1 (Numero de acceso GU457436), *Moniliophthora roreri* strain C21 (Numero de acceso AY916746), *Moniliophthora roreri* isolate (Numero de acceso GU457438), *Moniliophthora roreri* isolate GU4 (Numero de acceso GU457437), *Moniliophthora* sp. (Numero de acceso FJ167668), *Crinipellis pernicioso* (Numero de acceso AY216469), *Crinipellis pernicioso* (Numero de acceso AY216468), *Crinipellis pernicioso* (Numero de acceso AY216470)

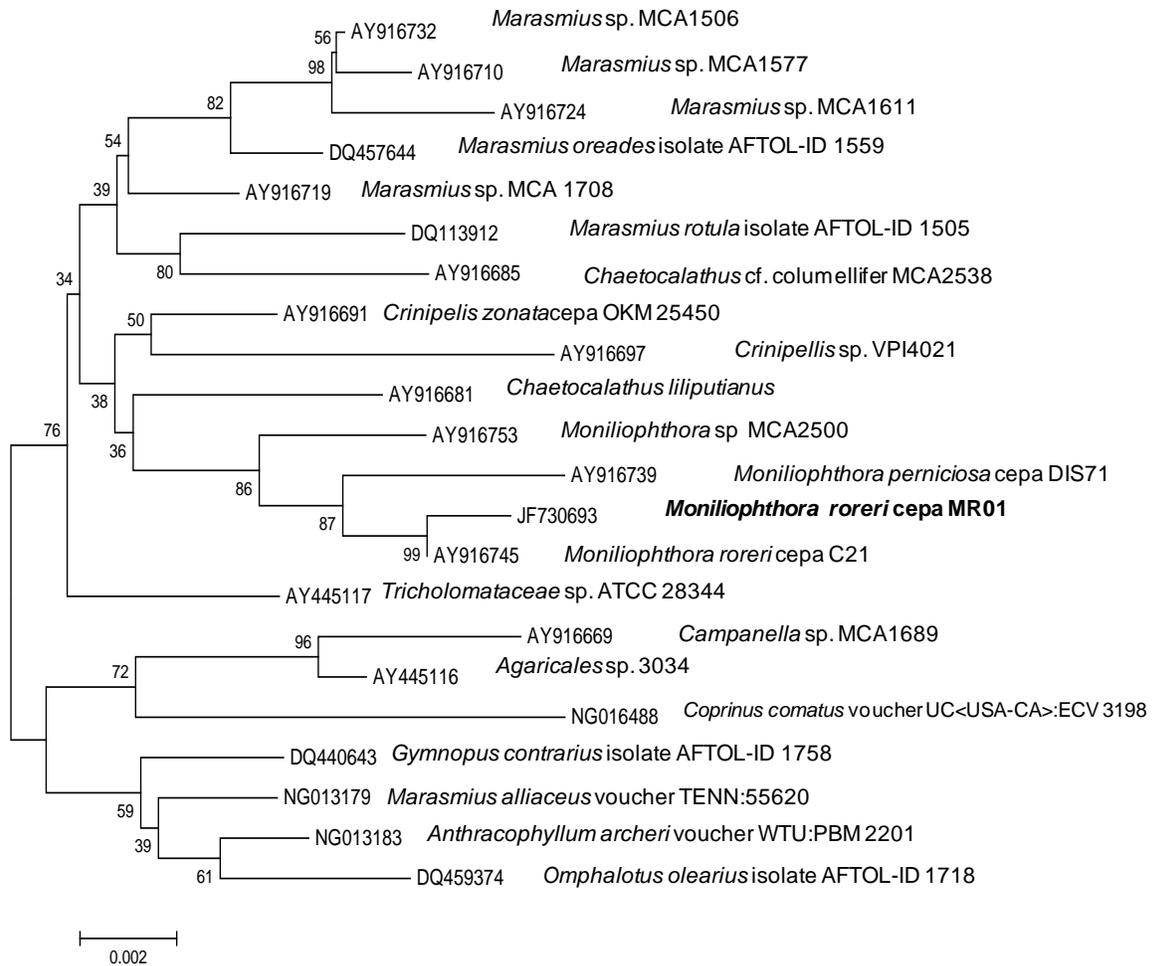


Figura 9. Relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del gen 18S ADNr de la cepa MR01 aislada de frutos de cacao y las secuencias nucleotídicas de los genes 18S ADNr de otros hongos relacionados. La comparación filogenética se basó en el análisis de 1740 posiciones nucleotídicas por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P), el método de agrupamiento fue Neighborn-joining. La significancia de las relaciones se realizó mediante 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos. El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje.

Cuadro 2. Porcentaje de identidad de la secuencia del gen 18S ADNr (Número de acceso GenBank JF730693) de la cepa MRO1 con las secuencias de referencia de los parientes más próximos.

Secuencia a comparar	Número de acceso GenBank	Bases idénticas/ total de bases comparadas	Porcentaje máximo de Identidad	Parientes más próximos
18S ADNr	AY916745	1764/1767	99	<i>Moniliophthora roreri</i> cepa C21
	AY916753	1753/1767	99	<i>Moniliophthora</i> sp MCA2500
	AY916739	1741/1755	99	<i>Moniliophthora perniciosa</i> cepa DIS71
	AY916691	1747/1767	98	<i>Crinipelis zonata</i> cepa OKM 25450
	AY916719	1747/1768	98	<i>Marasmius</i> sp. MCA 1708
	AY916681	1747/1769	98	<i>Chaetocalathus liliputianus</i>
	DQ547644	1744/1768	98	<i>Marasmius oreades</i> isolate AFTOL-ID 1559
	AY916732	1743/1768	98	<i>Marasmius</i> sp. MCA1506
	DQ113912	1742/1768	98	<i>Marasmius rotula</i> isolate AFTOL-ID 1505
	AY916710	1740/1768	98	<i>Marasmius</i> sp. MCA1577
	AY916697	1740/1768	98	<i>Crinipellis</i> sp. VPI4021
	DQ440643	1740/1769	98	<i>Gymnopus contrarius</i> isolate AFTOL-ID 1758
	AY916724	1739/1768	98	<i>Marasmius</i> sp. MCA1611
	AY445117	1726/1749	98	<i>Tricholomataceae</i> sp. ATCC 28344
	NG013183	1739/1769	98	<i>Anthracophyllum archeri</i> voucher WTU:PBM 2201
	DQ459374	1736/1769	98	<i>Omphalotus olearius</i> isolate AFTOL-ID 1718
	NG013179	1732/1764	98	<i>Marasmius alliaceus</i> voucher TENN:55620
	AY445116	1723/1750	98	<i>Agaricales</i> sp. 3034
	AY916685	1726/1755	98	<i>Chaetocalathus</i> cf. <i>columellifer</i> MCA2538
	AY916669	1735/1769	98	<i>Campanella</i> sp. MCA1689
NG016488	1729/1768	97	<i>Coprinus comatus</i> voucher UC<USA-CA>:ECV 3198	



Figura 10. Relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas de la región que comprende al gen 18S ADNr; espaciador transcrito interno 1, gen 5.8S ADNr, espaciador transcrito interno 2; secuencia parcial del gen 28S ADNr de la cepa MRO1 de *M. roreri*, aislada de frutos de cacao y las secuencias nucleotídicas de la región espaciador transcrito interno 1, gen 5.8S ADNr, espaciador transcrito interno 2; secuencia parcial del gen 28S genes 18S ADNr de otros hongos relacionados. La comparación filogenética se basó en el análisis de 660 posiciones nucleotídicas por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P), el método de agrupamiento fue Neighbor-joining. La significancia de las relaciones se realizó mediante 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap con 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap, por medio de métodos de distancia y usando el índice P (Poisson) y el método de agrupamiento de Neighbor-joining. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos. El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje.

Cuadro 3. Porcentaje de identidad de la secuencia de la región espaciador transcrito interno 1, gen 5.8S ADNr, espaciador transcrito interno 2; secuencia parcial del gen 28S ADNr del gen 18S ADNr (Número de acceso GenBank JF769489) de la cepa MRO1 con las secuencias de referencia de los parientes más próximos.

Secuencia a comparar	Número de acceso GenBank	Bases idénticas/ total de bases comparadas	Porcentaje máximo de Identidad	Parientes más próximos
ITS1-5.8S-ITS2	AY194150	756/758	99	<i>Moniliophthora roreri</i>
	AY230255	755/759	99	<i>Crinipellis roreri</i> var. <i>gileri</i>
	AY230254	752/760	98	<i>Crinipellis roreri</i> var. <i>roreri</i>
	DQ222927	737/739	99	<i>Moniliophthora roreri</i> strain MCA2954
	DQ222925	737/739	99	<i>Moniliophthora roreri</i> strain MCA2953
	EU047937	744/750	99	<i>Moniliophthora roreri</i> strain Mg_florum
	DQ222923	723/725	99	<i>Moniliophthora roreri</i> strain MCA2952
	GU108605	719/720	99	<i>Moniliophthora roreri</i> isolate magdiel
	HQ231236	727/734	99	<i>Moniliophthora roreri</i> strain HT-ITV01
	GU457436	680/680	100	<i>Moniliophthora roreri</i> isolate GU1
	AY916746	674/674	100	<i>Moniliophthora roreri</i> strain C21
	GU457438	667/667	100	<i>Moniliophthora roreri</i> isolate ES3
	GU457437	647/647	100	<i>Moniliophthora roreri</i> isolate GU4
	FJ167668	665/735	90	<i>Moniliophthora</i> sp.
	AY216469	692/783	88	<i>Crinipellis perniciosa</i>
	AY216468	692/783	88	<i>Crinipellis perniciosa</i>
	AY216470	690/784	88	<i>Crinipellis perniciosa</i>

III.4. DISCUSIÓN

Los fragmentos de la secuencia de 1768 pb y 758 pb del gen 18S ADNr y la región ITS1-5.8S-ITS2 respectivamente, obtenidas de la cepa MRO1 del hongo aislado a partir de mazorcas de cacao con signos de moniliasis, pertenece al género y especie *Moniliophthora roreri*. Lo anterior, se confirmó por el porcentaje de identidad máxima obtenido mediante el análisis BLAST realizado en la base de datos GenBank de la NCBI, los cuales fueron de 99 y 100% para el gen 18S ADNr y la región ITS1-5.8S-ITS2, respectivamente. De igual forma, el análisis filogenético mostró las relaciones de similitud de las secuencias nucleotídicas del fragmento del gen 18S ADNr y la región ITS1-5.8S-ITS2 de la cepa MRO1 con los parientes más cercanos, indicando que la cepa MRO1 se agrupa con las diferentes cepas de *M. roreri* cuyas secuencias han sido reportadas en la base de datos del GenBank. Los resultados obtenidos, demuestran que ambos marcadores moleculares son eficientes y eficaces para la identificación molecular de cepas del hongo *M. roreri*.

Las secuencias que codifican el ARN ribosomal (ADNr) se han utilizado para el estudio de las relaciones filogenéticas y taxonómicas en hongos (Bruns *et al.*, 1991). Los genes ribosomales están localizados en las mitocondrias y en el núcleo, y contienen numerosas regiones con secuencias altamente conservadas y otras con gran variabilidad (White *et al.*, 1990). El ADNr nuclear usualmente existe en los hongos como elementos en bloques repetidos, cada unidad está formada por un sistema complejo de secuencias que incluye los genes 18S, 28S y 5.8S, y se encuentran separados por dos espaciadores internos que se transcriben, llamados ITS1 e ITS2, de una longitud entre 200 y 400 pb. Hay además, un espaciador interno que no se transcribe, llamado IGS. Los módulos repetidos del ADNr nuclear pueden encontrarse en uno o varios cromosomas, y el número varía de acuerdo con el genoma. Pueden encontrarse desde 60 copias en el género *Coprinus* hasta 200 en el género *Neurospora*. En algunos casos, existe la subunidad 5S que puede estar localizada dentro de la unidad ribosomal o en otra región del genoma (Iturralde *et al.*, 2002).

White *et al.* (1990), diseñaron y describieron oligonucleótidos iniciadores específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del ADNr mitocondrial y nuclear en hongos, determinando la posibilidad de realizar estudios filogenéticos con el uso de los

genes 28S, 18S y 5.8S. Lo anterior, también obedece a que dichos genes están altamente conservadas y evolucionan lentamente, por lo que se utilizan para obtener información sobre las relaciones filogenéticas. Las zonas no codificantes (ITS1, ITS2 e IGS) son más variables porque acumulan mayor número de mutaciones y tienen gran interés en la identificación y tipificación de especies fúngicas. Rodríguez *et al.* (2004), afirman que la variabilidad en la secuenciación observada en las dos regiones ITS de los genes ribosomales que separan la subunidad ribosomal pequeña 5.8S de la subunidad ribosomal grande 28S, han sido determinante para distinguir a un hongo Ectomicorrízico de otro.

Muchos de los métodos de detección de microorganismos fitopatógenos están basados en la región ITS (Martin y Tooley, 2003; Martin *et al.*, 2004; Hayden *et al.*, 2004; Tomlinson *et al.*, 2005;). Hong *et al.* (1999) diseñaron oligonucleótidos iniciadores a partir de la región ITS de los genes ADNr para la detección del complejo *Phytophthora cryptogea-Phytophthora drechsleri* en plantas, usando una prueba de PCR convencional. Recientemente Jeya *et al.* (2010), aisló una nueva cepa de hongo productora de endo- β -1,4-glucanasa, misma que fue identificada como *Penicillium pinophilum* KMJ601 con base en la morfología colonial, la región ITS y los genes ADNr. En resumen, diferentes autores, han descrito que los genes ADNr y las regiones ITS es blanco molecular atractivo para diseñar oligonucleótidos iniciadores específicos debido a que son altamente estables, pueden ser amplificados con oligonucleótidos iniciadores universales y están presentes en múltiples copias y contienen tanto secuencias variables como conservadas (White *et al.*, 1990).

III.5. CONCLUSIÓN

La cepa MRO1 aislada de mazorcas de cacao, fue identificada como *Moniliophthora roreri* con base en morfología colonial (datos no mostrados), la secuencia de ADN del gen 18S ADNr, así como la secuencia parcial del gen 18S ADNr, espaciador transcrito interno 1, gen 5.8S ADNr, espaciador transcrito interno 2, secuencia parcial 28S, con un porcentaje de identidad máxima de 99 y 100% respectivamente, con respecto a las cepas *M. roreri* previamente descritas.

III.6. LITERATURA CITADA

- Aime, M.C., Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cocoa (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*. 97: 1012-1022.
- Bautista-Muñoz, C., Hernández-Rodríguez, C y Villa-Tanaca, L. 2005. Analysis and expression of *STE13ca* gene encoding a putative X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Candida albicans*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 45:459-469.
- Bruns, T. D., White, T. J y Taylor, J. W. 1991. Fungal Molecular Systematics *Annual Review of Ecology and Systematics* 22:525-564, EE.UU.
- Dooley, D. P., Beckius, M. L y Jeffrey, B. S. 1994. Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek Yeast Biochemical Card. *J. Clin. Microbiol.* 32:2889-2892.
- Fenn, J.P., Segal, H., Barland, B., Denton, D., Whisenant, J., Chun, H., Christofferson, K., Hamilton, L y Carroll K. 1994. Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems *J. Clin. Microbiol.* 32:1184-1187.
- Forster, H y Adaskaveg. 2000. Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*- Specific DNA primers. *Phytopathology* 90:171-178.
- García, A. I., Bautista, M. C. C y Velasco, B. A. 2010. Diseños de iniciadores para la amplificación y secuenciación del gen 18S DNAr y la región ITS1-5.8S-ITS2 DNAr de hongos. Diseño de iniciadores para la amplificación y secuenciación del gen 18S DNAr de *Moniliophthora roreri*. Pp 55-62.
- Guarro, J., Gene J., Stchigel, A. M. 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:454-500.
- Hayden, K. J., Rizzo, D., Tse, J y Garbelotto, M. 2004. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a real time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*. 94:1075–1083.
- Hong, S.B., Park, I. C., Go, S. J y Ryu, J. C. 1999. Detection of genus *Phytophthora* and *Phytophthora cryptogea*-*P. drechsleri* complex group using polymerase chain reaction with specific primers. *J. plant pathology*. 15:287-284.
- Hughes, K. J. D., Fulton, C. E., McReynold, D y Lane, C. R. 2000. Development of new PCR primers for identification of *Monilia* species. *Bull. OEPP/EPPO* 30:507-511.

- Iturralde, M. J., Ballesteros, S., Ramón, F. 2002. Retos en el diagnóstico de las intoxicaciones por setas. Simposio de Toxicología en homenaje a Manuel Repetto, Sesión IV, *Rev. Toxicol.* 19:97-144.
- Jeya, M., Joo, A-R., Lee, K-M., Sin, W-I., Oh, D-K., Kim, Y-S., Kim, I-W y Lee, J-K. 2010. Characterization of endo- β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium pinophilum* KMJ601 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:1005–1014.
- Kurtzman, C.P y Robnett, C.J. 1997. Identification of clinically important Ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35:1216-1223.
- Majers, D., Mithen, R., Lewis, B G., Vos, P y Oliver, R. P. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res.* 100:1107-1111.
- Martin, F. N y Tooley, P. W. 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia.* 95:269–284.
- Martin, F. N., Tooley, P. W y Blomquist, C. 2004. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. *Phytopathology.* 94:621–631.
- Makimura, K., Murayama, S. y Yamaguchi, H. 1994. Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* 40:358-364.
- Meyers, J. A., D. Sanchez, L. P. Elwell, y Falkow, S. 1976. Simple agarose gelelectroforetic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127:1529-1537.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B., Derfield, D. W. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW NEWS.* 4:14.
- Phillips-Mora, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.)
- Pfaller, M., Wenzel, R. 1992. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:287-291.
- Ramani, R., Gromadzki, S., Pincus, D H., Salkin, I F y Chaturvedi, V. 1998. Efficacy of API 20C and ID 32 C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36:3396-3398.

- Rodríguez, T.A., Xoconostle-Casarez, B y Valdés, M. 2004. Ecología molecular de los hongos. Rev. Fitotec. Mex. 267:278.
- Sambrook, J., Fritsch, E. Fy Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory press. 2a Edición. New York N. Y.
- Sampson, R. A. 1994. Current systematic of the genus *Aspergillus* p 261-276. In K.A. Powell. A. Renwick and J. F. Peberdy (ed). The genus *Aspergillus* From taxonomy and genetics to industrial application. Plenum Press. New York, N.Y.
- Snyder, C. L y Jones, A. L. 1999. Genetic variation between strain of *Monilinia fruticola* and *Monilinia laxa* isolated from cherries in Michigan. Can. J. Plant Pathol. 21:70-77.
- Tamura K., Dudley, J., Nei, M., y Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution.
- 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 Res. 24:4876-4882.
- Tomlinson, J. A., Boonham, N., Hughes, K. J. D., Griffin, R. L y Barker I. 2005. On-site DNA extraction and real time PCR for detection of *Phytophthora ramorum* in the field. Applied and Environmental Microbiology. 71:6702-6710.
- Welsh, J y McClelland M. 1990. Fingers-priming genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, San Diego. Academic Press, EE.UU. pp. 315-322.

CAPÍTULO IV

AMPLIFICACION Y SECUENCIACION DE GENES CODIFICANTES DE ENZIMAS EXTRACELULARES ENDO-1,3 (4)- β -GLUCANASA A PARTIR DE *Moniliophthora roreri*

IV.1. INTRODUCCION

Las glucanasas son enzimas que degradan β -glucanos y se clasifican en dos grandes grupos según los mecanismos que utilizan para hidrolizar el sustrato, siendo identificados por los productos de hidrólisis: (i) Exo- β -glucanasas, las cuales hidrolizan el sustrato por ruptura secuencial de residuos de glucosa desde el extremo no reductor, y (ii) las endo- β -glucanasas, que rompen aleatoriamente los sitios de enlace β de la cadena polisacáridica, liberando pequeños oligosacáridos. La degradación de los β -glucanos por los hongos se acompaña frecuentemente de la acción sinérgica de la endo- y exo- β -glucanasas (Pitson *et al.*, 1993).

La degradación de la hemicelulosa, celulosa, pectina y la depolimeración de la lignina son algunos de los mecanismos que algunos hongos como el necrotrófico *M. pernicioso* usa para colonizar los tejidos de plantas (Aro *et al.*, 2005).

Mondego *et al.* (2008) identificaron genes que codifican enzimas involucradas en la degradación de la hemicelulosa y celulosa, incluyendo β -1,4 celulasas, exocelobiohidrolasa, endo- β -1,4 xilanasas y endoglucanasas; genes que codifican enzimas lignolíticas incluyendo peroxidasa dependiente de manganeso y polifenoloxidasas multicobre (lacasas); así como genes que codifican enzimas involucradas en la degradación de la pectina, tales como péctato liasas, poligalacturonasas (pectinasas) y pectin metilesterasa (pectinesterasa). *M. pernicioso* tiene un arsenal de enzimas degradadoras de la pared celular de la planta que es similar a las encontradas en el patógeno hemibiotrófico *Fusarium graminearum* y *Magnaporthe grisea*, biotróficos. El hongo biotrófico *Ustilago maydis* y simbionte *Laccaria bicolor* tienen un conjunto mínimo de enzimas degradadoras de la pared celular de las plantas que está acorde con su forma de vida.

Lana *et al.* (2011), confirmaron la producción de las enzimas cuyos genes fueron reportados en *M. pernicioso* por Mondego *et al.* (2008), reportando que *M. pernicioso*, es capaz de producir amilasas, pectinasas, exo y endoglucanasas, así como lipasas. Sin embargo, hasta el momento no se han encontrado reportes sobre la producción de enzimas degradadoras de la pared celular de plantas en *M. roreri*.

Por lo anterior, y dado que se detectó la actividad enzimática extracelular de endo 1,3(4)- β -glucanasa en la cepa MRO1 de *M. roreri* (Capítulo III), en el presente trabajo se diseñaron oligonucleótidos iniciadores con la finalidad de amplificar un fragmento del(os) gen(es) codificante(s) de este tipo de enzimas, tomando como base dos de las secuencias de genes codificantes de enzimas endo 1-3(4) β -glucanasa (Números de acceso GenBank: XM002389314 y XM002392166) descritas en *M. pernicioso* (Mondego *et al.*, 2008).

IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. 2.1. Extracción de DNA cromosómico

Similar a lo descrito en el Capítulo III.2.3.

IV.2.2. Amplificación de genes codificantes de enzimas extracelulares endo-1,3(4)- β -glucanasa a partir de *M. roreri*

IV.2.2.1. Diseño de oligonucleótidos iniciadores

Con la finalidad de amplificar un fragmento del(os) gen(es) codificante(s) de enzimas endo 1-3(4)- β -glucanasa de *M. roreri*, se diseñó un par de oligonucleótidos iniciadores (GLUMPO SENSE y GLUMPO ANTISENSE), tomando como base dos de las secuencias de genes codificantes de enzimas endo 1-3(4)- β -glucanasa (Números de acceso GenBank: XM002389314 y XM002392166) descritas en *M. pernicioso* mostrado en el anexo 3 y 4 (Mondego *et al.*, 2008).

IV.2.2.2. Amplificación de genes por PCR

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo con 10 ng del ADN molde, en un volumen final de 25 μ L bajo la siguiente formulación: 16.3 μ L de agua grado PCR, regulador de reacción 1X, MgCl₂ 2mM, dNTPs 200 mM, iniciadores 0.4 mM y 1U de

Taq DNA polimerasa. El ADN fue amplificado en un termociclador Techgene® con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de una desnaturalización a 94 °C por 1 minuto; alineamiento a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto; y una extensión final a 72°C por 5 minutos (Bautista-Muñoz *et al.*, 2005).

IV.2.2.3. Electroforesis de ADN

Similar a lo descrito en el Capítulo III.2.5.

IV.2.2.4. Purificación de los fragmentos de ADN amplificados

Similar a los descrito en el Capítulo III.2.6.

IV.2.3. Secuenciación del ADN purificado

Similar a lo descrito en el Capítulo III.2.7.

IV.2.4. Alineamiento múltiple de aminoácidos de la secuencia parcial del gen putativo MrGLU1 de la cepa MRO1 de *M. roreri* y genes endo-1,3(4)-β-glucanasa descritos en otros hongos

Las secuencias de aminoácidos de genes endo-1,3(4)-β-glucanasa descritas en hongos y depositadas en la base de datos de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se alinearon con la secuencia aminoacídica parcial deducida a partir de la secuencia nucleotídica parcial del gen putativo *MrGLU1* de la cepa MRO1 de *M. roreri*, empleando el código genético universal. Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas se realizaron con el programa CLUSTAL X versión 1.8 (Thompson, *et al.*, 1997). La edición de los alineamientos se realizó con el programa GeneDoc versión 2.3 (Nicholas, *et al.*, 1997).

IV.2.5. Relaciones de similitud entre la secuencia parcial de aminoácidos del gen putativo MrGLU1 de la cepa MRO1 de *M. roreri* y la secuencia aminoacídica de genes endo-1,3(4)-β-glucanasa descritos en otros hongos

Se efectuaron cinco alineamientos múltiples consecutivos y el último alineamiento se uso para establecer un filograma con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) utilizando el método de

agrupamiento de Neighbor-joining con el índice Poisson (P). Para valorar estadísticamente la significancia de las relaciones presentadas en el filograma, se realizaron 1000 aleatorizaciones tipo “bootstrap”.

IV.3. RESULTADOS

IV.3.1. Amplificación y secuenciación del gen *MrGLU1* de *M. roreri*

Los iniciadores GLUMPO SENSE y GLUMPO ANTISENSE (Cuadro 4, anexo 6), se utilizaron para amplificar un fragmento del(os) gen(es) endo 1-4 β -glucanasa a partir del ADN de la cepa MRO1 de *M. roreri*. Dichos iniciadores permitieron la amplificación y secuenciación de un fragmento único cuya secuencia contiene 747 pb (Figura 11). La secuencia fue registrada en la base de datos GenBank y está disponible con el número de acceso JN029800 (Figura 12, anexo 5). La secuencia nucleotídica fue traducida empleando el código genético universal del software DNAMAN versión 7.

Se obtuvo una secuencia de 249 aminoácidos (Figura 13) y sin codones de terminación. El gen parcial fue nombrado *MrGLU1* y la proteína predicha codificada por dicho gen fue nombrado mrGLU1. Cabe mencionar que las letras mr fueron asignadas para hacer referencia a la primera letra del género y especie del hongo *M. roreri*.

El análisis Blast (Basic Local Alignment Search Tool) realizado en el servidor de la NCBI, indicó que la secuencia de aminoácidos parcial predicha de 249 obtenida a partir del gen *MrGLU1* de la cepa MRO1 de *M. roreri*, presenta un 97% de identidad máxima con respecto a las secuencias de aminoácidos con número de acceso GenBank XP003037278 y XP003031202 de enzimas pertenecientes a la familia 16 de las glicósido hidrolasas de *Schizophyllum commune*; 87% de identidad máxima con respecto a secuencia de aminoácidos con número de acceso GenBank XP002389355 de endo-1,3(4)- β -glucanasa putativa de *M. pernicioso*, depositadas en la base de datos GenBank de la NCBI.

Cuadro 4. Iniciadores empleados en las reacciones de amplificación y secuenciación del gen *MrGLU1* de la cepa MRO1 de *M. royeri*.

Nombre	5'-Secuencia-3'	Tm(°C) 4(G+C) + 2(A+T)	Longitud (pb)
GLUMPO SENSE	TCTGGYYMAGAYTTCTTCTCG	60	21
GLUMPO ANTISENSE	CGCGACTCCAAAACCATATG	60	20

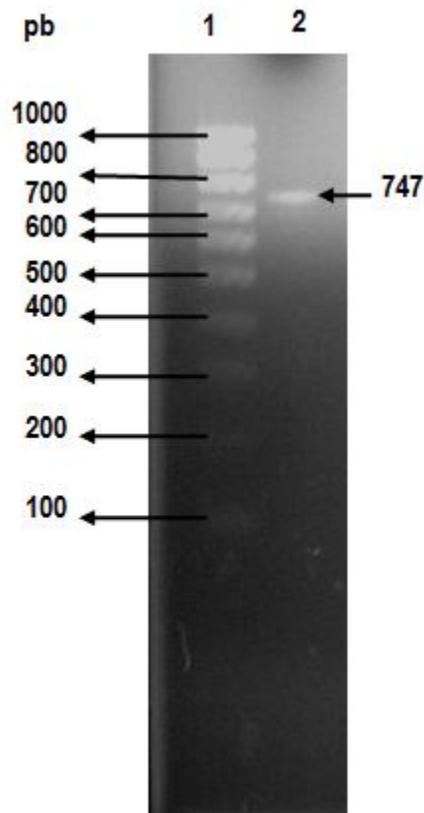


Figura 11. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *MrGLU1* de la cepa MRO1 de *M. royeri*, aislada de mazorcas infectadas. 1. Marcador de talla molecular de ADN de 1 kb, 2. Fragmento de PCR.

```

1      CTGGTTCAG ATTTCTTCTC GAAATGGGAG TACGATGGTG GAGTCGCAAG AGGTACATTT
61     ATCGTTCCCT GGCATAAGA AAGTTCACCC AGGATTCACT TTCACAGGCA ACGCACAATT
121    TGTCGACGAA AACACCGCCA TACAGCAGAA GCTGACGTTT GTAGAATCAT CGACAGGTCA
181    TGCTATCGTT CGTGTAGACA ATACCACGAG CGTTGGAGCT GGGTCGTTTCG CTCGCCGAA
241    CTCAGTCAGT GCTTCTGATT TGCCTCAAGG TATCACTAAG TATTTAATCT GCCGTTTCTC
301    CAGGTCAGAA TTAATTCAA GATGCATAT CCTATTGGGA GTCTCATCAT CATGGACGTC
361    ATTCACATGC CTTATGGATG CTCCGTATGT GTTGATTTTT GAGTCTACAC CTCAATTGAT
421    GTGTTCTCCT AAAGTATTAC CTTCGTTTCA GACATCGGGC AACAGTATTA CACGGCCTCA
481    TGCAGGCGAA ATCGCCATCA TAGAAACTGA GGATGGTATC TCTATGAACC CTAATTACAT
541    GGCCCTGTAT ACAGATGCTG GTTGTATCCA GTCTTCCTAT GCTGTCCAAA GCGGCAGCAC
601    CGTAGAACGG AATTGCAGTC CCGACCTCGG TTGCCGTGTG GAACAAACCG ATCCTGAAAG
661    TTCCGGAAGT GAGCTCGCCG AGGCTGGTGG TGGGATTTTC GCTGCTCAA TTTGATCCTGC
721    CCGGATCTTC ATATGGGTTT GGAGTCGC

```

Figura 12. Secuencia nucleotídica parcial de 747 pb del gen MrGLU1 (Número de acceso GenBank: JN029800) amplificado a partir de ADN de la cepa MRO1 de *M. roleri*. La numeración del lado izquierdo indica el número de bases nucleotídicas.

```

1      LVQISSRNGS TMVESQEVHL
21     SFPGHKKVHP GFTFTGNAQF
41     VDENTAIQOK LTFVESSTGH
61     AIVRVDNTTS VGAGSFARRN
81     SVSASDLRQG ITKYLICRFS
101    RSELLQRMHI LLGVSSSWTS
121    FTCLMDAPYV LIFESTPQLM
141    CSPKVLPSFR TSGNSITRPH
161    AGEIAIETE DGISMNPNYM
181    ALYTDAGCIQ SSYAVQSGST
201    VERNCSPLDG CRVEQTDPEP
221    SGSELAEAGG GIFAAQIDPA
241    RIFIWWSR

```

Figura 13. Secuencia predicha 249 de aminoácidos de la proteína mrGLU1, deducida a partir del gen MrGLU1 (Número de acceso GenBank: JN029800) de la cepa MRO1 de *M. roleri*. La numeración del lado izquierdo indica el número de bases nucleotídicas.

IV.3.2. Relaciones de similitud entre secuencias de genes codificantes de enzimas endo-1,3(4)-β-glucosidas descritos en hongos

El filograma (Figura 14), muestra las relaciones de similitud entre las secuencias de aminoácidos de la proteína predicha mrGLU1 (referencia 221103) de *M. roreri* y las secuencias de aminoácidos de genes codificantes de enzimas endo 1,3(4)-β-glucanasa reportadas en la base de datos GenBank de la NCBI: Proteína hipotética MPER 11525 de *M. pernicioso* FA553 (Número de acceso: XP002389355); proteína hipotética MPER_08251 de *M. pernicioso* FA553 (Número de acceso XP002392207); proteína hipotética MPER_06823 de *M. pernicioso* FA553 (Número de acceso XP002393445); proteína hipotética MPER_00921 de *M. pernicioso* FA553 (Número de acceso XP002398479); proteína glucosilhidrolasa de la familia de *Schizophyllum commune* H4-8 (Número de acceso XP003038066); proteína glucosil hidrolasa de la familia 16 de *Schizophyllum commune* H4-8 (Número de acceso XP003028746); proteína hipotética POSPLDRAFT_135021 de *Positia placenta* Mad-698-R (Número de acceso XP002475942); proteína glucosil hidrolasa de la familia 16 de *Laccaria bicolor* S238NH82 (Número de acceso XP001876832); proteína hipotética POSPLDRAFT_1116903 de *Positia placenta* Mad-698-R (Número de acceso XP002470721); proteína glucosil hidrolasa de la familia 16 de *Schizophyllum commune* H4-8 (Número de acceso XP003033735); proteína hipotética POSPLDRAFT_115945 de *Positia placenta* Mad-698-R (Número de acceso XP002472478); Mezcla unida a glucanasa de *Coprinopsis cinérea okayama* 7#130 (Número de acceso XP001840142); proteína glucosil hidrolasa de la familia 16 de *Schizophyllum commune* H4-8 (Número de acceso XP003037278); proteína hipotética SNOG_04451 de *Phaeosphaeria nodorum* SN15 (Número de acceso XP001794868); proteína glucosil hidrolasa de la familia 16 de *Laccaria bicolor* S238NH82 (Número de acceso XP001873806); endo-β-glucanasa de *Phanerochaete chrysosporium* (Número de acceso CAZ65735); proteína glucosil hidrolasa de familia 16 de *Schizophyllum commune* H4-8 (Número de acceso XP003031202); proteína hipotética BC1G_07198 de *Botryotinia fuckeliana* B05.10 (Número de acceso XP001554061); proteína glucosil hidrolasa de la familia 16 de *Schizophyllum commune* H4-8 (Número de acceso XP003032113); proteína hipotética SS1G_10048 de *Sclerotinia sclerotiorum* 1980 (Número de acceso XP001589409);

endo-1,3(4)- β -glucanasa putativo de *Aspergillus fumigates* A1163 (Número de acceso EDP55864); endo-1,3(4)- β -glucanasa de *Aspergillus fumigatus* Af293 (Número de acceso XP750278); endo-1,3(4)- β -glucanasa de *Aspergillus fumigatus* Af293 (Número de acceso XP751495); endo-1,3(4)- β -glucanasa de *Aspergillus fumigatus* A1163 (Número de acceso EDP50688); laminarinasa de *Cryptococcus gattii* WM276 (Número de acceso XP003197007); proteína semejante a endo-1,3(4)- β -glucanasa de *Positia placenta* Mad-698-R (Número de acceso XP002472256); proteína hipotética UM01898.1 de *Ustilago maydis* 521 (Número de acceso XP758045); endo-1,3(4)- β -glucanasa putativa de *Penicillium marneffeii* ATCC18224 (Número de acceso XP002150155); proteína hipotética POSPLDRAFT_112923 de *Positia placenta* Mad-698-R (Número de acceso XP002472272); Mezcla unida a glucanasa de *Ajellomyces capsulatus* H88 (Número de acceso EGC44502); endo-1,3(4)- β -glucanasa de *Aspergillus niger* CBS 513.88 (Número de acceso XP001389606); Cadena A de endo-1,3(4)- β -glucanasa de *Phanerochaete Chrysosporium* (Número de acceso 2CL2A); proteína glucosil hidrolasa de la familia 16 de *Coprinopsis cinérea* (Número de acceso XP001837802). El porcentaje máximo de identidad compartido entre la proteína predicha mrGLU1 (referencia 221103) y cada una de las secuencias a comparar, fluctúa entre el 76 a 97%.

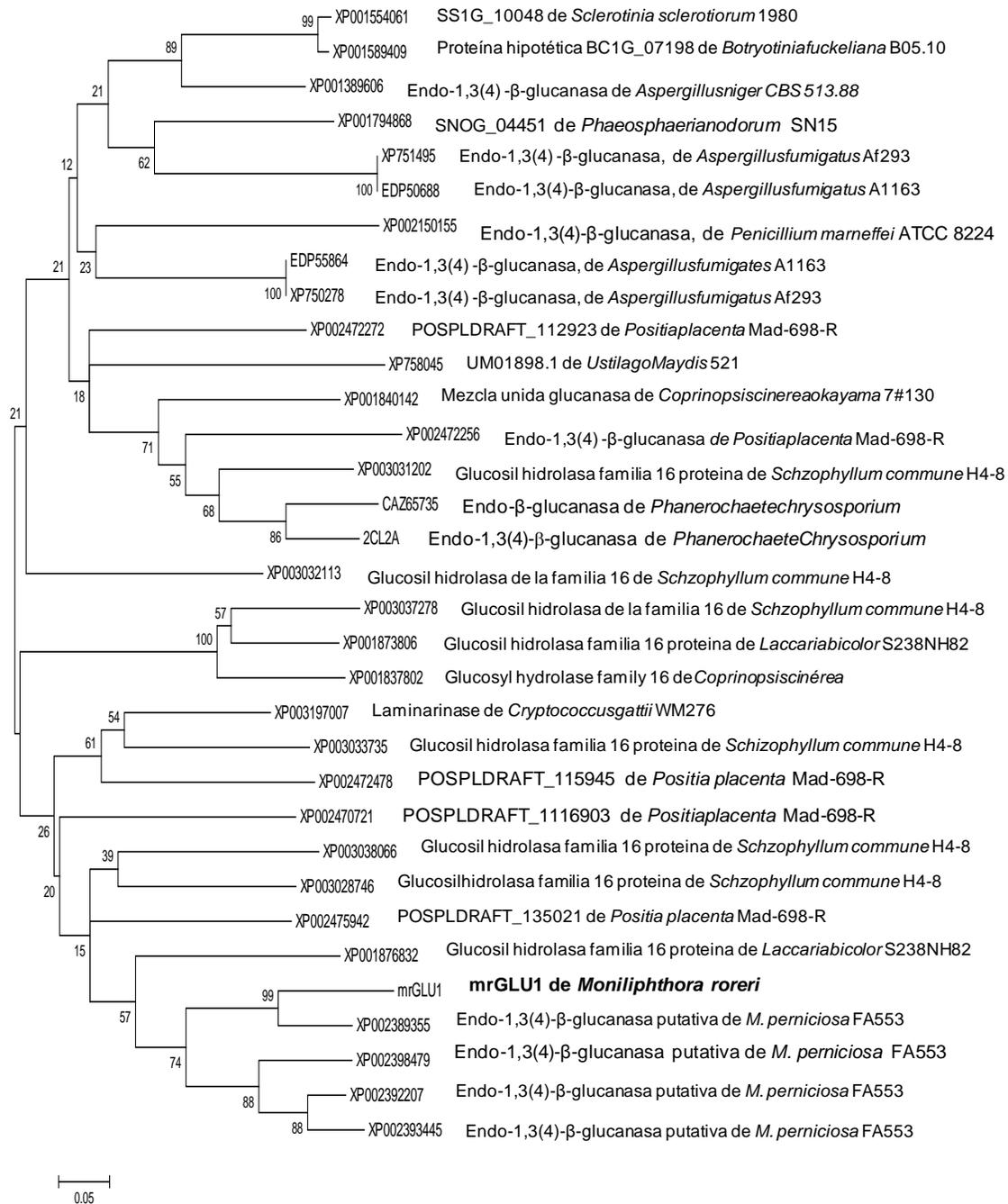


Figura 14. Relaciones de similitud entre las secuencias de aminoácidos de la proteína predicha mrGLU1 (referencia 221103) deducida a partir del gen *MrGLU1* de *M. roreri* y proteínas de genes endo 1-3(4)-β-glucanas descritos en otros hongos. Las secuencias fueron tomadas de la base de datos GenBank de la NCBI. La comparación filogenética se basó en el análisis de 247 posiciones aminoacídicas por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P), el método de agrupamiento fue Neighborn-joining. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos. El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje.

IV.4. DISCUSIÓN

La secuencia parcial predicha de 249 aminoácidos de la proteína mrGLU1 (referencia 221103) fue sometida a un análisis BLAST para encontrar su similitud con otras proteínas previamente descritas y depositadas en la base de datos GenBank de la NCBI. Los resultados mostraron que la secuencia parcial tiene similitud con enzimas endo-1,3(4)- β -glucanasas descritas principalmente en *M. pernicioso* además de otros hongos. El filograma de la Figura 14, muestra que la secuencia parcial de la proteína predicha mrGLU1 se agrupa con cuatro proteínas predichas codificantes de enzimas endo-1,3(4)- β -glucanasas (Número de acceso GenBank: XP002389355, XP002392207, XP002398479 y XP002393445) previamente descritas en *M. pernicioso*.

Aime y Phillips-Mora, (2005) llevaron a cabo análisis filogenéticos poniendo de manifiesto que a pesar de sus morfologías contrastantes, *M. pernicioso* y *M. roreri* son hermanas, lo que sugiere que su fitopatogenicidad ha evolucionado una sola vez a partir de un ancestro común. Adicionalmente, un estudio del genoma de *M. pernicioso* demuestra que este hongo posee una gran cantidad de enzimas como monooxigenasa citocromo P450, transportadores de eflujo y enzimas antioxidativas que pueden ser importantes durante la desintoxicación del progreso de la enfermedad escoba de bruja (Mondego *et al.*, 2008). Este arsenal de enzimas degradadoras de la pared celular de plantas es similar al encontrado en hongos ascomicetos hemibiotróficos como *F. graminearum* y *M. grisea* (Mondego *et al.*, 2008).

Tiburcio *et al.*, (2009) reportaron el primer gen putativo de *M. pernicioso* transferido horizontalmente (Horizontal gene transfer, HGT). Dicho gen codifica para una enzima hidrolasa metalodependiente (MDH) similar a la enzima imidazolonepropionasa y otras amidohidrolasas relacionadas. El contenido de GC de la MDH de *M. pernicioso* es de 52.98 y 7.5% de los genes predichos de esta especie tienen un contenido de GC mayor a estos valores. Un gen MDH homólogo fue también encontrado en el genoma de *M. roreri*.

Las proteínas que inducen la necrosis (Necrosis-Inducing Proteins, NEP's) en *M. pernicioso*, fueron encontradas habiendo sido adquiridas por HGT, se cree que este gen fue adquirido por transferencia horizontal. *M. pernicioso* tiene tres copias de este gen mientras que *M. roreri* tiene sólo dos (Tiburcio *et al.*, 2009).

El tercer gen putativo transferido horizontalmente en *M. pernicioso* codifica para una enzima manitol 1-fosfato 5-deshidrogenasa (Mannitol 1-phosphate 5-dehydrogenase, MPDH). Esta enzima convierte la fructosa 6-fosfato a manitol 1-fosfato en una reacción reversible. Un gen MPDH homólogo fue encontrado en el genoma de *M. roreri* (Tiburcio, *et al.*, 2009).

Un análisis filogenético, realizado por Youssef y Elshahed (2009), indicó que dos de los tres genes transferidos horizontalmente encontrados en *Moniliophthora* se han originado a partir de bacterias. Los genes MDH y MPDH de *Moniliophthora* están relacionados con los genes provenientes de actinobacterias y formicutes, respectivamente y estos dos grupos son comunes del suelo y descomponen la materia orgánica.

Aime y Phillips-Mora (2005), mencionaron que la incidencia de las bacterias del suelo entre los donadores de genes es consistente con la presunta historia evolutiva del fitopatogénico género *Moniliophthora*. Muchas de las otras especies de hongos conocidos relacionados al género *Moniliophthora* son saprófitas y el suelo es un hábitat común para especies con esta forma de vida. De este modo, el ancestro común de *M. roreri* y *M. pernicioso* podría haber obtenido genes MDH y MPDH en ese hábitat antes de evolucionar a un patógeno.

Lana *et al.* (2011), confirmaron la producción de enzimas extracelulares de amilasa, pectinasa, lipasa, endoglucanasa y exoglucanasa en cepas de *M. pernicioso* aisladas de plantas de cacao. Lo anterior, explica por qué el análisis de la relación de similitud entre la secuencia de aminoácidos de la proteína predicha mrGLU1 (referencia 221103) de *M. roreri* y las descritas en otros hongos, la proteína predicha mrGLU1 se agrupa principalmente con las secuencias de aminoácidos de las proteínas descritas como: proteína hipotética MPER 11525 de *M. pernicioso* FA553 (Número de acceso: XP002389355); proteína hipotética MPER_08251 de *Moniliophthora pernicioso* FA553 (Número de acceso: XP002392207); proteína hipotética MPER_00921 (Número de acceso: XP002398479) proteína hipotética MPER_06823 de *Moniliophthora pernicioso* FA553 (Número de acceso: XP002393445), todas codificantes de enzimas endo 1-3(4)- β -glucanasas putativas. Lo anterior, nos lleva a preguntarnos si el gen putativo *MrGLU1*

pudo haberse originado por eventos de transferencia horizontal de genes entre *M. pernicioso* y *M. roleri*.

IV.5. CONCLUSION

La secuencia nucleotídica parcial de 747 pb del gen *MrGLU1* (Número de acceso GenBank: FJ029800) codifica para proteína parcial predicha de 249 aminoácidos similar a las enzimas endo 1-3(4)- β -glucanasas putativas (Número de acceso GenBank: XP002389355, XP002392207, XP002398479 y XP002393445) descritas en *M. pernicioso*.

IV.6. LITERATURA CITADA

- Aime, M.C y Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witch's broom and frosty pod rot of cocoa (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*. 97: 1012-1022.
- Aro, N., Pakula, T y Penttila, M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol* 4:719-739.
- Bautista-Muñoz, C., Hernández-Rodríguez, Cy 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.
- Mondego, J., Carazzolle, F. M., Costa, G.L.G., Formighieri, F. E., Parizzi, P. L., Rincones, J., Cotomacci, C. M., Carraro, D., Cunha, F. A., Carrer, H., Vidal, O, R., Estrela, C.R., García, O., Thomazella, P. T. D., Oliveira, V. B., Pires, B. L. A., Rio, S. M.C., Araújo, R. M.R., Moraes, M.H., Castro, L.A., Gramacho, P. K., Gonçalves, S. M., Moura, N. J.P., Neto, G. A., Barbosa, V. L., Guiltinan, J. M., Bailey, A. B., Meinhardt, W. L., Cascardo, C.M. J y Pereira A.G.G. 2008. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomic*. 9-548.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H. B y Derfield D.W. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW NEWS*. 4:14.
- Pitson, S.M., y Seviour, J. R. M. 1993. Mcdougall B. Noncellulolytic fungal β -glucanase: Their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Technol*. 15:178-192.
- Lana, T.G., Azevedo, J. L., Pomella, V. A.W., Monteiro, R.R.T., Silva, B. C y Araújo, L. W. 2011. Endophytic and pathogenic isolates of the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Tricholomataceae) are indistinguishable based on genetic and physiological analysis. *Genet. Mol. Res*. 1:326-334.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M y Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*.
- 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 Res*. 24:4876-4882.
- Tiburcio, R.A., C. Lacerda, G.G., C. Falsarella, M., Costa, M. J.M., Schuster, S.C., Carlson, J.E., Guiltinan, M.J., Bailey, B. A., Piotr, M. P., Lyndel, W., Meinhardt, L.W y Guimaraes, P. G.C. 2009. Genes Acquired by Horizontal Transfer Are Potentially Involved in the Evolution of Phytopathogenicity in *Moniliophthora*

perniciosa and *Moniliophthora roreri*, two of the major pathogens of cacao. J: Mol. Evol. 70:85-97.

Youssef, N.H y Elshahed, M.S. 2009. Diversity rankings among bacterial lineages in soil. ISME J 3:305–313.

CAPITULO V

CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES ENDO-1,3(4)- β -GLUCANASA DEL HONGO FITOPATÓGENO *Moniliophthora roreri* CULTIVADO BAJO EL SISTEMA DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO USANDO BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR COMO SUSTRATO INDUCTOR

V.1. INTRODUCCIÓN

El BCA es un material de biomasa abundante y de bajo costo, contiene alrededor de 27-54% de celulosa, el cual puede ser un sustrato potencial para la producción de celulasa. Se han realizado varios estudios sobre el uso del bagazo de caña en la producción de celulasa bajo los sistemas de fermentación en estado líquido y sólido (Du Toit *et al.*, 1984; Aiello *et al.*, 1996; Gutiérrez-Correa y Tengerdy, 1997; De Paula *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2000).

El BCA es una biomasa lignocelulósica producida en grandes cantidades como subproducto, como resultado de la extracción de azúcar, según Díaz (2000) representa 27.5%. Cantidades considerables de BCA son utilizadas actualmente como una fuente de energía combustible, para la producción de pulpa de papel, así como, en la alimentación animal. Sin embargo, un contenido relativamente alto de hidrato de carbono (hemicelulosa y celulosa), así como un contenido medio de lignina, convierten al BCA en un sustrato atractivo para la producción de etanol, pero la bioconversión de ambas fracciones, de carbohidratos a etanol, debe ser considerada para que el proceso resulte viable. El pre tratamiento del BCA es necesario para reducir su recalcitrancia para la hidrólisis enzimática. Estudios previos han reportado el pre-tratamiento del BCA, ya sea con métodos físicos o químicos como ácido (Martin *et al.*, 2002), vapor de agua (Kaar *et al.*, 1998) o alcalino (Fox *et al.*, 1987; Holtzapple *et al.*, 1991). El ácido sulfúrico diluido ha sido ampliamente utilizado para pre tratar BCA (Van Zyl *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2002) y resulta en la fracción de hemicelulosa que es liberada como pentosas tales como xilosa y arabinosa. Posteriormente, la neutralización del sistema es requerida, de lo contrario, la subsecuente fermentación del hidrolizado puede ser seriamente inhibida. Por otra parte, las enzimas son importantes en las propiedades funcionales de los productos alimenticios, modificando sus características e incrementando la calidad de

los mismos (Menezes, 1997) y son empleadas en el tratamiento de los desechos fibrosos obtenidos durante el procesamiento de los alimentos. Las celulasas han sido aplicadas en diferentes sectores de la industria de alimentos, principalmente en el tratamiento de desechos agroindustriales. Por otro lado, dichos desechos agroindustriales son empleados como sustratos para la producción de dichas enzimas a partir de hongos (Menezes, 1997).

La eficiencia de los materiales celulósicos como inductores de enzimas, depende de su susceptibilidad para el ataque de hongos y del tipo de desechos agrícolas sobre la superficie terrestre que pueden ser usados como fuente de carbono (Da Silva *et al.*, 1997).

Dado que se ha reportado el uso de enzimas del complejo enzimático celulasas como las endo-1,3(4)- β -glucanasas que son empleadas como aditivos en alimentos para animales y que existe una amplia disponibilidad de desechos agroindustriales, como el bagazo de caña, el objetivo de este trabajo es estudiar la producción de enzimas endo-1,3(4)- β -glucanasas por el hongo *Moniliophthora roreri* cultivado bajo FES y empleando BCA como sustrato inductor, además de amplificar y secuenciar posibles genes codificantes de dichas enzimas (Capítulo IV).

Planteando los siguientes objetivos particulares: Determinar las cinéticas de producción de biomasa, así como de enzimas extracelulares endo-1,3(4)- β -glucanasas del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* cultivado bajo FES usando BCA como sustrato inductor.

V.2. MATERIAL Y MÉTODOS

V.2.1. Medios de cultivo

V.2.1.1. Conservación de cepas

El medio de cultivo empleado a lo largo de este trabajo para la conservación y purificación específica de cepas de *M. roreri* fue el siguiente:

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

El pH del medio de cultivo se ajustó a 6.0 con HCl. El medio sólido, se preparó agregando 2% de agar bacteriológico. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

La cepa MRO1 de *M. roreri* se conservó a corto plazo a 4°C en placas de agar de medio mínimo mineral.

V.2.1.2. Composición del sistema de fermentación en estado sólido (FES)

La producción de enzimas extracelulares endo-1,3(4)- β -glucanasas, biomasa celular y pH fueron determinados cada 24 horas durante todo el proceso de FES. Cabe mencionar que los ensayos se realizaron por triplicado.

La FES se desarrolló en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 g de medio de fermentación. El medio de fermentación contenía en g por 100g lo siguiente: urea, 0.3; K_2HPO_4 , 0.65; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.26; MgSO_4 , 0.02; FeSO_4 , 0.029, bagazo de caña de azúcar (BCA), 24.6 y 70 ml de agua destilada, conteniendo 70% de humedad inicial. El pH se ajustó a 4.5. El BCA se tamizó y lavo con agua caliente para eliminar la sacarosa residual. El medio de cultivo sin BCA y el BCA se esterilizaron por separado a 120°C durante 15 minutos. Una vez enfriadas, ambas fracciones se mezclaron.

V.2.1.3. Preparación del pre-inóculo

Las cepas de *M. roreri* se cultivaron en cajas de petri, hasta alcanzar 8.5 cm de diámetro (15-21 días). Con la finalidad de propiciar la germinación de las esporas y el crecimiento micelial del hongo, se prepararon cultivos pre-inóculos a partir de una suspensión de esporas, agregando 5 ml del medio de fermentación a cada caja petri, y removiendo cuidadosamente los conidios con un pincel. La suspensión de esporas, se transfirió a un matraz de 500 ml con 100 g de medio de cultivo e incubada a 28°C, en un agitador orbital a 150 rpm durante 24 horas (Phillips-Mora, 2003). Posteriormente, las esporas germinadas se contaron y los matraces problema se inocularon con una concentración de 1×10^6 esporas germinadas/g de materia seca (Lipa y Slizynki, 1973). Finalmente, todos los matraces problemas y testigos (sin inocular) se incubaron a 28°C sin agitación y bajo condiciones naturales de luz-oscuridad. Posteriormente, las muestras se filtraron cada 24 h durante 30 días. El líquido filtrado se empleó en la determinación del pH y actividad enzimática extracelular de endo-1,3(4)- β -glucanasa, y el material sólido fue usado en la determinación de la biomasa celular del hongo.

V.2.1.4. Determinación de la biomasa de *M. roreri*

La producción de biomasa de *M. roreri*, se determinó en los matraces problemas preparados como se indicó en la sección anterior. A continuación, el micelio se cosecho cada 24 horas durante 30 días, empleando un sistema de filtración al vacío en un sistema Millipore y papel Whatman número 3. El micelio filtrado se seco en un horno Scorpion Cientific a 65°C durante 72 h. Finalmente, las muestras de los matraces problemas y testigos, se pesaron en una balanza analítica Marca AE (Modelo AEP). La biomasa de *M. roreri* calculada en gramos fue el resultado del peso de la biomasa del problema menos el testigo.

V.2.2. Determinación pH

Se realizó con un potenciómetro digital marca Conductronic PC 18.

V.2.3. Determinación de actividad enzimática

Las muestras de material fermentado se tomaron cada 24 h durante 30 días y filtradas en una unidad de filtración al vacío. El líquido filtrado constituyó el extracto enzimático extracelular, mismo que se mantuvo a 4°C para la determinación de la actividad enzimática extracelular de endo-1,3(4)- β -glucanasa (Maldonado *et al*, 1996), proteína total y pH.

La actividad enzimática extracelular de endo-1,3(4)- β -glucanasa se determinó empleando carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5 % preparada en regulador de acetato de sodio 1 M, pH 8.0 como sustrato enzimático (Ramos *et al.*, 1999). La concentración de azúcares reductores liberados se midió con el kit Glucosa assay GAGO-20 (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Una unidad de actividad enzimática extracelular de endo-1,3(4)- β -glucanasa es definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar grupos reductores equivalentes a 1 μ mol de glucosa por minuto bajo las condiciones del ensayo (Anexo 7).

V.2.4. Determinación de la proteína total

La concentración de proteína total se realizó siguiendo el método descrito por Lowry *et al.* (1951), empleando albúmina sérica bovina como patrón.

V.2.5. Diseño experimental

Se utilizaron dos tratamientos (T) con tres repeticiones por tratamiento. En el T1 se estudió la fermentación del bagazo de caña sin inóculo (testigo) y en el T2 se estudió la fermentación del bagazo de caña inoculado con el hongo *M. roreri*, durante 30 días para ambos casos.

Para la variable pH, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2 por 30. El primer factor estudiado fue la fermentación del bagazo de caña con y sin inóculo, el segundo factor consistió en el tiempo de fermentación de 1 a 30 días. Se realizó un ANOVA para conocer los efectos de interacción del tiempo de incubación y los tratamientos. Se realizó la comparación múltiple de medias por el método de Tukey (1953) con $\alpha=0.05$, mediante PROC GLM del estadístico SAS, versión 9.1 para Windows (SAS, 2003)

Para conocer la actividad enzimática, se calculó la eficiencia, en donde el valor del tratamiento 1 se resta al valor del tratamiento 2. El diseño estadístico para actividad enzimática y biomasa fueron completamente aleatorio y se analizaron por medio de análisis de varianza y comparando sus media entre días mediante la prueba de tukey.

V.3. RESULTADOS

Los resultados analizados, muestran el comportamiento del valor de pH, la biomasa celular y la actividad enzimática extracelular de endo-1,3(4)- β -glucanasa de la cepa MRO1 del hongo *M. roreri*.

El valor del pH para el al tratamiento 2 (Bagazo de caña con inóculo *M. roreri*) muestra un valor inicial de 6.54 y se mantiene hasta el día 20 con un valor de 6.51 y posteriormente finaliza con un valor de 7.36. En relación al tratamiento 1 (Bagazo de caña sin inóculo), muestra un valor inicial de 6.13 y se mantiene constante hasta el día 19 con un valor de 6.4. Posteriormente, finaliza al día 30 con un valor de 6.23, en general no presenta cambios drásticos (Figura 15).

El análisis de varianza muestra una diferencia significativa entre ambos tratamientos ($P > 0.0001$) y la comparación de medias de la prueba de tukey indica que el tratamiento 2 es el mayor (Cuadro 5), ya que presenta los valores más altos de pH, por otro lado, en la comparación de medias de la prueba de tukey, por día, se encontró que los días 29 y 30 presentaron los valores más altos de pH (Cuadro 5).

La determinación de la actividad enzimática extracelular de endo-1,3(4)- β -glucanasa (Figura 15), muestra que durante los primeros 18 días de fermentación, no hay valores importantes de dicha actividad, sin embargo, en el día 19, la actividad se incrementa, alcanzando un nivel de actividad de 19.94 mU/mg proteína total y disminuye en el día 21 con un valor de 1.08 mU/mg proteína total. En los siguientes días, y a partir del día 22, la actividad enzimática se incrementa nuevamente hasta los días 27 y 28, alcanzando valores de 280.575 y 258.30 mU/mg proteína total, respectivamente. Posteriormente, disminuye en el día 30 hasta un valor de 172.60 mU/mg proteína total. El análisis de varianza muestra una diferencia significativa entre días y la comparación de medias de la prueba de tukey indica que los niveles más altos de actividad enzimática se obtienen en los días 27 y 28 (Cuadro 6).

De acuerdo a los resultados, la biomasa celular inicia con un valor de 26.6mg (0.266) Cuadro 7, y tiende a incrementarse ligeramente hasta un valor final de 27.0 mg (0.270). El análisis de varianza muestra que no existe una diferencia significativa entre días. La comparación de medias muestra que no hay diferencias entre días, lo anterior, confirma que la diferencia en el incremento de biomasa celular fue mínima durante los 30 días del FES.

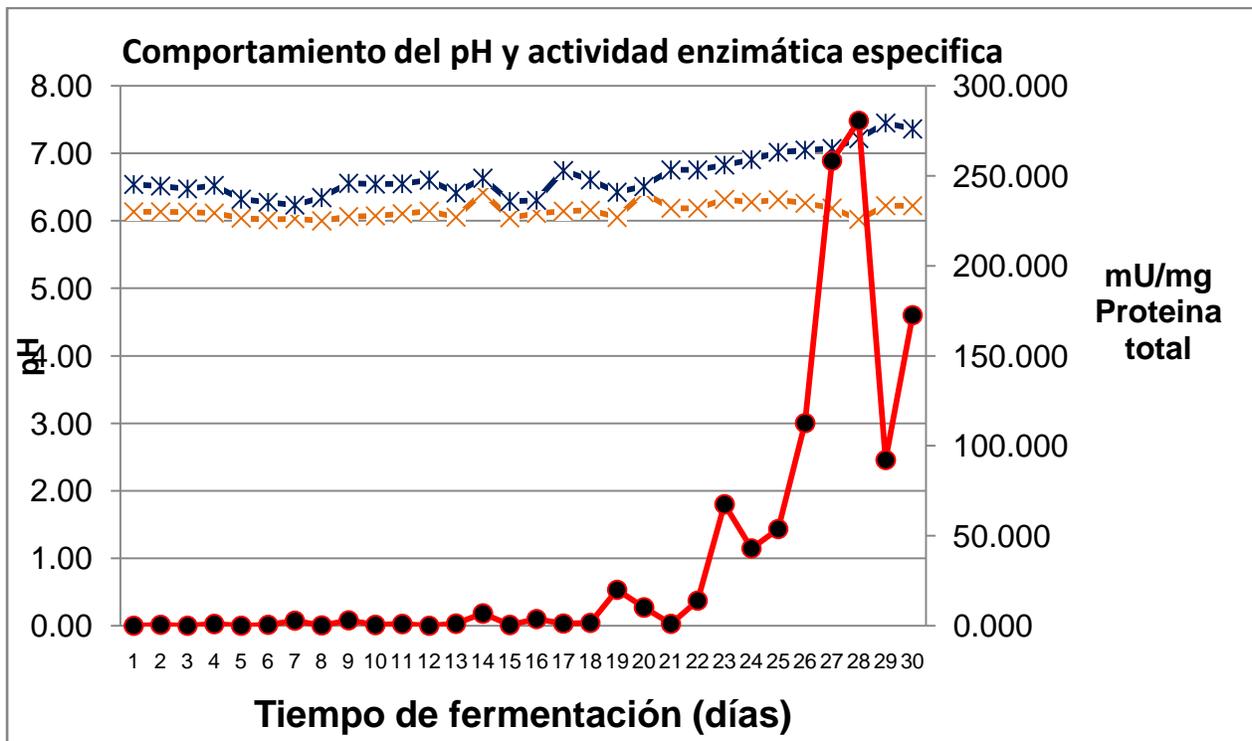


Figura 15: Comportamiento del pH y Actividad enzimática específica pH Tes x pH Prob* actividad enzimática específica ⊖ .

Cuadro 5. Efecto de la fermentación del bagazo de caña de azúcar con y sin inoculo y los días de fermentación en el cambio de pH.

Factores	pH
Fermentación del bagazo de caña	
Con inoculo	6.66 ^a
Sin inoculo	6.16 ^b
EE ±	0.0009935***
Días de fermentación	
1	6.33 c,d,e,f,g,h,i
2	6.32 c,d,e,f,g,h,i
3	6.30 c,d,e,f,g,h,i
4	6.32 c,d,e,f,g,h,i
5	6.18 g,h,i
6	6.14 h,i
7	6.13 i
8	6.17 h,i
9	6.31 c,d,e,f,g,h,i
10	6.31 c,d,e,t,g,h,i
11	6.33 a,b,c,d,e,f,g,h,i
12	6.37 a,b,c,d,e,f,g,h,i
13	6.23 e,f,g,h,i
14	6.53 a,b,c,d,e,f,g,h
15	6.16 h,i
16	6.21 f,g,h,i
17	6.44 a,b,c,d,e,t,g,h,i
18	6.38 a,b,c,d,e,f,g,h,i
19	6.24 d,e,f,g,h,i
20	6.46 a,b,c,d,e,t,g,h,i
21	6.47 a,b,c,d,e,f,g,h,i
22	6.47 a,b,c,d,e,t,g,h,i
23	6.57 a,b,c,d,e,f,g
24	6.59 a,b,c,d,e,f
25	6.66 a,b,c
26	6.65 a,b,c
27	6.63 a,b,c,d
28	6.62 a,b,c,d,e
29	6.84 ^a
30	6.79 ^{a,b}
EE ±	0.0019869***

^{ab}Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tuckey, 1953).

***P<0.001

Cuadro 6. Efecto de los días de la fermentación del bagazo de caña de azúcar con un inóculo en la actividad enzimática específica extracelular de endo-1,3(4)-β-glucanasa.

Factores	Actividad Enzimática
Días de fermentación	
1	0.03 ^f
2	0.53 [†]
3	0.00 ^f
4	0.97 ^f
5	0.00 ^f
6	0.53 ^f
7	2.77 ^f
8	0.22 ^f
9	3.06 ^f
10	0.44 ^f
11	0.97 ^f
12	0.00 [†]
13	1.6 ^f
14	6.81 ^f
15	0.45 [†]
16	3.77 ^f
17	1.20 [†]
18	1.61 ^f
19	19.94 ^{e,†}
20	10.16 ^{e,f}
21	1.8 ^f
22	14.00 ^{e,†}
23	67.44 ^{c,d,e}
24	42.91 ^{d,e,†}
25	53.81 ^{d,e,f}
26	112.59 ^c
27	258.31 ^a
28	280.57 ^a
29	92.10 ^{c,d}
30	172.61 ^b
EE ±	0.20147***

^{ab}Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tuckey, 1953).

***P<0.001

Cuadro 7. Efecto de los días de la fermentación del bagazo de caña de azúcar con un inoculo en la biomasa.

Factores	Biomasa
Dias de fermentación	
1	0.266 ^a
2	0.213 ^a
3	0.200 ^a
4	0.186 ^a
5	0.190 ^a
6	0.243 ^a
7	0.203 ^a
8	0.200 ^a
9	0.200 ^a
10	0.203 ^a
11	0.226 ^a
12	0.223 ^a
13	0.223 ^a
14	0.226 ^a
15	0.226 ^a
16	0.233 ^a
17	0.236 ^a
18	0.240 ^a
19	0.236 ^a
20	0.240 ^a
21	0.243 ^a
22	0.246 ^a
23	0.253 ^a
24	0.256 ^a
25	0.260 ^a
26	0.260 ^a
27	0.263 ^a
28	0.266 ^a
29	0.270 ^a
30	0.263 ^a
EE ±	0.000402***

^{ab}Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tuckey,1953).

***P<0.001

V.4. DISCUSIÓN

Como puede observarse, a medida que transcurre la fermentación, el valor de pH encontrado tiende a incrementar de un valor inicial de 6.5 a un valor final 7.3. Este comportamiento de pH, es semejante a lo encontrado por Villegas *et al.*, (1979) quienes reportaron que *M. roreri* es capaz de crecer en medios con intervalos de pH de 3.5 a 8.0, siendo el óptimo de 5.0 a 6.5, pero es capaz de crecer a pH de 7.0 y a medida que crece tiende a alcalinizar el medio (Barros, 1975).

Como puede observarse es hasta el día 26 de la FES, el pH se incrementa de 6.5 a 7.2 y se observa una expresión importante de actividad enzimática específica de 112.5 mU/mg proteína total, esta cantidad expresada es estable hasta el día 30, la cual es similar al comportamiento del pH que se mantiene en valores alrededor de 7.05 a 7.36.

De acuerdo a Tiburcio *et al.* (2010), la mayoría de los estudios realizados en *M. roreri* son descriptivos y carentes de bases bioquímicas necesarias para entender el mecanismo y desarrollo de la pudrición de la mazorca de cacao.

Por lo anterior, se realizó un estudio genómico comparativo inicial para usar la información de *M. pernicioso* disponible y la enfermedad de la escoba de brujas (Witches' broom disease, WBD) así como expandir la base del conocimiento de *M. roreri* y la pudrición blanda de la mazorca "Frosty pod rot, FPR" (Tiburcio *et al.*, 2010).

La expresión de la actividad enzimática encontrada en *M. roreri*, es congruente con lo reportado por Shimonaka *et al.* (2004), quienes determinaron el comportamiento del pH sobre la actividad de la enzima endoglucanasa codificada por el gen PCE1 de *Phycomyces nitens*. El intervalo de pH ensayado fue de 4 a 10, encontrando un pH óptimo de 6.0 para la actividad enzimática de endoglucanasas. La actividad enzimática fue 40% superior entre el intervalo de pH 4.8 y 9.0. De manera similar, se reportó un valor de pH similar para la actividad de los genes endoglucanasa RCE1 y RCE2 de *Rhizopus oryzae* para los cuales la actividad enzimática fue 40% superior entre el intervalo de pH 3.0 a 8.0 (Murashima *et al.*, 2002). PCE1 fue considerado tener valores más altos de pH, mientras RCE1 y RCE2 tiene valores más bajos. Los autores concluyen que dichos resultados indican que PCE1 puede ser una enzima apropiada para uso de detergente (Shimonaka *et al.*, 2004).

Por otra parte Jeya *et al.* (2010), determinó la influencia del pH en el medio de cultivo durante la producción de endoglucanasa a partir de *Penicillium pinophilum* KMJ601. Los valores de pH estudiados estuvieron dentro del intervalo de pH 3.0 a 6.5 a 30°C. Los autores reportaron que como el pH del medio de cultivo incrementaba de 3.0 a 5.0, la actividad de endoglucanasa incrementó a un nivel máximo de actividad específica de 3.7 U/mg proteína a pH 5.0. Además, la producción de endoglucanasa fue significativamente disminuida a valores de pH menores a 5.0.

En relación a la actividad enzimática de endoglucanasa producida por la cepa MRO1 de *M. royeri*, Machado *et al.* (2010), reportaron que la actividad enzimática de endoglucanasa (y también β -glucosidasa y exoglucanasa) expresada por *Penicillium funiculosum* cultivado bajo FES usando bagazo de caña de azúcar como sustrato, mostraron niveles similares de actividad. Las enzimas mostraron mayor poder catalítico a temperaturas dentro del intervalo de 52.6 y 58.4°C y valor de pH óptimo de 4.82 a 4.96 a 37°C.

De acuerdo a lo anterior, en los hongos *P. pinophilum*, *P. funiculosum* y *P. nitens* el nivel máximo de actividad enzimática específica de endoglucanasa, se incrementa a medida que el valor de pH aumenta, siendo el pH de 6.0, el valor óptimo. Dicho comportamiento fue similar al mostrado por la cepa MRO1 de *M. royeri*, debido a que los niveles máximos de actividad enzimática de endoglucanasa fue expresada de pH 7.2 (Figura. 5). Lo cual demuestra que al igual que en otros hongos, la máxima expresión de endoglucanasa en *M. royeri* se da a un intervalo de pH de 6.0 a 7.0.

Rodríguez *et al.* (2007), encontró que *Trichoderma sp.*, muestra actividad enzimática de CMCase, misma que representa la actividad enzimática de endoglucanasa, la cual es activa sobre celulosa. En este caso, los valores de actividad enzimática fueron medidos en el día 10 y 20 de la fermentación, utilizando como sustrato palma de aceite pre-tratado. Los valores de actividad enzimática total fueron de 0.614 y 0.558 U/ml de extracto enzimático respectivamente. Por otro lado, en sustrato no pre-tratado la actividad enzimática total fue de 0.086 U/ml. Cabe mencionar que dichos datos no pueden ser comparados con los obtenidos para la cepa MRO1 de *M. royeri*, pero constituye otro reporte de la expresión de este tipo de enzimas en hongos.

Otros estudios como los realizados por Grey *et al.* (1998); Moldes *et al.* (2003), reportan a los hongos del género *Trametes* sp., como productores de enzimas celulasas y lignolíticas (Grey *et al.*, 1998; Moldes *et al.*, 2003). Machado *et al.*, (2005), reporta que algunas especies como *Trametes versicolor*, *Trametes trogii* y *Trametes gallica*, son eficientes degradadores de celulosa, hemicelulosa y lignina, componentes principales del bagazo de caña.

Rodríguez *et al.* (2007), explica que la reducción de la actividad enzimática durante un proceso de fermentación puede deberse a lo siguiente: 1) La hidrólisis acida de materiales lignocelulíticos genera sustancias inhibitoras del crecimiento de microorganismos, tales como ácido acético y furfural, entre otros (Galbe *et al.*, 2002), y 2) La adsorción de las enzimas por la celulosa y la lignina (Sutcliffe *et al.*, 1986, Chernaglazov *et al.*, 1988), o ser consecuencia de la inhibición por la presencia de azúcares, luego de la hidrólisis ácida de la celulosa. Algunas investigaciones han mostrado que la glucosa y la celobiosa inhiben la actividad enzimática, ya que son los productos de la actividad celulasas (Holtzapfle *et al.*, 1990).

Por otra parte Hu-Hu *et al.* (2004), mencionan que los valores de pH cercanos a 4.0 dificulta o reduce la velocidad de degradación de la celulosa, debido a la inestabilidad de la proteína.

Esto puede explicar porque durante los primeros 23 días del proceso de fermentación, cuando el valor de pH es menor a 6.0, no existe una expresión de la actividad enzimática importante, y es hasta que el valor de pH es ligeramente neutro (aproximadamente alrededor de pH 6.8), cuando se incrementa la expresión de la actividad enzimática a valores superiores de 67.44 mU/mg proteína total.

Troya *et al.* (2000), encontró que el hongo responsable de la pudrición blanda de la madera, *Chaetomium globosum*, expresa una actividad enzimática de 0.08 mU/ml empleando celulosa en sustrato. Dicha actividad es atribuible a la endo- β -1-3(4) glucanasa. Los valores de expresión de actividad enzimática encontrados durante el proceso de fermentación de *M. roreri* usando como BCA como sustrato inductor de la enzima endo- β -1-3(4) glucanasa, son mayores, siendo el valor máximo encontrado de 0.76 mU/ml de extracto enzimático (258 mU/mg de proteína total), lo que representa

una cantidad 9 veces mayor a la producida por el hongo responsable de la pudrición blanca *Chaetomium globosum*.

Marque-Aranque *et al.* (2007) encontraron que los hongos *Trametes* sp., *P. ostreatus* y *A. niger*; presentaban una actividad enzimática de endoglucanasa de 80.72, 10.00 y 11.56 U/g de proteína total a los 19 día de fermentación, respectivamente.

En relación a la biomasa Evans (1981), menciona que el período de incubación es largo, generalmente mayor a un mes, Merchan (1981), confirmó que la aparición de los síntomas externo de este hongos se manifiestan después de 75 días de su infección y que posteriormente después de 4 a 5 días aparece crecimiento de micelio.

Con estos resultados, se demuestra y se acepta que la hipótesis nula planteada es verdadera. Es decir, la cepa MRO1 del hongo *M. roreri* es un fitopatógeno capaz de producir la enzima extracelular endo-1,3(4)- β -glucanasa inducido con BCA como sustrato mediante FES.

Hasta el momento, no se han reportado estudios a cerca del comportamiento de *M. roreri* cultivado bajo FES empleando sustratos inductores de enzimas del complejo celulolítico, por lo que este trabajo constituye el primer reporte de la expresión y presencia de genes codificantes de este tipo de enzimas en el hongo *M. roreri*. Por otro lado, dado que la degradación de la celulosa por hongos requiere de un complejo celulolítico de al menos tres enzimas que actúan en forma sinérgica: β -1,4 endoglucanasa, β -1,4 exoglucanasa y β -glucosidasa, es muy probable que la cepa MRO1 de *M. roreri*, exprese todas las enzimas de este complejo celulolítico, además de la endo-1,3(4)- β -glucanasa. Por lo que este trabajo nos permite abordar una importante línea de investigación sobre este tipo de enzimas no descritas en este hongo.

V.5. LITERATURA CITADA.

- Aiello, C., Ferrer, A y Ledesma A.1996. Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM9414. *Bioresource Technology*, 57, 13–18.
- Barros, N. O. 1975. Influencia del pH en el crecimiento del hongo *Monilia royeri* Cif. & Par. *Noticias Fitopatológicas*. 4:78-88.
- Chernoglazov, V. M., Ernolova OV, Klyosov A. 1988. Adsorption of high purity endo 1,4- β -glucanases from *Trichoderma reesei* on components of lignocellulosic materials: cellulose, lignin and xylan. *Enzyme Microbial Technol.* 10(8): 503-507.
- Da Silva R., C. Franco, M.L., Gomez, E.1997. Pectinases, hemicelulases e celulasas, acao, producao e aplicacao no processamento de alimentos: Revisao. *Bol. SBCTA*. 31:249-60.
- De-Paula, E. H., Ramos,L.P y Azevedo,M. O. 1999. The potential of *Humicola grisea* var *thermoida* for bioconversion of sugar cane bagasse. *Bioresource Technology*, 68, 35–41.
- Díaz, P. C. 2000. La caña de azucar y la ceiba de credos. Balance productivo de la caña de azúcar. *Instituto Ciencia Animal*. pp. 3.
- Du Toit, P. J., Olivier,S. P y Van Bijon P. L.1984. Sugarcane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose, and aminoacid composition. *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 1071–1078.
- Fox, D. J., Gray,P. P., Dunn,N. W y.Marsden,W. L. 1987. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 40, 117-132.
- Galbe, M y Zacchi G. A. 2002. Review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59: 618-628.
- Grey, R., Hofer, C y Schlosser, D. 1998. Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2chloro-1,4-benzoquinona by mycelia and cell-free crude culture liquids of *Trametesversicolor* in relation to extracellular laccase activity. *J. Bas. Microbiol* 6:371-382.
- Gutierrez-Correa, M y Tengerdy,R. P.1997. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*, 19(7), 665–667.

- Holtzaple, M., Cognata, M., Shu, Y y Hendricson, C.1990. Inhibition of *T. reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol Bioeng.* 36: 275-287.
- Holtzaple, M., Jun, J-H., Ashok, G., Patibandla,S. L y Dale, B. E. 1991. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 29:59-74.
- Hu-Hu, Z., Wang,G y Yu, H. 2004. Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values.*Biochem. Eng. J.* 21, 59-62.
- Jeya, M., Joo, A-R., Lee, K-M., Sin, W-I., Oh, D-K., Kim, Y-S., Kim, I-W y Lee J-K.2010.Characterization of endo- β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicilliumpinophilum* KMJ601 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:1005–1014.
- Kaar, W. E., Gutierrez, C. V y Kinoshita C. M. 1998. *Biomass and Bioenergy,* 14,277-287.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Machado, K.M.G., Matheus, D.R y Bononi, V.L.R. 2005. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. *Braz. J. Microbiol.* 36: 246-252.
- Machado, C.A., Lins, M., Gomez,F. L. S y Pereira, N. 2010. Cellulases from *Penicilliumfuniculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37:151–158.
- Márquez-Araque, A.T., Mendoza,M. G.D., Gonzalez, M. S.S., Buntinx,D. S.E., Loera C. O. 2007. Actividad fibriolítica de enzimas producidas por *Trametessp.* EUM1, *Pleorotusostreatus* IE8 y *Aspergillusniger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia.* 32:780-785.
- Martin, C., Galbe, M., Wahlbom, C. F., Hahn-Hagerdal, B y Jonsson, L. 2002.*Enzyme and Microbial Technology,* 31,274-282.
- Maldonado, M.C., Strasser de Saad, A.M y Callieri, D.A.S. 1996. Effects of aeration and agitation on the production of pectinesterase, polygalacturonase and pectinlyase by a strain of *Aspergillus niger*. *Microbiol.-Alim.-Nutrit.,* 14, 373-379.
- Menezes, T.J.B. 1997.Os fungos na industria. *Bol. SBCTA.* 31:116-120.

- Moldes, D., Gallego, P. P., Rodríguez, C. S., Sanrom, A. 2003. Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsute*. *Biotechnol. Lett.* 25:491-495.
- Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Koga, J., Moriya, T., Sumida, N., Aguchi, T y Kono, T. 2002. Purification and characterization of new endo-1,4- β -D-glucanase from *Rhizopus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* 30:319-326.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P y Soccol, V. T. 2000. Biotechnological potential of agroindustrial residues I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 74, 69–80.
- Phillips-Mora, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.*, as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. PhD thesis. Department of Agricultural Botany, School of Plant Sciences. The University of Reading, RG6, UK.
- Ramos, A.M., Forchassin, F y Ranalli, M.E., 1999. Uso de isoenzimas de endo-1,4-D-glucanasa y variables fisiológicas para la delimitación de especies del género *Saccobolus*. *POLIBOTANICA*. 10:23-38.
- Rodríguez, G. I y Piñeros, C. Y. 2007. Production of enzymatic complex in solid state fermentation by *Trichoderma* sp. Using palm oil empty fruit bunch (EFB) as substrate. *Rev. Facultad de química farmacéutica*. 2:35-42.
- Shimonaka, A., Baba, Y., Koga, J., Nakane, A., Kubota, H y Kono, T. 2004. Molecular cloning of a gene encoding endo- β -D-glucanase PCE1 from *Phycomyces nitens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 11:2299-2305.
- Sutcliffe, R y Saddler J. N. 1986. The role of lignin in the adsorption of cellulases during enzymatic treatment of lignocellulosic material. *Biotechnol. Bioengng Syrup.* 17: 749-762.
- Tiburcio, R.A., Lacerda, C. G.G., Falsarella, C. M., Costa, M. J.M., Schuster S.C., Carlson, J.E., Guiltinan, M.J., Bailey, B. A., Piotr, M. P., Lyndel, W., Meinhardt, L.W y Guimaraes, P G.C. 2009. Genes Acquired by Horizontal Transfer Are Potentially Involved in the Evolution of Phytopathogenicity in *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri*, two of the major pathogens of Cacao. *J. Mol. Evol.* 70:85-97.

Troya, T., Muñoz-Mingarro, D., Llinares, F., Rodriguez, B., Yuste, M y Rubio, F. 2000. Deteccion de actividades enzimáticas lignoceluliticas de *Chaetomium spp.* Invest. Agr. Sist. Recur. For.9:1.

Van Zyl, C., Prior, B. A y Dupreez J. C. 1988. Applied Biochemistry and Biotechnology. 17:357-369.

CAPITULO VI

VI.1. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES GENERALES.

VI.1.1. CONCLUSIONES.

1. La amplificación y secuenciación del gen 18S ADNr y la región ITS1-5.8S ADNr-ITS2, permitió la identificación molecular del hongo *M. roreri* en la cepa MRO1.
2. La amplificación y secuenciación del gen *MrGLU1* permitió conocer que la cepa MRO1 de *M. roreri*, posee al menos un gen codificante de una enzima endo 1,3(4)- β -glucanasa putativa descrita como mrGLU1.
3. La cepa MRO1 de *M. roreri* produce enzimas extracelulares con actividad endo-1,3(4)- β -glucanasa cultivado bajo el sistema FES usando BCA como substrato inductor.

ANEXOS

Anexo 1: Registro GenBank NCBI de *Moniliophthora roreri* Cepa MRO1 No. Acceso JF730693 gen 18S ADNr.

Moniliophthora roreri strain MRO1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JF730693.1

FASTA Graphics

[Go to:](#)

```

LOCUS       JF730693                1768 bp    DNA        linear    PLN 30-MAY-2011
DEFINITION Moniliophthora roreri strain MRO1 18S ribosomal RNA gene, partial
            sequence.
ACCESSION   JF730693
VERSION     JF730693.1  GI:333975534
KEYWORDS    .
SOURCE      Moniliophthora roreri
            ORGANISM  Moniliophthora roreri
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;
            Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Marasmiaceae;
            mitosporic Marasmiaceae; Moniliophthora.
REFERENCE   1 (bases 1 to 1768)
AUTHORS     Sanchez,H., Bautista,C., Boldo,X., Ortiz,F., Ramos,J. and
            Carrera,D.
TITLE       Endo-1,4-beta-glucanases enzymatic activity from Moniliophthora
            roreri grown in solid state fermentation
JOURNAL     Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 1768)
AUTHORS     Sanchez,H., Bautista,C., Boldo,X., Ortiz,F., Ramos,J. and
            Carrera,D.
TITLE       Direct Submission
JOURNAL     Submitted (25-MAR-2011) Ciencia de Alimentos e Ingenieria, Colegio
            de Postgraduados, Periferico Carlos A. Molina, Km 3.5 Carr.
            Cardenas-Huimanguillo, H. Cardenas, Tabasco 86500, Mexico
FEATURES    source              1..1768
            /organism="Moniliophthora roreri"
            /mol_type="genomic DNA"
            /strain="MRO1"
            /host="Theobroma cacao L."
            /db_xref="taxon:"
            rRNA                 <1..>1768
            /product="18S ribosomal RNA"
ORIGIN      1 agtagtcata tgcctgtctc aaagattaag ccatgcatgt ctaagtataa acaagtttgt
            61 actgtgaaac tgcgaatggc tcattaatac agtttatagt tatttgatga taccttgcta
            121 catggataac tgtggtaatt ctagagctaa tacatgcatt aaagccccga ctctggggag
            181 ggggtgattt attagataaa aaaccaacgc ggctcgccgc tcacttggtg attcataata
            241 acttctcgaa tcgcatggcc ttgtgccggc gatgcttcac tcaaatatct gccctatcaa
            301 ctttcgatgg taggatagag gcctaccatg gtttcaacgg gtaacgggga ataagggttc
            361 gattccggag agggagcctg agaaacggct accacatcca aggaaggcag caggcgccga
            421 aattacccaa tcccagacag gggaggtagt gacaataaat acaatatag ggctcttttg
            481 ggtcttataa ttggaatgag tacaatttaa atccctaac gaggaacaat tggagggcaa
            541 gtctggtgcc agcagccgag gtaattccag ctccaatagc gtatattaaa gttggtgcag
            601 ttataaaggt cgtagttgaa ctccagccct ggttgggagg tccgctaac ggcgtgtact
            661 gtctgactgg gtcttacctc ttggtgagcc ggctgcccct ttattgggtg gcgtcgggga
            721 accaggactt ttaccttgag aaaatttagag tgttcaaagc aggcctatgc ctgaatacat
            781 tagcatggaa taatagaata ggacgtgcgg ttctattttg ttggtttcta gagtgcgcgt
            841 aatgattaat agggatagtt gggggcattg gtattgagtc gctagagggtg aaattcttgg
            901 attgactcaa gaccaactac tgcgaaagca tttgccagg atgttttcat taatcaagaa
            961 cgaaggtagt gggatcgaaa acgatcagat accgttgtag tcttaacagt aaactatgcc
            1021 gactagggat cggacgacct caattttgat gcgtcgttcg gcaccttacg agaaatcaaa
            1081 gtctttgggt tctgggggga gtatggctgc aaggctgaaa cttaaaggaa ttgacggaag
            1141 ggcaccacca ggtgtggagc ctgcccgtta atttgactca acacggggaa actcaccagg
            1201 tccagacata actaggattg acagattgat agctctttca tgattttatg ggtgggtggtg
            1261 catgcccgtt cttagttggt ggagtgattt gtctggttaa ttccgataac gaacgagacc
            1321 ttaacctgct aaatagacag gccgactttg gttggcctcc gtcttcttag agggactgtc
            1381 agcgtctagc tgcggaagt ttgaggcaat aacaggtctg tgatgccctt agatgtttctg
            1441 ggccgcacgc gcgctacact gacagagcca gcgagtgcc accttggccg aaaggctctgg
            1501 gtaatcttgt gaaactctgt cgtgctgggg atagagcatt gcaattattg ctcttcaacg
            1561 aggaatacct agtaagcgca agtcatcagc ttgctgtgat tacgtccctg ccctttgtac
            1621 acaccgcccg tcgctactac cgattgaagt gcttagtgag gtctccggat tggtctcggg
            1681 gagccggcaa cggcaccctg tcgctgagaa gttgatcaaa cttaggtcatt tagaggaagt
            1741 aaaagtcgta acaaggtttc cgtaggtg
    
```

//

Anexo 2: Registro GenBank NCBI de *Moniliophthora roreri* Cepa MRO1 No. acceso JF769489 gen 18S ADNr ITS1-5.8-ITS2

Moniliophthora roreri strain MRO1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JF769489.1

FASTA Graphics

LOCUS JF769489 758 bp DNA linear PLN 29-MAY-2011

DEFINITION Moniliophthora roreri strain MRO1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JF769489

VERSION JF769489.1 GI:333906186

KEYWORDS

SOURCE Moniliophthora roreri

ORGANISM

Moniliophthora roreri
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Marasmiaceae; mitosporic Marasmiaceae; Moniliophthora.

REFERENCE 1 (bases 1 to 758)

AUTHORS Sanchez,H., Bautista,C., Boldo,X., Ortiz,F., Ramos,J. and Carrera,D.

TITLE Endo-1,4-beta-glucanases enzymatic activity from Moniliophthora roreri grown in solid state fermentation

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 758)

AUTHORS Sanchez,H., Bautista,C., Boldo,X., Ortiz,F., Ramos,J. and Carrera,D.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (04-APR-2011) Ciencia de Alimentos e Ingenieria, Colegio de Postgraduados, Periferico Carlos A. Molina, Km 3.5 Carr. Cardenas-Huimanguillo, H. Cardenas, Tabasco 86500, Mexico

FEATURES

source

Location/Qualifiers
1..758
/organism="Moniliophthora roreri"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="MRO1"
/isolation_source="Theobroma cacao L."
/db_xref="taxon:"
/country="Mexico"
/PCR_primers="fwd_name: mITS1F, fwd seq:
ttcccgtaggagaacctgc, rev_name: pITS4R, rev_seq:
tcctccgcttattgatatgc"

rRNA

<1..32
/product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA

33..248
/product="internal transcribed spacer 1"

rRNA

249..409
/product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA

410..700
/product="internal transcribed spacer 2"

rRNA

701..>758
/product="28S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 ttcccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat tattgaaaac attgtaaagg aggttttgag
61 ctggctcttc ttaggggcat gtgctcgcg accttcaatc ttcacccacc tgtgaacctt
121 ttgtagtgga ttctggaacg ggaggcgctt gcgtttttctc agtacggagt ctcaactatgt
181 ttttaacacac acttaatgta tgtttagaat gtgtatttta ttgggactta attgacctt
241 taaaaactat acaacttca gcaacggatc tcttggctct cgcacgatg aagaacgcag
301 cgaaalgcga taagtaagt gaattgcaga attcagtgaa tcatcgaatc tttgaacgca
361 ccttgcgcct cttggtatc cgagaggcat gctgtttga gtgtcattaa attctcaacc
421 tcaaaaagct ttttcggctt tgtttgagga ttggatgtga gggttgctgg ctttttgaat
481 aaagatcgg ctcccctgaa atgcattagt gaaaccgggt tggtagacca cattgggtgtg
541 ataattatct atgccattag tctacgtttt ttcgaatgct ggctagcta acacttcggt
601 ttgggggggc ttgcaagttt gtaatgaacc tgctctctct gttattgaac ggtatctgct
661 tcaaacgtc ctaagtttat tggacaacaa ttagatcatt ttgacctca atcaggtaga
721 actaccgct gaaattaagc atatcaataa gcggagga

```

//

Anexo 3: Registro GenBank NCBI de *Moniliophthora perniciosa* FA553 No. Acceso XM_002389314. Secuencia utilizada para el diseño de los oligonucleótidos iniciadores para la amplificación del gen Endo 1, 3(4)- β -glucanasa.

Moniliophthora perniciosa FA553 hypothetical protein (MPER_11525) mRNA, complete cds

NCBI Reference Sequence: XM_002389314.1

FASTA *Genbank*

Go to:

LOCUS XM_002389314 711 bp mRNA linear PLN 28-MAY-2009
 DEFINITION Moniliophthora perniciosa FA553 hypothetical protein (MPER_11525) mRNA, complete cds.
 ACCESSION XM_002389314
 VERSION XM_002389314.1 GI:238580653

KEYWORDS
 SOURCE Moniliophthora perniciosa FA553
 ORGANISM Moniliophthora perniciosa FA553
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Marasmiaceae; mitosporic Marasmiaceae; Moniliophthora.

REFERENCE 1 (bases 1 to 711)
 AUTHORS Mondego, J.M., Carazzolle, M.F., Costa, G.G., Formighieri, E.F., Parizzi, L.P., Rincones, J., Cotomacci, C., Carraro, D.M., Cunha, A.F., Carrer, H., Vidal, R.O., Estrela, R.C., Garcia, O., Thomazella, D.P., de Oliveira, B.V., Pires, A.B., Rio, M.C., Araujo, M.R., de Moraes, M.H., Castro, L.A., Gramacho, K.P., Goncalves, M.S., Neto, J.P., Neto, A.G., Barbosa, L.V., Guiltinan, M.J., Bailey, B.A., Meinhardt, L.W., Cascardo, J.C. and Pereira, G.A.
 TITLE A genome survey of Moniliophthora perniciosa gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao
 JOURNAL BMC Genomics 9, 548 (2008)
 PUBMED 19019209
 REMARK Publication Status: Online-Only

REFERENCE 2 (bases 1 to 711)
 AUTHORS Mondego, J.M.C., Carazzolle, M.F., Costa, G.G.L., Formighieri, E.F., Parizzi, L.P., Rincones, J., Cotomacci, C., Carraro, D.M., Cunha, A.F., Carrer, H., Vidal, R.O., Estrela, R.C., Garcia, O., Thomazella, D.P.T., de Oliveira, B.V., Pires, A.B.L., Rio, M.C.S., Araujo, M.R.R., de Moraes, M.H., Castro, L.A.B., Gramacho, K.P., Goncalves, M.S., Neto, A.G., Barbosa, L.V., Guiltinan, M.J., Bailey, B.A., Meinhardt, L.W., Cascardo, J.C.M. and Pereira, G.A.G.
 CONSRTM Moniliophthora perniciosa genome project
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (19-AUG-2008) Laboratorio de Genomica e Expressao, Departamento de Genetica e Evolucao, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitaria Zeferino Vaz, Campinas, Sao Paulo 13083-970, Brasil

COMMENT PROVISIONAL : This record has not yet been subject to final NCBI review. record is derived from an annotated genomic sequence (NW_002488457).
 COMPLETENESS: incomplete on both ends.

FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..711
 /organism="Moniliophthora perniciosa FA553"
 /mol_type="mRNA"
 /strain="FA553"
 /db_xref="taxon:"
 /biotype="C"
 <1..>711
 /locus_tag="MPER_11525"
 /db_xref="GeneID:7930809"
 1..711
 /locus_tag="MPER_11525"
 /note="AutoFACTv3.4 (automatic product annotation): Endo-1,3(4)-beta-glucanase, putative"
 /codon_start=1
 /product="hypo ein"
 /protein_id="X"
 /db_xref="GI:"
 /db_xref="GeneID:7930809"
 /translation="MWSQLLAVTIWAIQVIGOHVRTQEYSGSDFSTWEYNGGVGNST
 TGNACFVDEDTAMQORLTFIESSTGHAIIRIDTTTIEAGSFARRNSVRITSRDAYPI
 GSLIIMDVIHMPYGC SVLPSFRTSGTDITRPHGGDIAIIESEDGLSMNPNMAYLTD
 A GCTQPSYAAQSGSTVERDCSAPSQGRVEQTPDQSSGRELA EAGGGIFAAQIDTTGIFI
 WFWSRDNAPASISKSRPS"

ORIGIN
 1 atgtggctccc aattactcgc tgctactata tgggccattc aagttatlgg acaacacaga
 61 gtgactcaag agtactctgg ctccagacttc ttctcgacat gggagtagaa cgggtggagtc
 121 ggaacacagta caacaggaaa tgcacaattt gtcgacgaag ataccgccat gcagcagagg
 181 ctgacgttca tagagtcgtc aacaggtcat gctatcattc gcatagatga taccacgaca
 241 atcgaagctg gatcattcgc tcgctcgaac tcggtcagaa ttacttcaag ggatgcatat
 301 cctattggaa gcttgatcat catggacgctc attcacatgc cttatggatg ctccgtatta
 361 ccttcattca gaacatcagg caccgatatt acacggcctc atggaggcga tattgccatc
 421 atagaatctg aggacggtct ctcgatgaac ccaattaca tggccctata tcagatgct
 481 ggttgtagcc agccgtctta tgctgclcaa agcggcgaga ccgtagaacg gattgcatg
 541 gcccttccg gttggcgtgt ggaacaacac gatcctcaa gttccggaag agagctcgcc
 601 gaggctggtg gtgggatttt cgctgctcaa attgatacga ccggaatctt catatggttt
 661 tggagtcgag ataatgcacc ggcttcata tccaaatcca ggcctatgta g

Anexo 4: Registro GenBank NCBI de *Moniliophthora perniciosa* FA553 No. Acceso XM_002392166. Secuencia utilizada para el diseño de los oligonucleótidos iniciadores para la amplificación del gen Endo 1, 3(4)- β -glucanasa.

Moniliophthora perniciosa FA553 hypothetical protein (MPER_08251) mRNA, partial cds

NCBI Reference Sequence: XM_002392166.1

FASTA Graphics

Go to

LOCUS XM_002392166 675 bp mRNA linear PLN 28-MAY-2009
DEFINITION Moniliophthora perniciosa FA553 hypothetical protein (MPER_08251) mRNA, partial cds.
ACCESSION XM_002392166
VERSION XM_002392166.1 GI:238590072
KEYWORDS
SOURCE Moniliophthora perniciosa FA553
ORGANISM Moniliophthora perniciosa FA553
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Marasmiaceae; mitosporic Marasmiaceae; Moniliophthora.
REFERENCE 1 (bases 1 to 675)
AUTHORS Mondego, J.M., Carazzolle, M.F., Costa, G.G., Formighieri, E.F., Parizzi, L.P., Rincones, J., Cotomacci, C., Carraro, D.M., Cunha, A.P., Carrer, H., Vidal, R.O., Estrela, R.C., Garcia, O., Thomazella, D.P., de Oliveira, B.V., Pires, A.B., Rio, M.C., Araujo, M.R., de Moraes, M.H., Castro, L.A., Gramacho, K.P., Goncalves, M.S., Neto, J.P., Neto, A.G., Barbosa, L.V., Guiltinan, M.J., Bailey, B.A., Meinhardt, L.W., Cascardo, J.C. and Pereira, G.A.
TITLE A genome survey of Moniliophthora perniciosa gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao
JOURNAL BMC Genomics 9, 548 (2008)
PUBMED 19019209
REMARK Publication Status: Online-Only
REFERENCE 2 (bases 1 to 675)
AUTHORS Mondego, J.M.C., Carazzolle, M.F., Costa, G.G.L., Formighieri, E.F., Parizzi, L.P., Rincones, J., Cotomacci, C., Carraro, D.M., Cunha, A.P., Carrer, H., Vidal, R.O., Estrela, R.C., Garcia, O., Thomazella, D.P.T., de Oliveira, B.V., Pires, A.B.L., Rio, M.C.S., Araujo, M.R.R., de Moraes, M.H., Castro, L.A.B., Gramacho, K.P., Goncalves, M.S., Neto, A.G., Barbosa, L.V., Guiltinan, M.J., Bailey, B.A., Meinhardt, L.W., Cascardo, J.C.M. and Pereira, G.A.G.
CONSRM Moniliophthora perniciosa genome project
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-AUG-2008) Laboratorio de Genomica e Expressao, Departamento de Genetica e Evolucao, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitaria Zeferino Vaz, Campinas, Sao Paulo 13083-970, Brasil
COMMENT PROVISIONAL REFSEQ: This record has not yet been subject to final NCBI review. This record is derived from an annotated genomic sequence (NW_002492007).
COMPLETENESS: incomplete on both ends.
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..675
/organism="Moniliophthora perniciosa FA553"
/mol_type="mRNA"
/strain="FA553"
/db_xref="taxon:"
/biotype="C"
<1..>675
/locus_tag="MPER_08251"
/db_xref="GeneID:"
1..>675
/locus_tag="MPER_08251"
/note="AutoFACTv3.4 (automatic product annotation):Endo-1,3(4)-beta-glucanase, putative"
/codon_start=1
/product="hypothetical protein"
/protein_id="XP_002392207.1"
/db_xref="GI:238590073"
/db_xref="GeneID:7925934"
/translation="MKWRSRTTQLSLIFLQIRAVLGLYEPIREYSGQDFFSEWDFTS
VDS TTSGNVQYLDQSAATQRLAFVDSSSGHAIVRVDNITKLEDGPSVHRNSVKIISK
DAYPIGSLIIIDAVHIPYGC SVWPAFWTLGTELGWPHAGEIDIIEGINGMTNSMVMH
TDPGCTQSANVSQSGKTLDTDCGTAVGCKVEDTKPNSYGPFGAQGGGVFATQIDVSG
VFIWFWS"
ORIGIN
1 atgaagtqga gatccagaac aaccagctt tccttcatt tccttcaaat ccggggcggtc
61 cttggccttt acgagccaat tcggaatac tcttggtcaag atttcttctc ggagtgggac
121 tttactagcg ggggtgacag taccaacgagc ggaatgtgc aatacctcga ccagagcgcc
181 gctacacaac aacggctagc gttcgtgac tcttctctc ggcattgctat cgtccgagtc
241 gataatacca cgaaactcga agatgggtcca tccggtcctc gtaattcagt aaagatcctc
301 tcaaaagatg cgtatcccat cggaagcctg atcatcatag atgccgttca cataccctat
361 ggatgctcag tatggcccgc attctggaca ctgggaaccg agctcggttg gcctcatgct
421 ggagagatcg acatcataga gggatcaaac ggcattgacta gcaatagtat ggtgatgcac
481 accgatcccc gctgtacgca atccgccaac gtctcccaga gtggaaaaac ccttgatcag
541 gattgtggta ccgcccgtgg ttgtaaagta gaagacaca agcccaacag ctatggcctc
601 gggtttcgca aggccggagg aggcgtgttt gccactcaga tcgacgtctc ggggtgtttc
661 atatggtttt ggagt

//

Anexo 5: Registro GenBank NCBI de la secuencia MrGLU1 No. Acceso JN029800 que codifica la proteína mrGLU1 con función Endo 1, 3(4)-β-glucanasa.

Display Settings: GenBank

Moniliophthora roreri strain MRO1 endo-1,3 (4)-beta-glucanase-like (GL

GenBank: JN029800.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

LOCUS JN029800 747 bp DNA linear PLN 27-JUL-2011
 DEFINITION Moniliophthora roreri strain MRO1 endo-1,3 (4)-beta-glucanase-like (GLU1) gene, partial sequence.
 ACCESSION JN029800
 VERSION JN029800.1 GI:340919053
 KEYWORDS .
 SOURCE Moniliophthora roreri
 ORGANISM Moniliophthora roreri
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;
 Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Marasmiaceae;
 mitosporic Marasmiaceae; Moniliophthora.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 747)
 AUTHORS Sanchez,H., Bautista,C., Boldo,X., Ortiz Garcia,C.F., Ramos,J.A. and Carrera,D.C.
 TITLE Endo-1,4-beta-glucanase enzymatic activity from Moniliophthora roreri grown in solid state fermentation with sugarcane bagasse as a substrate
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 747)
 AUTHORS Sanchez,H., Bautista,C., Boldo,X., Ortiz Garcia,C.F., Ramos,J.A. and Carrera,D.C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-MAY-2011) Ciencia de Alimentos e Ingenieria, Colegio de Postgraduados, Periferico Carlos A. Molina, Km 3.5 Carr. Cardenas-Huimanguillo, H. Cardenas, Tabasco 86500, Mexico
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..747
 /organism="Moniliophthora roreri"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="MRO1"
 /host="Theobroma cacao L."
 /db_xref="taxon:_____"
 /country="Mexico"
 <1..>747
 /gene="GLU1"
 <1..>747
 /gene="GLU1"
 /note="similar to endo-1,3 (4)-beta-glucanase; MrGLU1"
 ORIGIN
 1 ctggttcaga tttcttctcg aatgggagt acgatgggtg agtcgcaaga ggtacattta
 61 tcgttccctg gtcataagaa agttcaccca ggattcactt tcacaggcaa cgcacaattt
 121 gtcgacgaaa acaccgccat acagcagaag ctgacggttc tagaatcctc gacaggctat
 181 gctatcggtc gtgtagacaa taccacgagc gttggagctg ggtcgttcgc tcgcccgaac
 241 tcagtcagtg cttctgattt gcgtcaaggt atcactaagt attaatctg ccgtttctcc
 301 aggtcagaat tacttcaaag gatgcatatc ctattgggag tctcatcctc atggacgtca
 361 ttcacatgcc ttatggatgc tccgtatgtg ttgatttttg agtctacacc tcaattgatg
 421 tgttctccta aggtattacc ttcgttcagg acatcgggca acagtattac acggcctcat
 481 gcaggcgaaa tcgccatcat agaaaactgag gatggtatct ctatgaacct taattacatg
 541 gccctgtata cagatgetgg ttgtatccag tcttctatg ctgtccaaag cggcagcacc
 601 gtaqaacgga attgcagtc cgcacctcgtg tgccgtgtgg aacaaaccga tccctgaaagt
 661 tccggaagtg agctcgccga ggctggtggt gggattttcg ctgctcaaat tgatctgccc
 721 cggatcttca tatgggtttg gagtcgc

//

Anexo 6: Alineamiento de las secuencias de *Moniliophthora perniciosa* FA553 No. Acceso XM_002392166 y XM_002389314. Utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos iniciadores para la amplificación del gen Endo 1, 3(4)- β -glucanasa.

```

                *           20           *           40
XM_0023921 : ATGAAGTGGAGATCCAGAACAACCCAGCTATCCCTCATTTT : 41
XM_0023893 : -----ATGTGGTCCCAATTACTCGCTGTAC : 26
                A           CCA TA C T

                *           60           *           80
XM_0023921 : CCTTCAAATCCGGGCGTCTTGGCCTTTACGAGCCAATTC : 82
XM_0023893 : TATATGGGCCATTCAAGTATTGGACAACACAGAGTGACTC : 67
                T           C           GT TTGG C           AC           A TC

                *           100          *           120
XM_0023921 : GCGAATACTCTGCTCAAGATTTCTTCTCGGAGTGGGACTTT : 123
XM_0023893 : AAGAGTACTCTGGCTCAGACTTCTTCTCGACATGGGAGTAC : 108
                GA TACTCTGG           AGA TTCTTCTCG           TGGGA T

                *           140          *           160
XM_0023921 : ACTAGCGGGGTTGACAGTACCACGAGCGGAAATGTGCAATA : 164
XM_0023893 : AACGGTGGAGTCCGAAACAGTACAACAGGAAATGCACAATT : 149
                A           G GG GT G           A A           AC A           GGAAATG           CAAT

                *           180          *           200
XM_0023921 : CCTCGACCAGAGCGCCGCTACACAACAACGGCTAGCGTTCC : 205
XM_0023893 : TGTTCGACGAAGATACCGCCATGCAGCAGAGGCTGACGTTCA : 190
                TCGAC A           CCGC A           CA CA           GGCT           CGTTC

                *           220          *           240
XM_0023921 : TCGACTCTTCCTCTGGGCATGCTATCGTCCGAGTTCGATAAT : 246
XM_0023893 : TAGAGTCGTCAACAGGTATGCTATCATTCCGATAGATGAT : 231
                T GA TC TC           C GG CATGCTATC T CG           T GAT AT

                *           260          *           280
XM_0023921 : ACCACGAAACTCGAAGATGGTCCATCCGTTTCATCGTAATTC : 287
XM_0023893 : ACCACGACAATCGAAGCTGGATCATTCGCTCGTTCGAAACTC : 272
                ACCACGA A TCGAAG TGG           CAT CG TC TCG AA TC

                *           300          *           320
XM_0023921 : AGTAAAGATCATCTCAAAAATGCGTATCCCATCGGAAGCC : 328
XM_0023893 : GGTGAGAATTACTTCAAGGATGCATATCCATGGAAGCT : 313
                GT A           AT A           TCAA           GATGC TATCC AT GGAAGC

                *           340          *           360
XM_0023921 : TGATCATCATAGATGCCGTTACATACCTTATGGATGCTCA : 369
XM_0023893 : TGATCATCATGGACGTCATTCACATGCCTTATGGATGCTCC : 354
                TGATCATCAT GA G C TTCACAT CCTTATGGATGCTC

```



```

*           380           *           400           *
XM_0023921 : GTATGGCCCCTCATTCTGGACACTGGGAACCGAGCTCGGTTG : 410
XM_0023893 : GTATTACCTTCATTTCAGAACATCAGGCACCGATATTACACG : 395
GTAT  CC  CATTCT  G  ACA  GG  ACCGA  T  G

           420           *           440           *
XM_0023921 : GCCTCATGCTGGAGAGATCGACATCATAGAGGGTATCAACG : 451
XM_0023893 : GCCTCATGGAGGCGATATTGCCATCATAGAATCTGAGGACG : 436
GCCTCATG  GG  GA  AT  G  CATCATAGA  T  ACG

           460           *           480           *
XM_0023921 : GC-----ATGACTAGCAATAGTATGGTGATGCACACCCGAT : 486
XM_0023893 : GTCTCTCGATGAACCCCAATTACATGGCCCTATATACAGAT : 477
G  ATGA  CAAT  ATGG  T  A  AC  GAT

           500           *           520           *
XM_0023921 : CCCGGCTGTACGCAATCCGCCAACGTCTCCAGAGTGGAAA : 527
XM_0023893 : GCTGGTTGTACCCAGCCGTCTTATGCTGCTCAAAGCGGCAG : 518
C  GG  TGTAC  CA  C  C  A  G  C  CA  AG  GG  A

           540           *           560           *
XM_0023921 : AACCCCTTGATACGGATTGTGGTACCGCCGTGGGTTGTAAAG : 568
XM_0023893 : CACCGTAGAACGGGATTGCAGTGCCCCCTTCCGGTTGCCGTG : 559
ACC  T  GA  GGATTG  GT  CC  C  GGTTG  G

           580           *           600           *
XM_0023921 : TAGAAGACACAAAGCCCAACAGCTATGGCCCTGGGTTTGGC : 609
XM_0023893 : TGGAACAAACCGATCCTCAAAGTTCCGGAAGAGAGCTCGCC : 600
T  GAA  A  AC  A  CC  A  AG  T  GG  G  G  T  GC

           620           *           640           *
XM_0023921 : CAGGCCGGAGGAGGCGTGTGTTTGCCTCAGATCGACGTCTC : 650
XM_0023893 : GAGGCTGGTGGTGGGATTTTCGCTGCTCAAATTGATACGAC : 641
AGGC  GG  GG  GG  T  TT  GC  CTCA  AT  GA  C

           660           *           680           *
XM_0023921 : CGGTGTTTTTCATATGGTTTTGGAGT----- : 675
XM_0023893 : CGGAATCTTCATATGGTTTTGGAGTCGCGATAATGCACCGG : 682
GG  T  TTCATATGGTTTTGGAGT

           700           *           720
XM_0023921 : ----- : -
XM_0023893 : CTTCCATATCCAAATCCAGGCCATCGTAG : 711

```

Anexo 7: Formula para calcular la actividad enzimática

Actividad total (U/ml^{-1}).

$$U/ml = \frac{(\text{Abs } 540 \text{ nm}) (\text{factor de dilución})(\text{factor de la curva } 0.445)}{(\text{Tiempo de incubación})}$$

Actividad específica ($Umg^{-1} \text{proteína total}$)

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