



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

TÍTULO:

**“ESTUDIO DE LAS PROTEASAS INTRACELULARES ESPECIFICAS
DEL HONGO PATÓGENO DEL MAÍZ, *Sporisorium reilianum*”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :
CRISTINA GUADALUPE MENDOZA MELGOZA**

DIRECTOR:

DRA: YURIDIA MERCADO FLORES

MINERAL DE LA REFORMA

2009

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo fue financiado por el FOMIX-CONACyT Gobierno del Estado de Hidalgo Clave FOMIX-HGO-2005-C01-16 y el Fondo de Ciencia Básica CONACyT Clave J51711-Z.

Agradezco al Dr. Gerardo Leyva Mir de la Universidad Autónoma de Chapingo por haber donado la cepa *Sporisorium reilianum* utilizada en este trabajo, de igual forma a la Dra. Lourdes Villa Tanaca de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas de IPN, por haber donado la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Gracias a la Doctora Yuridia Mercado Flores por haberme aceptado en este proyecto de investigación, y tener el tiempo y la paciencia necesaria para dirigirme durante este trabajo, he aprendido admirar a una gran mujer tanto profesional como personalmente.

Agradezco a Dios por haberme dado la vida y a una familia maravillosa, a mis padres, José y Francisca que sin ellos no sería lo que soy, me guiaron por el camino del bien, me confortaron para seguir siempre adelante viendo mis logros y no mis caídas, creyendo en mí, animándome a luchar por mis sueños, a mis hermanos, Edy, Mily y Oscar que siempre estuvieron ahí con una mano en donde apoyarme, hoy que termino una meta más de mi vida me doy cuenta que sin ustedes no lo habría logrado por tal razón mis metas son sus metas, en sí a toda mi familia gracias, los amo.

Gracias Marisela y Vianey, mis grandes amigas que juntas nos animamos y retamos una a la otra para seguir siempre adelante, que siempre encontraron palabras de ánimo, no imaginan lo valiosas que estas fueron para mi y cuando me sentía sola lejos de mi familia, siempre estuvieron conmigo, gracias por ser como son y sobre todo por ser mis amigas, las quiero mucho.

En sí a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron para la realización de este trabajo, mil gracias.

Este logro se lo dedico a mis padres y hermanos que sin dudar me apoyaron, confiaron y siempre tuvieron una palabra de aliento.

CONTENIDO

Agradecimientos.....	2
Abreviaturas.....	6
Resumen.....	7
I. Introducción.....	8
I.1. La proteólisis.....	8
I.2. Proteasas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
II. Antecedentes.....	12
III. Justificación.....	20
IV. Objetivos.....	21
V. Material y Métodos.....	22
V. 1. Técnicas microbiológicas.....	22
V. 2. Técnicas de biología molecular.....	22
V. 3. Técnicas bioquímicas.....	23
VI. Resultados.....	27
VI.1. Identificación de la cepa de <i>S. reilianum</i>	27
VI.2. Pruebas en placa para revelar la actividad de psrAPE, psrDAP y psrCP de <i>S. reilianum</i>	29
VI. 3. Cinéticas de producción de psrAPE, psrDAP y psrCP de <i>S. reilianum</i>	30
VI. 4. Fraccionamiento y localización celular de las proteasas psrAPE, psrDAP y psrCP	41
V. 5. Efecto de inhibidores específicos de proteasas sobre las actividades de psrAPE, psrDAP y psrCP de <i>S. reilianum</i>	42
VIII. Discusión.....	44
IX. Conclusión.....	48
X. Referencias.....	50
XI. Anexos.....	60

ABREVIATURAS

psrAPE: Aminopeptidasa de *Sporisorium reilianum*.

psrDAP: Dipeptodilaminopeptidasa de *Sporisorium reilianum*.

psrCP: Carboxipeptidasa de *Sporisorium reilianum*.

PMSF: Fluoruro de fenilmetil sulfonilo, inhibidor de serín proteasas

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético, inhibidor de métalo proteasas.

E-64: Inhibidor de cisteín proteasas

YPD: Extracto de levadura, peptona y dextrosa (medio de cultivo)

PDA: Papa Dextrosa Agar (medio de cultivo)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

UV: Ultravioleta

RESUMEN

Sporisorium reilianum (Langdon, 1978), es el agente causal del “carbón de la espiga” una enfermedad que se caracteriza por la presencia de masas carbonosas de color negro en mazorcas y en espigas, este cereal ocupa el segundo lugar a nivel mundial después del trigo como fuente de alimentación humana, es por eso la importancia del estudio de las enfermedades y plagas que lo afectan. En el presente trabajo se determinó la producción de las proteasas intracelulares de tipo específico carboxipeptidasa (psrCP), aminopeptidasa (psrAPE) y dipeptidilaminopeptidasa (psrDAP) de este hongo. Se trabajó con una cepa aislada de Mixquiahuala Hgo., que fue identificada mediante PCR. Se determinó la actividad de las proteasas antes mencionadas en diferentes medios de cultivo (YPD y medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno peptona, infusión de maíz, sulfato de amonio y prolina). El mejor medio para la producción de las tres enzimas resultó ser YPD. A partir de un fraccionamiento celular se encontró que la psrAPE se encuentra localizada en la fracción soluble y se inhibe con inhibidores de metalo proteasas y serín proteasas lo cual puede indicar una mezcla de enzimas con la misma actividad catalítica o de que se trata de una metalo serin proteasa. Las actividades de psrDAP y psrCP se localizaron tanto en la fracción soluble como en la membranal. La psrDAP soluble fue inhibida por el E-64 (inhibidor de cisteín proteasas), en cambio, psrDAPm fue inhibida mayoritariamente por PMSF. La psrCP de citoplasma es una metalo proteasa al ser inhibida con EDTA y 1-10, Fenantrolina, mientras que la psrCP membranal se inhibió con PMSF (inhibidor de serin proteasas) y con EDTA y 1-10, Fenantrolina. Los geles de actividad de las proteasas de localización soluble psrAPE y psrDAP revelaron la presencia de una sola banda para cada enzima y dos para la psrDAP de localización membranal. Este es el primer reporte de las proteasas intracelulares de tipo específico de *S. reilianum*, su estudio permitirá dilucidar el papel de estas enzimas durante el ciclo de vida y/o patogénesis del hongo.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LA PROTEÓLISIS

La proteólisis se define como la hidrólisis de proteínas y polipéptidos, que da como resultado la producción de péptidos pequeños y/o aminoácidos. En los seres vivos esta reacción es catalizada por enzimas denominadas proteasas (Hirsch *et al.*, 1989).

En 1942, Schöenheimer reconoció el papel central de las enzimas proteolíticas en el mantenimiento de los niveles proteicos intracelulares, estableciendo el “concepto dinámico de los componentes celulares”, cuya concentración permanece constante como resultado del equilibrio entre las velocidades de síntesis y degradación. De esta manera, la actividad proteolítica se convierte en un mecanismo regulador que mantiene los niveles de proteína en cada momento (Schimke y Doley, 1970). La proteólisis juega un papel clave, no solamente en el recambio de proteínas endógenas, sino también en el control de diversas funciones fisiológicas, como son: la digestión de proteínas, la maduración de hormonas, la respuesta inmune, la inflamación, la coagulación, la fertilización, la germinación y otros procesos morfogénicos (Holzer y Heinrich, 1988). Algunas proteasas tienen un papel importante en la esporulación, la germinación, la patogenicidad de diversos microorganismos y pueden participar en la regulación post-traducciona (Yuan y Cole, 1989; Suárez-Rendueles *et al.*, 1991; Vartivarian, 1992; White y Agabian 1995; Monod *et al.*, 1998).

El estudio del sistema proteolítico de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* ha sido importante para elucidar la función de las proteasas en eucariotas. La sobrevivencia de las células en su ambiente natural depende de su capacidad de adaptación a los frecuentes cambios que ocurren a su alrededor. En este caso, la proteólisis juega un papel clave en la respuesta al estrés, como son, la falta de nutrientes, condiciones extremas de temperatura, pH o radiaciones UV. El estrés nutricional probablemente enciende una reorganización del metabolismo celular. El más claro ejemplo de esta forma de estrés ocurre cuando levaduras diploides son transferidas a partir de un medio rico con glucosa a un medio pobre con acetato como fuente de carbono y sin fuente de nitrógeno, bajo estas condiciones, las células de levaduras comienzan a diferenciarse y aparecen cuatro esporas. Durante este proceso hay una alta actividad proteolítica que provee a la célula de aminoácidos para la síntesis de nuevas proteínas y probablemente para la generación de energía (Hilt y Wolf, 1992).

I.2. PROTEASAS DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Las levaduras han sido utilizadas por el hombre desde tiempos ancestrales en la fabricación del pan, en la fermentación del zumo de frutas para la elaboración de vinos, en la producción de materia prima para la industria y en muchos procesos más. Gracias a ellas en 1860 se estableció el concepto de enzima y en 1897 se logró reproducir *in vitro* las reacciones bioquímicas que ocurren en los seres vivos.

Aunque las primeras actividades bioquímicas descritas en estos microorganismos se refieren a rutas fermentativas, en 1898, Han y Geret reportaron la primera actividad proteolítica en levaduras, desde entonces han sido consideradas como un excelente modelo de estudio de la proteólisis en células eucariotas, ya que crecen en condiciones nutricionales definidas, se pueden obtener en cantidades considerables para realizar estudios bioquímicos y además poseen la ventaja de ser fácilmente manipulables para la aplicación de técnicas de genética clásica y de biología molecular, y así, obtener y caracterizar un gran número de mutantes, lo cual ha permitido establecer la relación que existe entre la función biológica desempeñada *in vivo* y las reacciones catalizadas *in vitro*.

Otro aspecto importante es que las levaduras presentan la posibilidad de expresar genes de eucariotas que son incompatibles con los sistemas bacterianos, convirtiéndolas en un instrumento biotecnológico eficaz para la síntesis de productos de interés biomédico e industrial (Suárez-Rendueles y Wolf, 1988).

La levadura *S. cerevisiae* ha sido utilizada para el estudio de las funciones celulares en eucariotas y entre ellas el papel de las proteasas en la regulación celular.

Esta levadura dispone de dos sistemas proteolíticos claramente diferenciados:

1.- El primero es un sistema localizado en un compartimento membranoso equivalente al lisosoma en eucariotas superiores conocido como vacuola, que contiene diferentes peptidasas inespecíficas además de otras enzimas hidrolíticas. El interior de este organelo es ácido y constituye un lugar de almacenamiento de polifosfatos, aminoácidos, carbohidratos, iones calcio e interviene en la homeostasis del pH del citoplasma (Klionsky *et al.*, 1990).

Las funciones hidrolíticas y de almacenamiento están reguladas por el crecimiento y la composición de los medios de cultivo, sobresaliendo las condiciones de ayuno de carbón y de nitrógeno (Saheky *et al.*, 1974; Hansen *et al.*, 1977).

Las proteasas vacuolares más estudiadas en esta levadura son las siguientes: proteinasa yscA, proteinasa yscB, aminopeptidasa ysc1, aminopeptidasa yscCo, aminopeptidasa Y, dipeptidilaminopeptidasa yscV, carboxipeptidasa yscY y carboxipeptidasa yscS. Algunas de estas enzimas (proteinasa yscA y yscB y carboxipeptidasa) están reguladas por la presencia de inhibidores endógenos, que son moléculas de naturaleza proteica, de bajo peso molecular, estables a pH ácido y a altas temperaturas (Umezawa, 1982; Suárez-Rendueles y Wolf, 1988, Yasuhara *et al.*, 1994).

El estudio fenotípico de mutantes carentes de diversas proteasas ha puesto de manifiesto que la función principal de las endoproteasas y carboxipeptidasas, reside en el proceso de diferenciación de la esporulación que es estimulado por el ayuno de nitrógeno, en donde la actividad de estas enzimas aporta a la célula los aminoácidos necesarios para la síntesis de nuevas proteínas a expensas de la degradación de otras que ya no son necesarias (Zubenko y Jones, 1979; Mechler y Wolf, 1981; Teichert *et al.*, 1987), además de esta función, están relacionadas con la maduración de otras enzimas vacuolares (Hemmings *et al.*, 1981; Mechler *et al.*, 1982; Ammemer *et al.*, 1986; Rothman y Stevens, 1986; Mechler *et al.*, 1988).

Las dipeptidilaminopeptidasas son enzimas que liberan dipéptidos comenzando por el extremo amino terminal libre y generalmente actúan sobre sustratos que contienen prolina en la segunda posición (García-Álvarez *et al.*, 1985). En *S. cerevisiae* la DAP yscV esta localizada en la membrana vacuolar, los estudios genéticos han demostrado que el gen denominado DAP2, codifica para esta enzima. El papel biológico que desempeña es desconocido, ya que las mutantes dap2 no muestran ninguna alteración fenotípica (Suárez-Rendueles y Wolf, 1988).

Las aminopeptidasas catalizan el corte de un aminoácido en el extremo amino terminal de péptidos y proteínas. Estas enzimas pueden ser clasificadas por su especificidad de sustrato según su preferencia por un aminoácido neutro, básico y ácido. Muchas aminopeptidasas son metaloproteasas, sin embargo se han descrito serin y cistein aminopeptidasas (Taylor, 1993). En *S. cerevisiae* se conocen al menos tres aminopeptidasas de localización vacuolar cuya función en la célula hasta el momento es desconocida (Suárez-Rendueles y Wolf, 1988; Chang y Smith, 1989; Yasuhara *et al.*, 1994).

Las carboxipeptidasas son proteasas que requieren del extremo carboxilo terminal para actuar y liberar aminoácidos. Las carboxipeptidasas yscY y yscS de *S. cerevisiae* de localización vacuolar, han sido bien caracterizadas y ambas están relacionadas con la degradación de proteínas y en el metabolismo nitrogenado (Suárez-Rendueles y Wolf, 1988).

2.- El segundo sistema proteolítico es extralisosomal y esta formado de proteasas altamente específicas situadas en diferentes compartimentos celulares. La proteasa mejor caracterizada es la yscE o el equivalente al proteasoma encontrado en todas las células eucariotas, la cual es una enzima de 600 kDa constituida por 14 subunidades de un tamaño que oscila entre 20 y 38 kDa (Achstetter *et al.*, 1984; Heinemeyer *et al.*, 1991). Como en todos los proteasomas de eucariotas descritos hasta el momento (Orlowski, 1990) en *S. cerevisiae* se presentan al menos tres actividades proteolíticas, del tipo quimotripsina, tripsina y peptidil-glutamil-peptidasa (Heinemeyer *et al.*, 1991; Groll *et al.*, 1997). La delección de los genes estructurales de las diferentes subunidades del proteasoma es letal para la levadura (Fujiwara *et al.*, 1990; Emori *et al.*, 1991; Heinemeyer *et al.*, 1991). Estudios realizados en mutantes deficientes en algunas actividades proteolíticas de la proteinasa yscE, (pre1 y pre2) parecen ligar al proteasoma con la ruta de degradación de proteínas mediada por ubiquitina (Hilt y Wolf, 1992).

Como se puede apreciar la proteólisis no solamente esta asociada exclusivamente con el lisosoma de la célula. Ahora se sabe que tiene diferentes funciones importantes y que este evento toma lugar en cualquier compartimento celular (Suárez-Rendueles y Wolf, 1988).

II. ANTECEDENTES

II.1. EL HONGO PATÓGENO DEL MAÍZ *S. reilianum*.

S. reilianum es el agente causal del “carbón de la espiga” una enfermedad de distribución mundial que afecta principalmente al maíz (*S. reilianum* f. sp. *zeae*) y al sorgo (*S. reilianum* f. sp. *reilianum*) ocasionando numerosas pérdidas económicas. Este patógeno del suelo penetra a la planta durante la germinación de la semilla produciendo una infección sistémica que se manifiesta después de la floración. La característica más sobresaliente de la enfermedad es la presencia de masas carbonosas de color negro en mazorcas y en espigas, estas últimas presentan un desarrollo excesivo y deformaciones (Fredericksen, 1977; Shurtleff, 1980; Matyac y Kommedahl 1985; Martínez *et al.*, 2000).

S. reilianum pertenece a la división *Basidiomycota* y a la clase *Ustilaginomycetes*, que incluye carbonos, los cuales infectan un gran número de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, la producción de esporas de color oscuro es su característica distintiva (Agrios, 1999 y Romero, 1993). La clasificación corresponde a la publicada por (Index Fungorum).

Reino; Fungi

División; *Basidiomycota*

Clase; *Ustilaginomycetes*

Subclase; *Ustilaginomycetidae*

Orden; *Ustilaginales*

Familia; *Ustilaginaceae*

Genero y especie; *Sporisorium reilianum*

La enfermedad carbón de la espiga se manifiesta en las espigas masculinas y mazorcas y se caracteriza por la presencia de soros que contiene esporas que sustituyen la formación de polen y de grano destruyendo por completo la mazorca (Figura 1).

La infección en plántulas no presenta síntomas visibles y la infección se manifiesta por severos achaparramientos, acortamientos de entrenudos y esterilidad. Los síntomas visibles se expresan en plantas adultas en los tejidos jóvenes activos, en yemas axilares, flores individuales de la mazorca y espigas (De León, 2004).

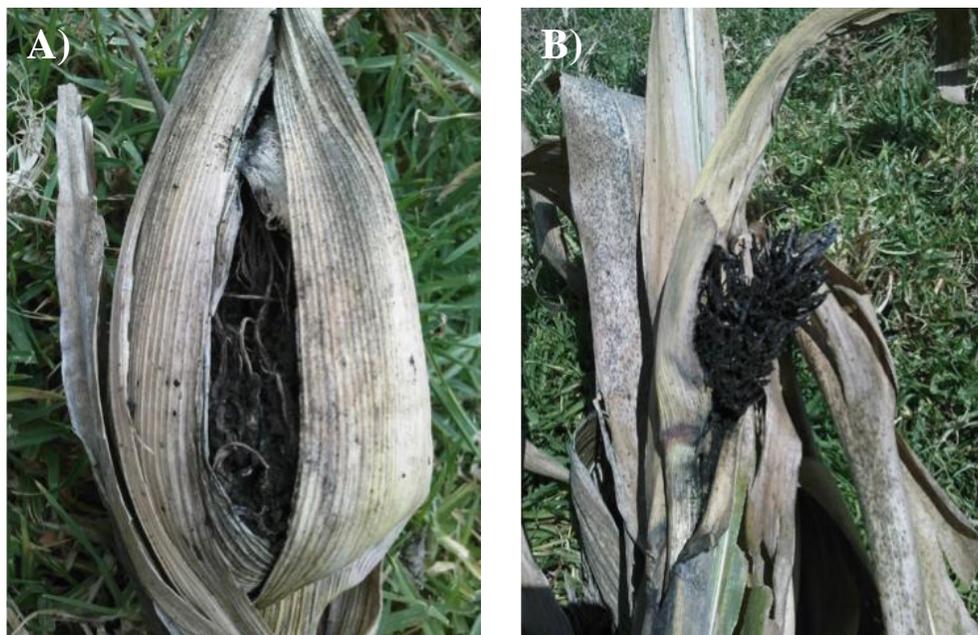


Figura 1. Maíz que presenta la enfermedad del Carbón de la Espiga ocasionado por *S. reilianum* en la localidad de Cinta Larga municipio de Mixquiahuala Hgo. La mazorca (A) y la espiga (B) son remplazadas por masas carbonosas de color negro.

Foto: Cristina Mendoza

La incidencia del carbón de la espiga esta relacionada a las condiciones ambientales y prácticas culturales. La plántula es infectada por teliosporas presentes en el suelo durante o después de la emergencia, el desarrollo de la enfermedad es determinado por la humedad y temperatura del suelo, la fertilidad, el distanciamiento entre plantas y tipo de suelo (Matyac y Kommedaht, 1985).

Los factores que influyen en el desarrollo de la infección son: temperaturas de entre 20 y 30° C, 15 a 25 % de humedad en el suelo, cantidad de esporas presentes, capacidad de infección y la virulencia del patógeno, susceptibilidad de las variedades de maíz y la alcalinidad del suelo (Romero, 1993; Mack *et al.*, 1984).

S. reilianum es un hongo que sobrevive en forma de teliospora; ataca a plántulas, mediante micelio dicariótico septado y se desarrolla sistémicamente invadiendo órganos reproductivos no diferenciados (Romero, 1993). Los soros que destruyen las inflorescencias están cubiertos cada uno por peridio fungoso (tejido membranoso blanco) que se desintegra y forma células estériles esféricas o subesféricas, hialinas amarillentas pálidas de 5-15 μm de diámetro. En los soros se forman bandas filamentosas de color blanco, las cuales son vestigios del sistema vascular de las inflorescencias. Las teliosporas son estructuras esféricas o subesféricas de color café amarillento pálido a rojizo oscuro o negro, equinuladas, de 9 a 12 μm de diámetro. Las teliosporas al germinar producen promicelio y esporidios laterales pequeños, hialinos, unicelulares y tipo de compatibilidad (+) y (-), aproximadamente en igual número que miden 7-15 μm de diámetro. Las teliosporas que germinan directamente en el suelo producen hifas infectivas dicarióticas. Las agallas, que encierran las clamidosporas (teliosporas), se rompen con facilidad y caen al suelo, después de un periodo de reposo germinan e infectan semilla y posteriormente a plantas jóvenes. La teliospora joven sufre cariogamia, al madurar se transforma en esporas binucleadas diploides, estas esporas germinan inmediatamente o permanecen en un periodo de reposo de 3 a 4 meses (Alexopoulos y Mims, 1985). En la (Figura 2), se presenta un ejemplo del ciclo de vida de *Ustilago maydis*, este es similar al ciclo de vida de *S. reilianum*, con la diferencia de que este último es un carbon desnudo (Herrera- Ullua, 1990).

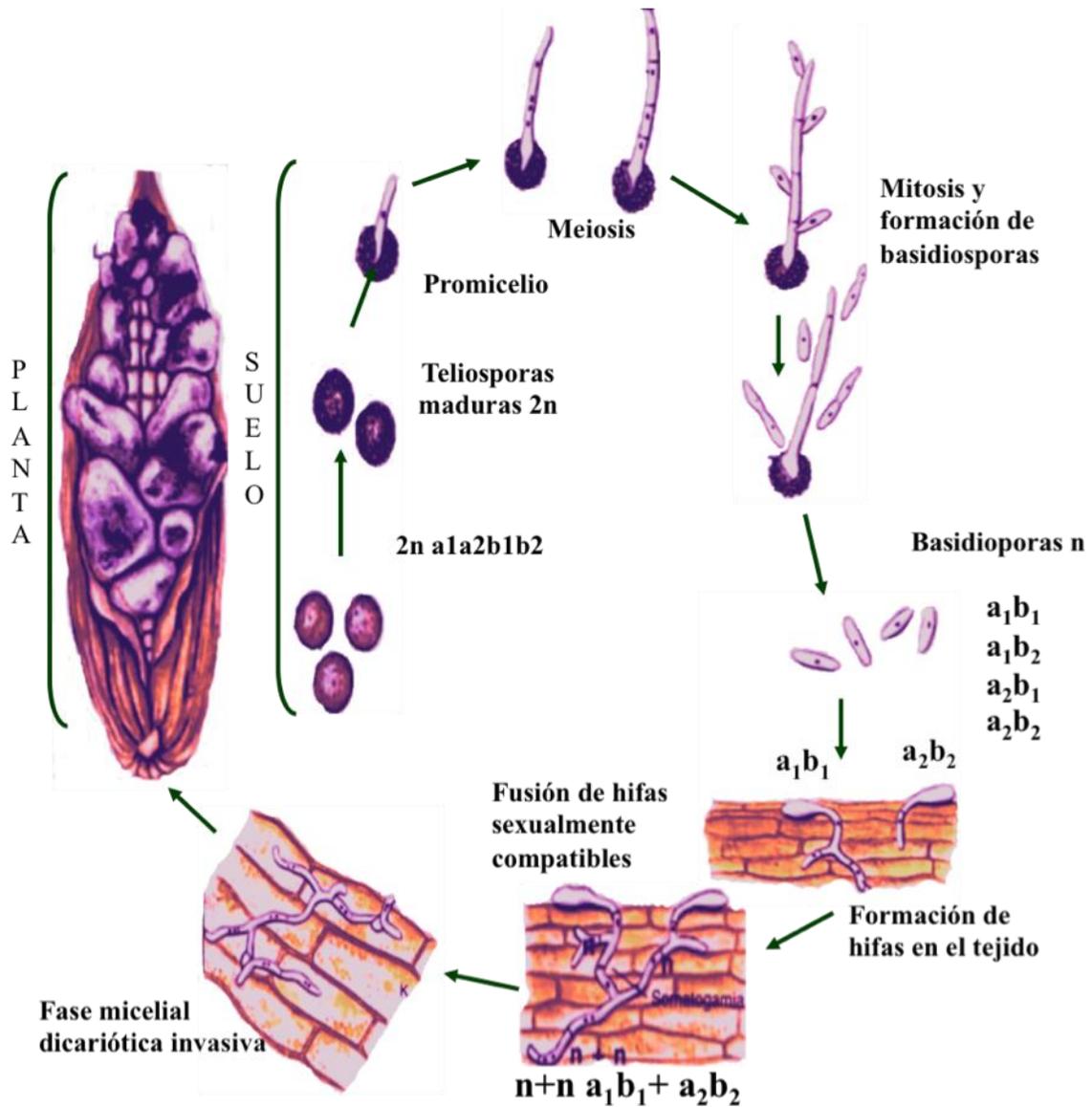


Figura 2. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*.

Tomada de Herrera- Ullua, 1990

Varios autores mencionan que el uso de plantas resistentes es la mejor opción para el control de *S. reilianum* en maíz sembrado en condiciones de riego y temporal. En los programas de mejoramiento de maíz, se ha encontrado que genotipos de maíz que se evaluaron como resistentes al ataque de *S. reilianum* en un año al siguiente se comportan

como susceptibles y el grado de ataque varía según la zona y el año (Stromberg *et al.*, 1984; Hirschhorn, 1986; Ramírez *et al.*, 2000).

Todos los carbones son patógenos de plantas, existen aproximadamente 1100 especies de carbones que atacan a más de 75 familias de angiospermas y algunas especies están confinadas geográficamente a áreas pequeñas y en donde se encuentra la planta hospedante. El carbón de la espiga nunca ha sido una enfermedad devastadora, pero causa pérdidas en el rendimiento de la producción del maíz. (Alexopoulos y Mims, 1985).

En México la enfermedad se encuentra presente en los estados de Jalisco, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Estado de México y Veracruz; en donde ataca principalmente a maíz de ciclo tardío en siembras de humedad residual y de temporal (Fuentes, 1962; Yerkes, *et al.*, 1959). En la década de los 60's en el estado de Hidalgo *S. reilianum* fue reportado en campos de cultivo de maíz, para 1985 se volvió a presentar y en los últimos años causó daños en 35 híbridos comerciales en 318 campos de cultivo con diferente grado de afectación.

I.2. PROTEASAS DE HONGOS FITOPATÓGENOS

Durante la interacción planta-hongo fitopatógeno, este último secreta diferentes enzimas extracelulares que pueden degradar los componentes poliméricos de la pared celular del hospedero, las cuales, no sólo contribuyen a la generación de una importante fuente de nutrientes asimilables, sino que también, facilitan la penetración, la colonización y la maceración de los tejidos de la planta (Walton, 1994; Oliver y Osbourn, 1995; Annis y Goodwin, 1997).

Tradicionalmente las pectinasas han sido las enzimas más estudiadas debido a que son producidas en grandes cantidades por los fitopatógenos (Alghisi y Favaron, 1995); sin embargo, se ha propuesto que las enzimas proteolíticas extracelulares tienen un papel importante durante la penetración y colonización, participando activamente en la hidrólisis de las glicoproteínas fibrosas estructurales de la pared celular del hospedero (Walton, 1994; Rauscher *et al.*, 1995).

El papel de las proteasas en los hongos fitopatógenos ha sido estudiado en pocos sistemas tal es el caso de una carboxipeptidasa y una aspartil-proteasa, esta última considerada

como factor de virulencia en *Botrytis cinerea* (ASCOMYCOTA), (Urbanek y Kaczmarek, 1985; Movahedi y Heale, 1990). A partir de este mismo hongo se han clonado cinco genes que codifican para cinco aspartil proteasas (*Bcap1-5*), que se expresan en los tejidos infectados de la planta (ten Have *et al.*, 2004).

En *Pyrenopeziza brassicae* (ASCOMYCOTA), la evidencia de que una cisteín-proteasa representa un importante factor de patogenicidad, se encontró por complementación de mutantes avirulentas obtenidas por luz UV (Ball *et al.*, 1991). Por el contrario, la interrupción de dos genes que codifican para las proteasas alcalinas en *Cochliobolus carbonum* (ASCOMYCOTA) no afecta la virulencia del hongo (Murphy y Walton, 1996).

Fusarium culmorum (DEUTEROMYCOTA), produce una proteasa ácida que posiblemente tenga un papel importante en la fitopatogénesis, debido a que es capaz de hidrolizar varias proteínas de origen vegetal (Urbanek y Yirdaw, 1984).

A partir de *F. oxysporum* sp. *lycopersici* se aisló el gen *Prt1* que codifica para una proteinasa tipo subtilisina. La inactivación específica de *prt1* no tiene ningún efecto detectable durante el crecimiento micelial, la esporulación y la patogénesis (Di Pietro *et al.*, 2001).

Endothia parasitica (*Cryphonectria parasitica*) (ASCOMYCOTA), secreta una aspartil-proteasa denominada endotiaepsina, que está codificada por el gen *epr-1* (Choi *et al.*, 1993). A partir de este ascomyceto se han clonado los genes que codifican para dos proteinasas ácidas extracelulares (*eapB* y *eapC*), que presentan características estructurales diferentes (Jara *et al.*, 1996).

Glomerella cingulata (ASCOMYCOTA), produce una aspartil-proteasa secretada denominada GsSAP, la cual se induce por la presencia de proteína exógena, y se reprime por sales de amonio (Clark *et al.*, 1997).

Sclerotinia sclerotiorum (ASCOMYCOTA), es un hongo necrofítico del cual se han aislado los genes que codifican para una aspartil-proteasa (*aspS*) y una proteasa ácida no aspartil (*acp1*). La primera se expresa al comienzo de la infección, y la segunda se induce fuertemente con la presencia de proteínas de la pared celular de la planta (Poussereau *et al.*, 2001a; Poussereau *et al.*, 2001b).

En *Monilinia fructigena* (ASCOMYCOTA), se encontró que una aspartil proteasa, tiene un papel importante en la nutrición del hongo durante la infección (Hislop *et al.*, 1982). Por otro lado, se ha observado que la expresión de la proteinasa Mp1 de *Magnaporthe poae* en raíces infectadas, está relacionada con el incremento y la severidad de los síntomas en la planta (Sreedhar *et al.*, 1999).

El gen SPM1 de *Magnaporthe grisea* (ASCOMYCOTA), codifica para una serín proteasa. Los análisis de la secuencia sugieren que la proteína podría ser de localización vacuolar (Fukiya *et al.*, 2002).

Uromyces viciae-fabae (BASIDIOMYCOTA), produce diferentes actividades proteolíticas durante los procesos de infección. La mayoría de estas proteasas, a diferencia de las intracelulares, degradan específicamente proteínas fibrosas ricas en hidroxiprolina las cuales son importantes en la estabilidad de la pared celular de las plantas (Rauscher *et al.*, 1995).

El patógeno del trigo *Stagonospora nodorum* (ASCOMYCOTA), produce una proteasa extracelular tipo tripsina (SNP1) durante el crecimiento del micelio en la superficie de las hojas del hospedero y durante la penetración del hongo (Bindschedler *et al.*, 2003).

Ustilago maydis (BASIDIOMYCOTA), agente causal del carbón del maíz producen al menos cuatro actividades proteolíticas: aminopeptidasa pumAPE, dipeptidilaminopeptidasa pumDAP y proteinasas pumA y pumB (el sufijo pum significa: protease *Ustilago maydis*) (Mercado-Flores *et al.*, 2003b). La actividad de proteinasa pumA se detectó de manera intracelular (pumAi) y extracelular (pumAe), ambas ya fueron purificadas y caracterizadas (Mercado-Flores *et al.*, 2003a; Mercado-Flores *et al.* 2005). Al parecer la proteinasa pumAe se encuentra asociada a la fase patogénica de *U. maydis* y es secretada al medio de cultivo cuando el hongo crece en un pH ácido, precisamente cuando ocurre la transición dimórfica de levadura a micelio (Mercado-Flores *et al.*, 2003b). En este mismo basidiomiceto se ha purificado una aminopeptidasa pumAPE, probablemente relacionada con la maduración de péptidos que le confieren hidrofobicidad al micelio, permitiendo la adherencia del hongo a su hospedero (Mercado-Flores *et al.*, 2004)

Una evidencia adicional de la importancia de las proteasas en la fitopatogénesis, es el hecho de que las plantas poseen mecanismos que contrarrestan el efecto de estas enzimas, produciendo inhibidores específicos de proteasas (Ryan, 1990), los cuales contribuyen a la defensa de las mismas por presentar actividad antifúngica, e inhibir las actividades proteolíticas producidas por los fitopatógenos (Chen *et al.*, 1999; Pernas *et al.*, 1999).

III. JUSTIFICACIÓN

El maíz es una planta que depende del hombre para su desarrollo y distribución, la gran capacidad de adaptación que posee hace de este cultivo una práctica adecuada en una gran diversidad de climas y altitudes. A nivel mundial, este cereal ocupa el segundo lugar después del trigo como fuente de alimentación humana, de ahí la importancia del estudio de las enfermedades y plagas que lo afectan.

Hasta la fecha, no se han estudiado las proteasas producidas por *S. reilianum* f. sp. *zeae* agente causal del carbón de la espiga del maíz. El descubrimiento de que una o varias proteasas son importantes durante el ciclo de vida y/o fitopatogénesis del hongo, abre la posibilidad de proponerlas como blancos moleculares para el diseño de fungicidas efectivos que además de ser compatibles con el medio ambiente permitan profundizar en los estudios de los procesos que se llevan a cabo durante la interacción planta-hongo fitopatógeno y ayuden a controlar el desarrollo de la enfermedad evitando pérdidas económicas, por otro lado, permitirá profundizar.

IV. OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la producción de proteasas intracelulares de tipo específico, aminopeptidasa (psrAPE), dipeptidilaminopeptidasa (psrDAP) y carboxipeptidasa (psrCP) en el hongo *S. reilianum*.

IV.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar una cepa de *S. reilianum* aislada en el estado de Hidalgo mediante PCR específica (Reacción en Cadena de la Polimerasa).
- Evaluar la producción de las enzimas psrAPE, psrDAP y psrCP de *S. reilianum* en diferentes fuentes de nitrógeno.
- Determinar la localización celular de las proteasas psrAPE, psrDAP y psrCP de *S. reilianum*.
- Identificar el número de isoenzimas de las actividades de psrAPE y psrDAP producidas por *S. reilianum*.
- Evaluar el efecto de inhibidores específicos de proteasas sobre la actividad de psrAPE, psrDAP y psrCP de *S. reilianum*.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1 TECNICAS MICROBIOLÓGICAS

V.1.1 MICROORGANISMO Y CONSERVACIÓN

La cepa utilizada en este trabajo fue *S. reilianum* el cual se conservó a largo plazo a temperatura ambiente en tubos con medio YPD inclinado con aceite mineral. Se realizaron resiembras periódicas en placas con YPD para tener disponible la cepa en cualquier momento.

Se utilizó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* que fue conservada a largo plazo en glicerol al 25% a -80°C.

V.1.2 MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

Medio rico YPD

Medio mínimo con sulfato de amonio

Medio mínimo con peptona

Medio mínimo con prolina

Medio mínimo con infusión de maíz

La formulación y preparación de cada medio de cultivo se encuentra en el Anexo 1.

V.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

V.2.1 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE *Sporisorium reilianum*

La extracción del DNA genómico de *S. reilianum* se realizó por el método descrito por Hoffman y Winston en 1987. La concentración y la calidad del DNA se determinó espectrofotométricamente, realizando lecturas a 260 nm y por la relación As₂₆₀/As₂₈₀, respectivamente. Se utilizó un espectrofotómetro Jenway (Peltier controller 6405 uv/vis).

Las muestras de DNA fueron diluidas hasta obtener una concentración de 200 pg/μl para la realización de la PCR.

V.2.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA IDENTIFICACIÓN de *Sporisorium reilianum*

Se realizó la identificación molecular de una cepa de *S. reilianum* del estado de Hidalgo siguiendo la metodología descrita por Xu *et al.* (1999). Utilizando el termociclador Axygen

Maxigen.

V.2.3 ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

El DNA y los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %, en regulador TAE 1X a 80 V. Los geles fueron teñidos en TAE con bromuro de etidio (10 mg/ml), y observados con luz UV.

V.3 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

V.3.1. PRUEBAS EN PLACA PARA REVELAR LA ACTIVIDAD DE psrAPE y psrDAP de *S. reilianum*

La cepa de *S. reilianum*, fue sembrada en medio sólido de YPD por estría cerrada en seis placas y se incubó a 28° C durante 48 horas. Tres cajas fueron permeabilizadas con cloroformo y tres quedaron sin permeabilizar. Un par de cajas (permeabilizada y sin permeabilizar) fue utilizado para detectar la actividad de psrAPE, otro para la actividad de psrDAP, utilizando como sustratos Lys- β -Naftilamida y Lys-Pro- β -Naftilamida respectivamente y el otro fue utilizado como testigo, sin sustrato. Las proteasas fueran reveladas como describieron Hirsh *et al.*, en 1988.

Como testigo fue utilizada una cepa de *S. cerevisiae* DBY.

V.3.2. CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE psrAPE, psrDAP y psrCP de *S. reilianum*

Se realizaron cinéticas de producción de las proteasas en estudio en los medios: rico (YPD) y medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno (peptona, prolina, sulfato de amonio e infusión de maíz), como se describe a continuación.

A partir de un preinoculo de 12 horas, se inocularon matraces de 250 ml con 50 ml de medio. Se incubaron en agitación a 200 r.p.m. y se tomaron alícuotas a las 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 hras., para buscar las actividades proteolíticas intracelulares, así mismo se determinó el pH en la fracción extracelular y el crecimiento del hongo.

V.3.3. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIÓN INTRACELULAR DE *S. reilianum*

Los hongos se cosecharon a los tiempos mencionados en el apartado de cinéticas de producción de proteasas. Los cultivos fueron cetrifugados a 1,935 X g. Las células se lavaron

dos veces con agua destilada fría y se les adicionó por cada gramo de peso húmedo: 2.5 ml de regulador Tris-HCl 0.1 M pH 7.0 y 7 g de perlas de vidrio (ballotini 0.45-0.50 mm). La suspensión celular fue sometida a rompimiento mecánico en frío mezclando vigorosamente durante 10 periodos de 1 min, con 1 min de intervalo entre ellos para obtener la fracción intracelular (células rotas). El rompimiento se verificó en el microscopio (Suárez *et al.*, 1991).

V.3.4.DETERMINACIÓN DE psrAPE, psrDAP y psrCP de *S. reilianum*

Para la determinación de psrAPE, se utilizó Lys-p-Nitroanilida como sustrato y para psrDAP, Ala-Pro-p-Nitroanilida según el método descrito por Hirsh *et al.* (1988).

Para la determinación de psrCP se utilizó el sustrato N-Bz-L-Tir-p-Nitroanilida según el método descrito por Aibara *et al.* (1971).

Para cada enzima una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de *p*-nitroanilina por min, bajo las condiciones de ensayo descritas.

V.3.5. FRACCIONAMIENTO Y LOCALIZACIÓN CELULAR DE psrAPE, psrDAP y psrCP DE *S. reilianum*

Para llevar a cabo el fraccionamiento y la localización celular de las proteasas en estudio, se utilizó el protocolo descrito por Suárez *et al.* (1991). A partir de los cultivos en los que se encontraron los mayores niveles de actividad específica de cada una de las proteasas, se obtuvieron las células rotas las cuales fueron centrifugadas a 12000 X *g* durante 10 min, obteniéndose en el sobrenadante el extracto libre de células, el cual se ultracentrifugó a 100,000 x *g* durante 2 h para obtener en el sobrenadante la fracción soluble y en el precipitado la fracción membranal.

A todas las fracciones obtenidas (extracto libre de células, soluble y membranal) se les determinó la actividad de cada una de las proteasas en estudio y la concentración de proteína.

V.3.6. ELECTROFORESIS EN GELES NATIVOS DE POLIACRILAMIDA PARA REVELAR LAS ACTIVIDADES DE psrAPE y psrDAP DE *S. reilianum*.

Los extractos enzimáticos fueron sometidos a un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones no desnaturalizantes como describen Suárez y Wolf (1988). La actividad de psrAPE se puso de manifiesto utilizando Lys- β -Naftilamida como sustrato y Lys-Pro- β -Naftilamida para detectar psrDAP. El gel se incubó a 37°C hasta la aparición de bandas de color rojo intenso, las cuales indicaron la presencia de isoenzimas.

V.3.7.EFECTO DE INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE PROTEASAS sobre la actividad de psrAPE, psrDAP y psrCP DE *S. reilianum*.

Se evaluó el efecto de inhibidores específicos de proteasas sobre la actividad de las enzimas en estudio. Los inhibidores utilizados fueron los siguientes bestatina (inhibidor de aminopeptidasas), pepstatina A (inhibidor de aspartil proteasas), E-64 (inhibidor de cisteín proteasas), PMSF (inhibidor de serín proteasas), 1-10 Fenantrolina y EDTA-Na₂ (Inhibidores de metaloproteasas). La preparación de las soluciones Stock de inhibidores se encuentran en el Anexo 3. Las reacciones de inhibición se realizaron por duplicado a dos concentraciones diferentes. La concentración se seleccionó según lo recomendado por el proveedor. Las mezclas de reacción se realizaron de la siguiente manera:

E-64

Para tener una concentración final del inhibidor de 10 μ M y 50 μ M se colocaron 35 y 175 μ l respectivamente de la solución Stock del inhibidor con 25 μ l del extracto enzimático, posteriormente se adicionó agua destilada para completar un volumen final de 250 μ l.

Pepstatina

Para tener una concentración final del inhibidor de 5 μ M y 25 μ M se colocaron 17.5 y 88 μ l respectivamente de la solución Stock del inhibidor con 25 μ l del extracto enzimático, posteriormente se adicionó agua destilada para completar un volumen final de 250 μ l.

EDTA-Na₂

Para tener una concentración final del inhibidor de 1 μ M y 10 μ M se colocaron 14 y 140 μ l respectivamente de la solución Stock del inhibidor con 25 μ l del extracto enzimático, posteriormente se adicionó agua destilada para completar un volumen final de 250 μ l.

PMSF

Para tener una concentración final del inhibidor de 1 μM y 5 μM se colocaron 14 y 70 μl respectivamente de la solución Stock del inhibidor con 25 μl del extracto enzimático, posteriormente se adicionó agua destilada para completar un volumen final de 250 μl .

Bestatina

Para tener una concentración final del inhibidor de 100 μM y 250 μM se colocaron 100 y 250 μl respectivamente de la solución Stock del inhibidor con 25 μl del extracto enzimático, posteriormente se adicionó agua destilada para completar un volumen final de 250 μl .

1-10 Fenantrolina

Para tener una concentración final del inhibidor de 1 mM y 10 mM se colocaron 14 y 40 μl respectivamente de la solución Stock del inhibidor con 25 μl del extracto enzimático, posteriormente se adicionó agua destilada para completar un volumen final de 250 μl .

Las mezclas se incubaron a 37° C durante 5 min, para después realizar el ensayo enzimático correspondiente. Las actividades fueron expresadas como un porcentaje de la actividad obtenida en ausencia del inhibidor.

VI. RESULTADOS

VI.1. IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE *S. reilianum*

La cepa de *S. reilianum* presentó un crecimiento levaduriforme color crema en placas de PDA y YPD, las cuales se tornaron café oscuro después de 96 horas (Figura 3), estas características concuerdan con las reportadas por Romero (1993).



Figura 3. Crecimiento levaduriforme de *S. reilianum* en placas de PDA. Se observan colonias cremosas de color beige que con el tiempo se tornan de color café.

La cepa de *S. reilianum* utilizada en este trabajo fue identificada mediante PCR específica como describe Xu *et al.* (1999), para lo cual se realizó la extracción del DNA total del hongo el cual resultó ser de buena calidad como se muestra en la (Figura 4).

A partir de la PCR específica se obtuvieron dos amplificados de 960 pb y de 680 pb utilizando dos pares de iniciadores específicos SR1 y SR2 respectivamente. (Figura 5).

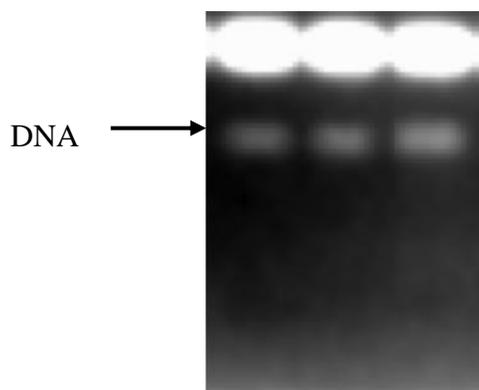


Figura 4. Electroforesis del DNA de *S. reilianum*. En todos los carriles se colocaron 3 μ l de la misma muestra.

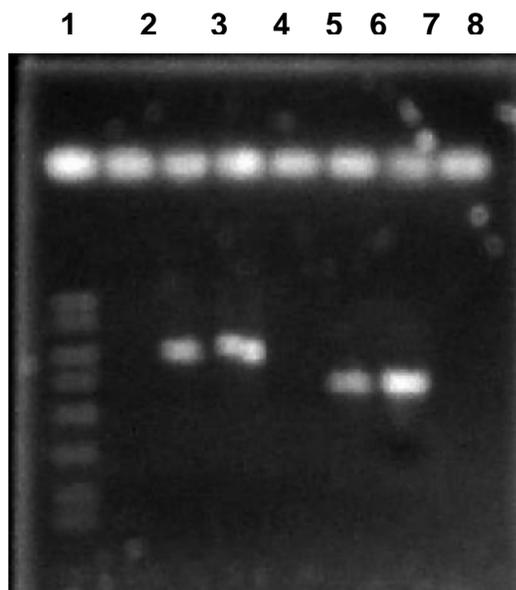


Figura 5. Electroforesis de los productos de PCR para la identificación de *S. reilianum*. Carril 1: Marcador de peso molecular DNA, PCR DNA Marker 50-2000 pb Amresco, Carriles 3 y 4: Amplificación con los iniciadores SR1, Carriles 6 y 7: Amplificación con los iniciadores SR3.

VI.2. PRUEBAS EN PLACA PARA REVELAR LA ACTIVIDAD DE psrAPE Y psrDAP DE *S. reilianum*.

Con la finalidad de determinar de manera rápida la presencia de las actividades de psrAPE y psrDAP en *S. reilianum* se realizaron pruebas en placa como se describe en los materiales y métodos.

Se utilizó *S. cerevisiae* como testigo, debido a que en esta levadura se han descrito actividades de APE y DAP intracelulares, así como asociadas a las envolturas. Como se muestra en las (Figuras 6 y 7) las actividades de esta levadura dieron positivas tanto en células permeabilizadas (intracelulares) como no permeabilizadas (asociadas a las envolturas). En el caso de *S. reilianum* tanto psrAPE y psrDAP fueron evidenciadas en células permeabilizadas, por lo que se deduce que son de localización intracelular (Figuras 6 y 7), aunque los niveles de actividad son bajos comparados con los de la cepa testigo.

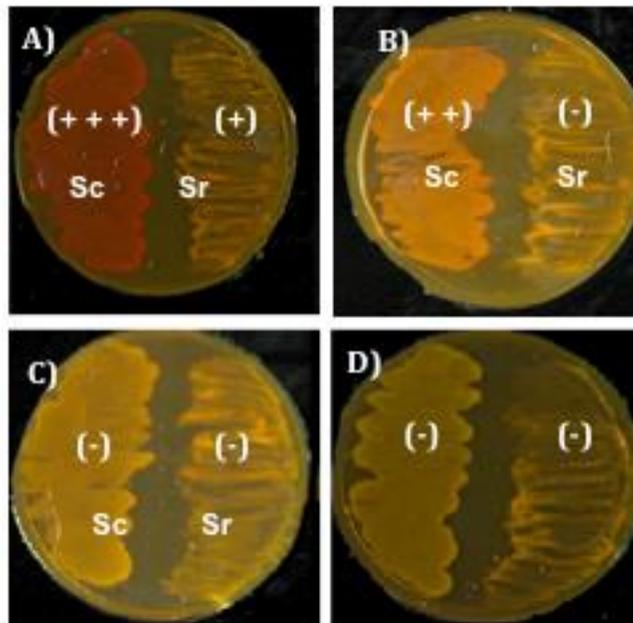


Figura 6. Prueba en placa de actividad de psrAPE. A) Actividad en células permeabilizadas. B) Actividad en células sin permeabilizar. C) Testigo de actividad sin sustrato en células permeabilizadas. D) Testigo de actividad sin sustrato en células sin permeabilizar. Sc = *S. cerevisiae*, Sr= *S. reilianum*. Los signos (+) y (-) indican prueba positiva y negativa respectivamente. Las células fueron permeabilizadas con cloroformo como se describe en los materiales y métodos.

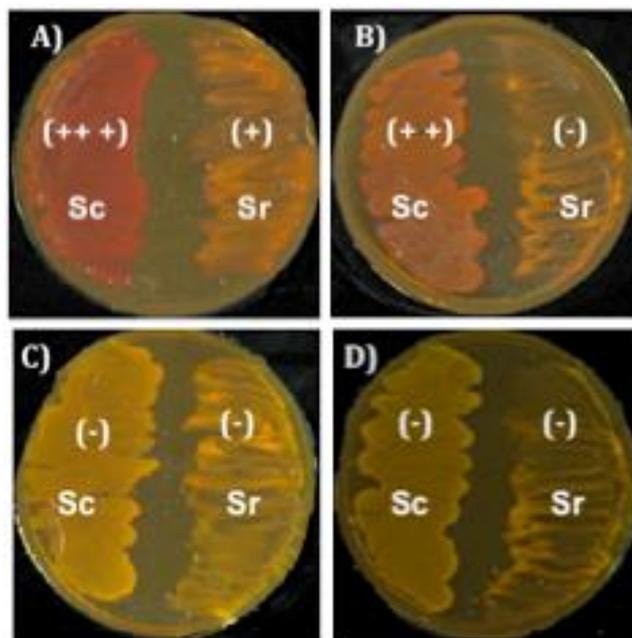


Figura 7. Prueba en placa de actividad de psrDAP. A) Actividad en células permeabilizadas. B) Actividad en células sin permeabilizar. C) Testigo de actividad sin sustrato en células permeabilizadas. D) Testigo de actividad sin sustrato en células sin permeabilizar. Sc = *S. cerevisiae*, Sr= *S. reilianum*. Los signos (+) y (-) indican prueba positiva y negativa respectivamente. Las células fueron permeabilizadas con cloroformo como se describe en los materiales y métodos

VI.3. CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE psrAPE, psrDAP y psrCP DE *S. reilianum*

La actividad de aminopeptidasa (psrAPE) de *S. reilianum* fue detectada en todos los medios de cultivo utilizados en este trabajo. El mejor medio para la producción de esta enzima resulto ser el medio YPD donde se encontraron dos picos de actividad a las 48 y 96 horas sin embargo, la mayor actividad específica se presentó en el medio mínimo con amonio a las 12 horas y en el medio mínimo con peptona a las 120 horas, (Figuras 8, 9 y 12). En los medios mínimos con infusión de maíz y prolina se observaron bajos niveles de actividad, (Figuras 9 y 10).

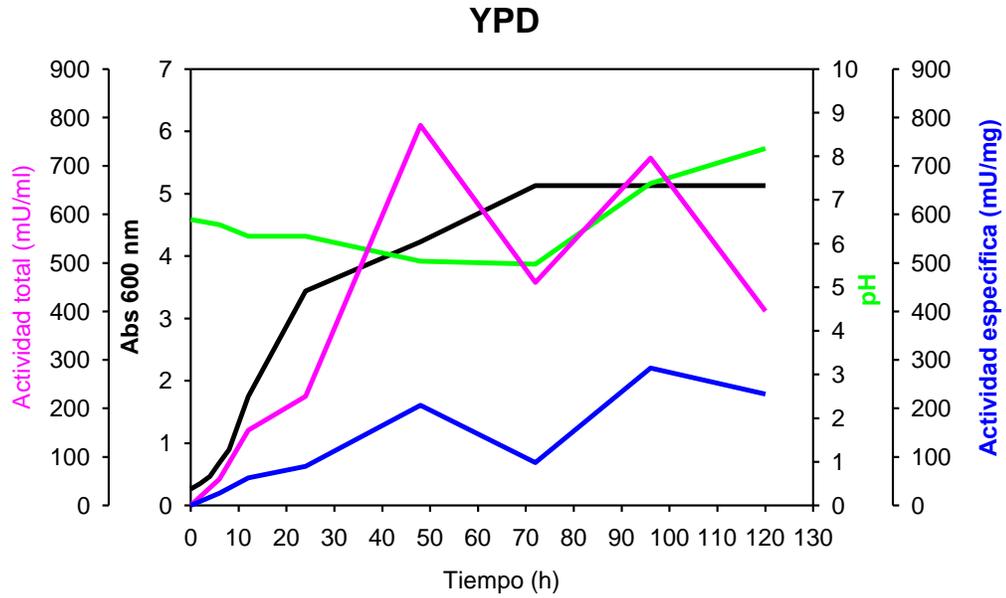


Figura 8. Cinética de producción de psrAPE de *S. reilianum* en el medio YPD. La actividad enzimática fue determinada en los extractos intracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos. Actividad específica -- Activad total -- Crecimiento -- pH --

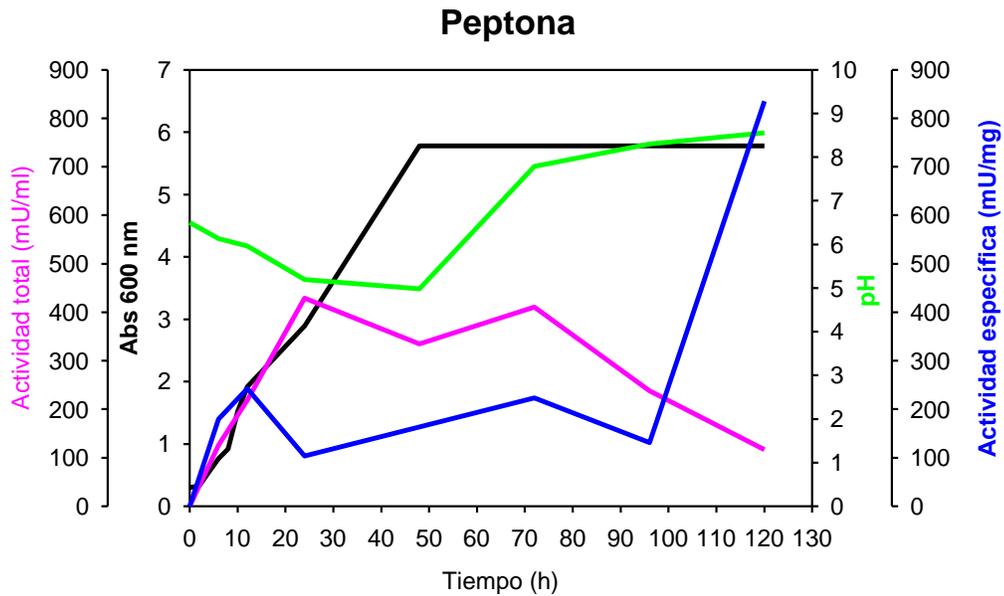


Figura 9. Cinética de producción de psrAPE de *S. reilianum* en el medio de Peptona. La actividad enzimática fue determinada en los extractos extracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos. Actividad específica -- Activad total -- Crecimiento -- pH --

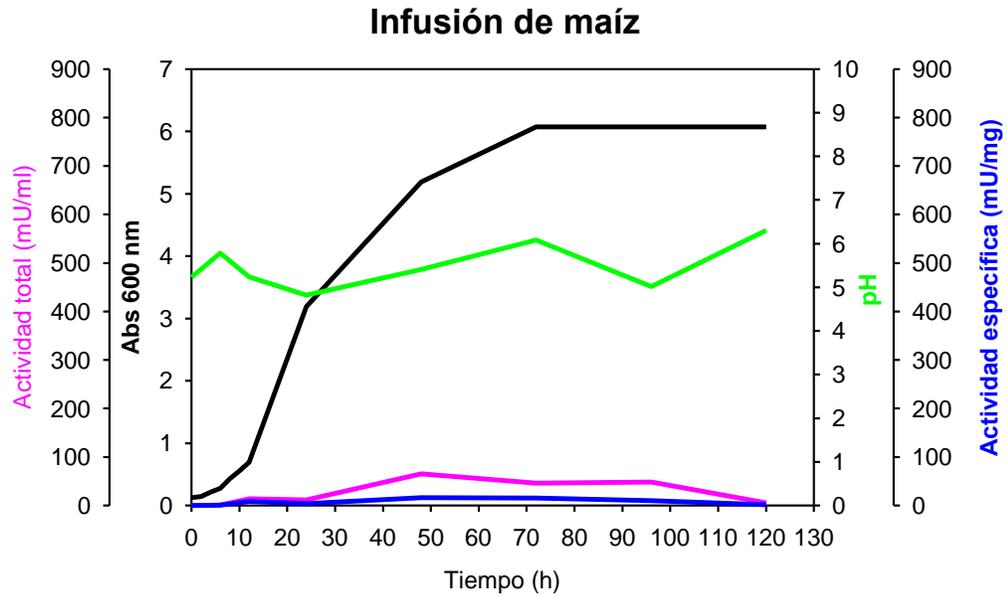


Figura 10. Cinética de producción de psrAPE de *S. reilianum* en el medio de Infusión de Maíz. La actividad enzimática fue determinada en los extractos extracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos. Actividad específica -- Activad total -- Crecimiento -- pH --

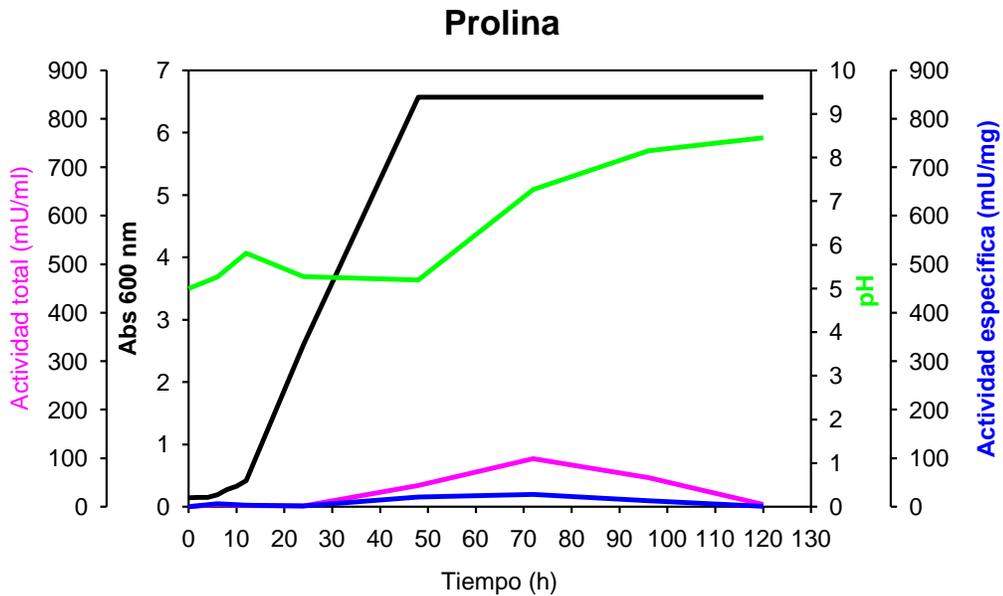


Figura 11. Cinética de producción de psrAPE de *S. reilianum* en el medio Prolina. La actividad enzimática fue determinada en los extractos extracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos. Actividad específica -- Activad total -- Crecimiento -- pH --

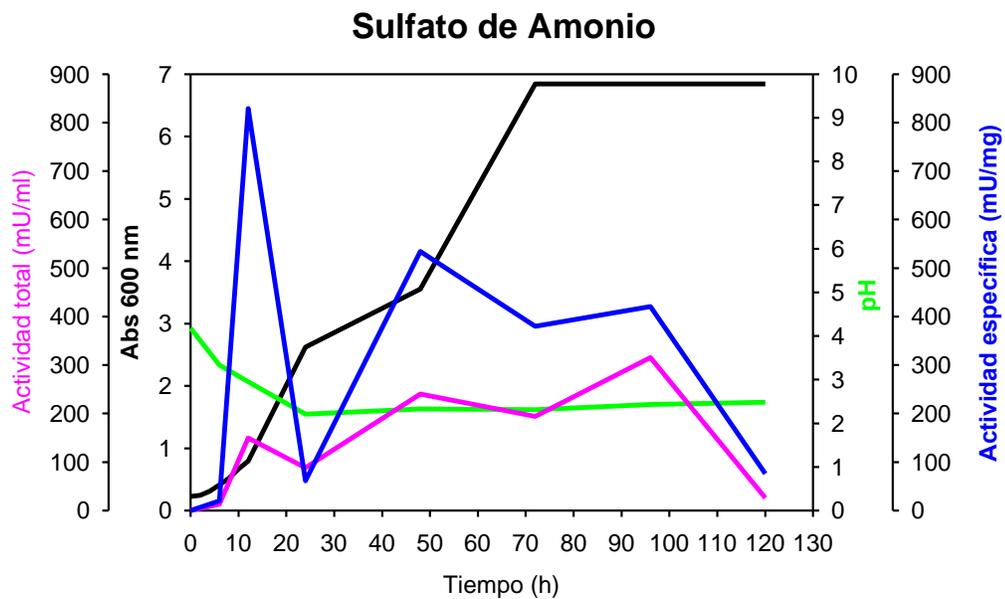


Figura 12. Cinética de producción de psrAPE de *S. reilianum* en el medio de Amonio. La actividad enzimática fue determinada en los extractos extracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos. Actividad específica -- Actividad total -- Crecimiento -- pH --

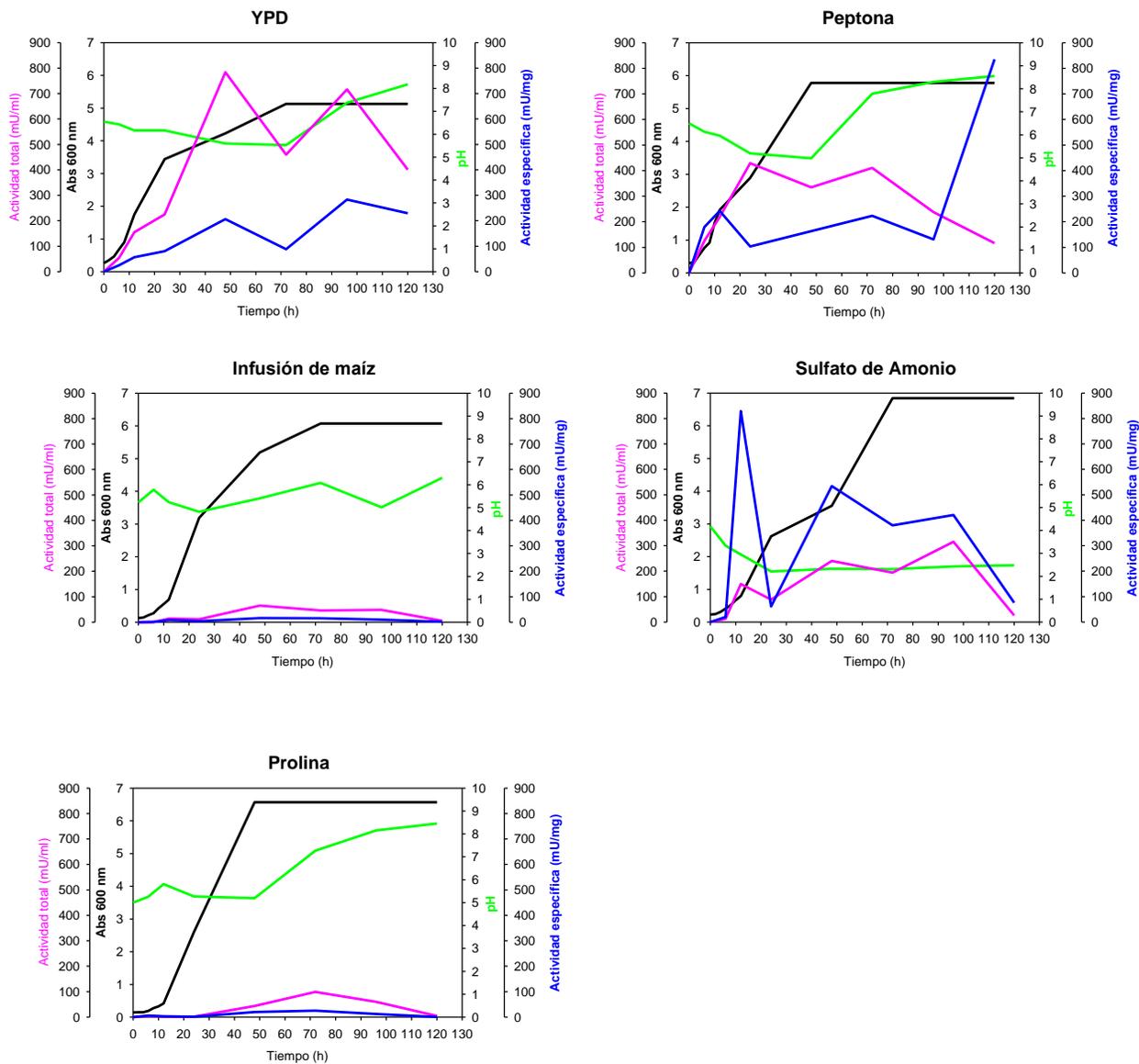


Figura 13. Estudio cinético de la producción de psrAPE de *S. reilianum* en medios de cultivo. La actividad enzimática fue determinada en los extractos intracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos.

La actividad total de dipeptidilaminopeptidasa psrDAP fue mayoritaria en YPD y en el medio mínimo con peptona. En el primer caso la producción de la enzima se encontró asociada al crecimiento del hongo aunque sus valores disminuyeron a las 120 horas, en el segundo caso la actividad enzimática se asoció a la fase logarítmica del crecimiento (Figuras 14 y 15). La actividad específica fue mayor en el medio mínimo con peptona a las 120 horas. En el medio mínimo con infusión de maíz se encontraron niveles bajos asociados a la fase estacionaria de crecimiento (Figura 16). No se encontró actividad en los medios mínimos con amonio y con prolina.

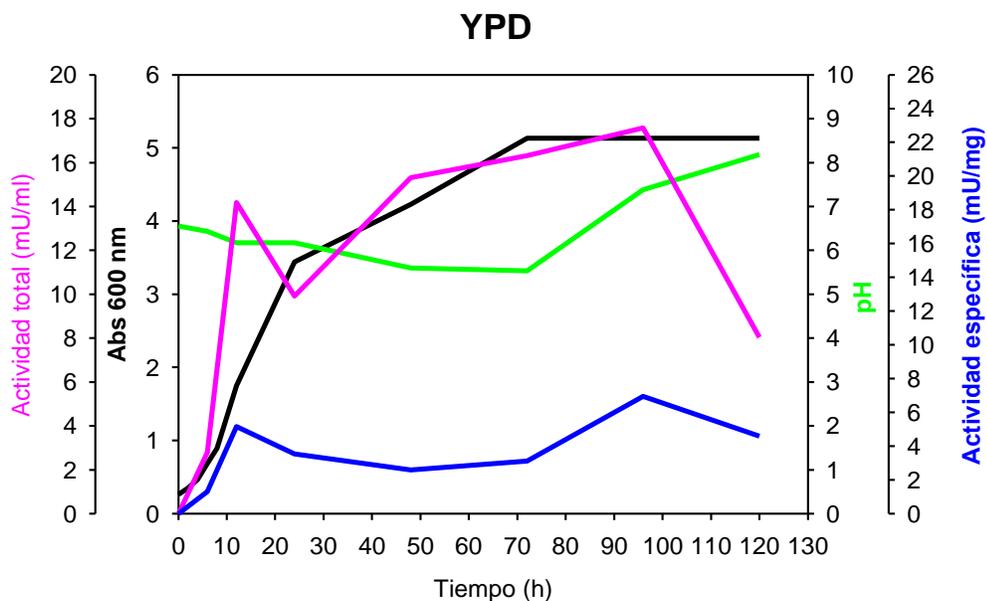


Figura 14. Cinética de producción de psrDAP de *S. reilianum* en el medio YPD. La actividad enzimática fue determinada en los extractos extracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos. Actividad específica -- Actividad total -- Crecimiento -- pH --

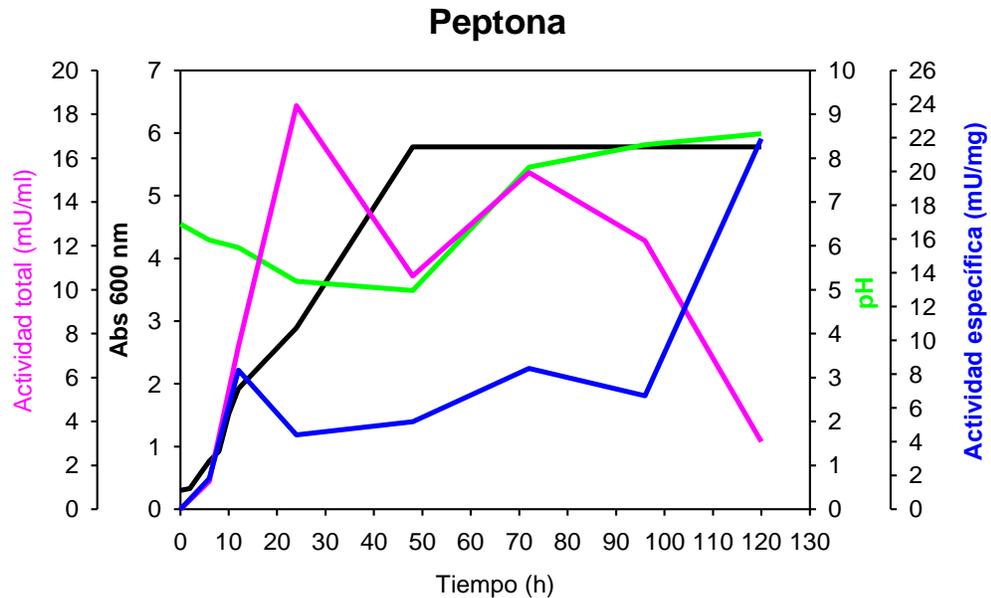


Figura 15. Cinética de producción de psrDAP de *S. reilianum* en el medio Peptona. La actividad enzimática fue determinada en los extractos extracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos. Actividad específica -- Activad total -- Crecimiento -- pH --

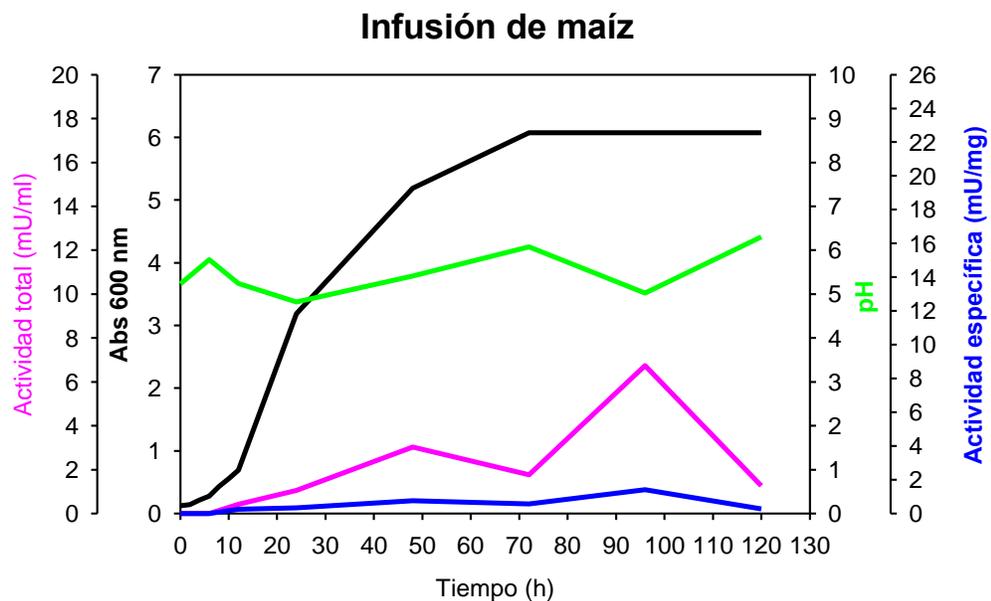


Figura 16. Cinética de producción de psrDAP de *S. reilianum* en el medio de Infusión de Maíz. La actividad enzimática fue determinada en los extractos extracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos. Actividad específica -- Activad total -- Crecimiento -- pH --

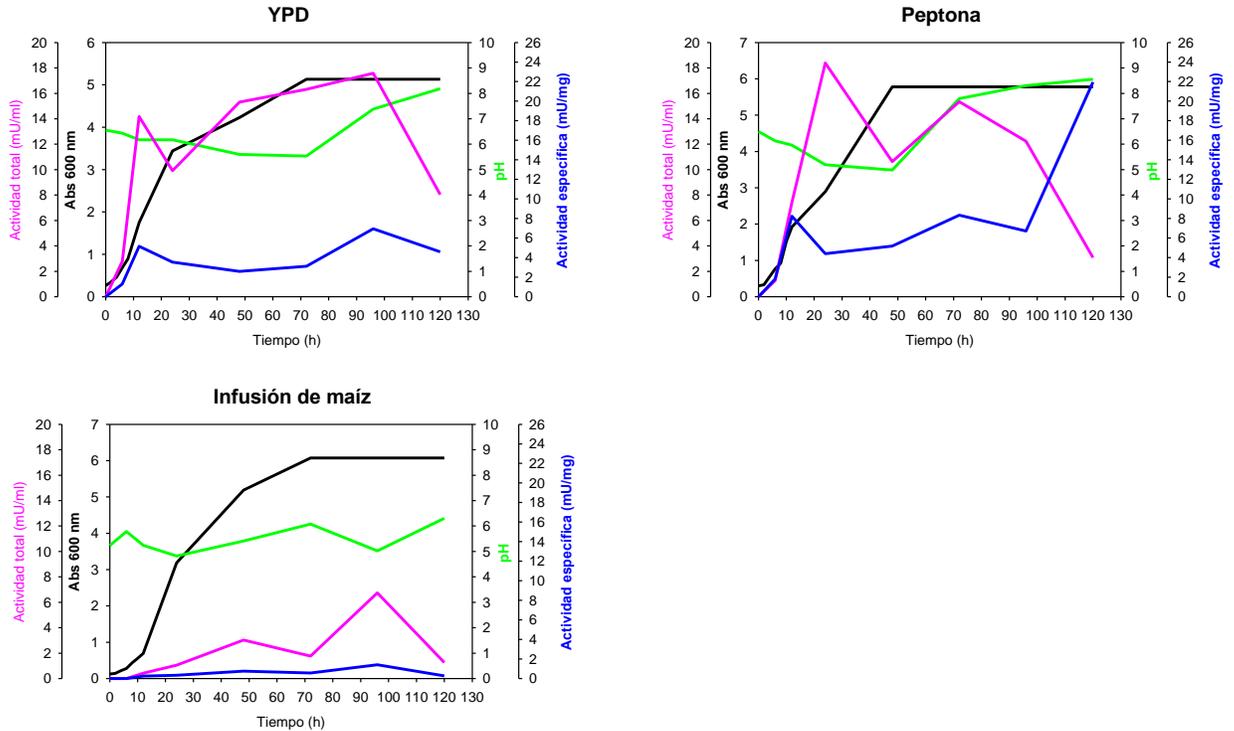
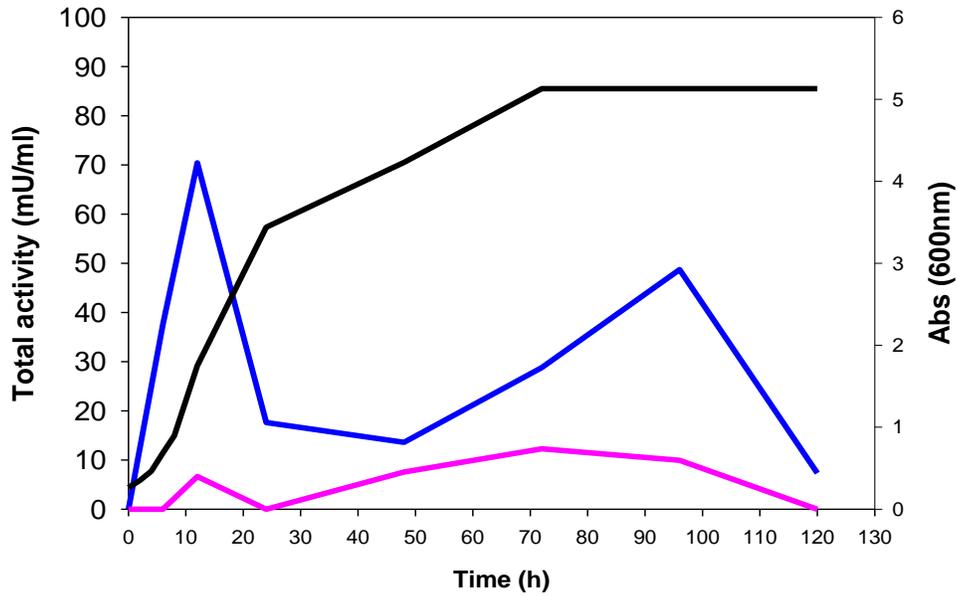


Figura 17. Estudio cinético de la producción de psrDAP de *S. reilianum* en diferentes medios de cultivo. La actividad enzimática fue determinada en los extractos intracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos.

Como se muestra en la (Figura 18), la actividad de psrCP se pone de manifiesto con la adición de desoxicolato de sodio. Con este antecedente se decidió utilizar este detergente para la realización de todas las determinaciones de esta proteasa.

La actividad de psrCP fue mayoritaria en el medio YPD en donde se encontraron las mayores valores tanto de actividad total como de actividad específica, en este mismo medio la producción de la enzima se asocia a las fases logarítmica y estacionaria del crecimiento, mientras que en el medio mínimo con amonio se asocia a la fase logarítmica y en el medio mínimo con peptona al crecimiento del hongo (Figuras 19, 20 y 22). En el medio mínimo con infusión de maíz la producción de la enzima fue baja comparada con el resto de los medios utilizados (Figura 21). No se encontró actividad en el medio mínimo con prolina.



◆ Con desoxicolato de sodio ▲ Sin desoxicolato de sodio ● Crecimiento

Figura 18. Ensayo de activación de psrCP de *S. reilianum* con la adición de desoxicolato de sodio.

Se observa que con la presencia de dicho detergente se determina la actividad de esta enzima.

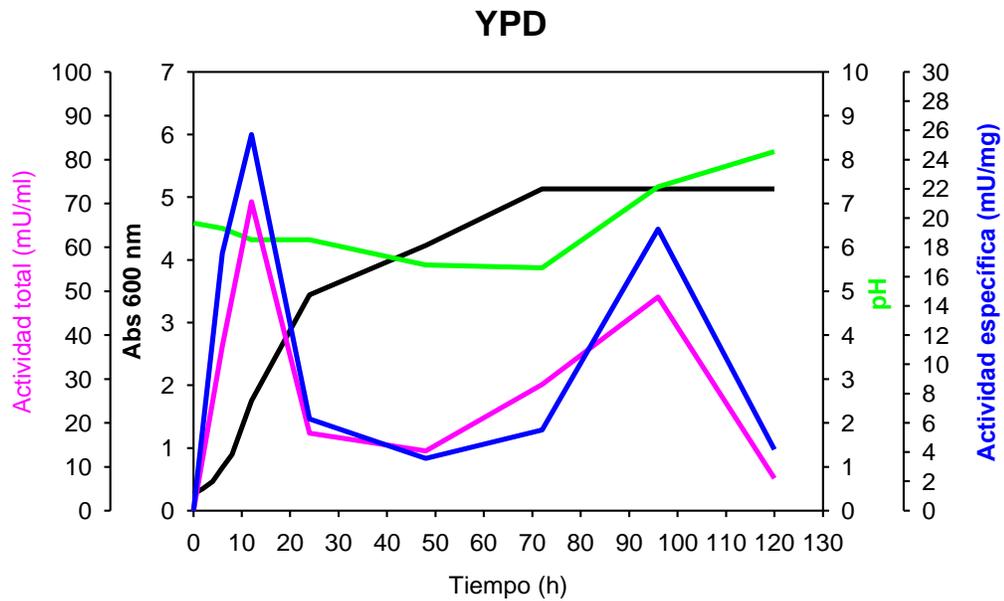


Figura 19. Cinética de producción de psrCP de *S. reilianum* en el medio YPD. La actividad enzimática fue determinada en los extractos extracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos. Actividad específica -- Activad total -- Crecimiento -- pH --

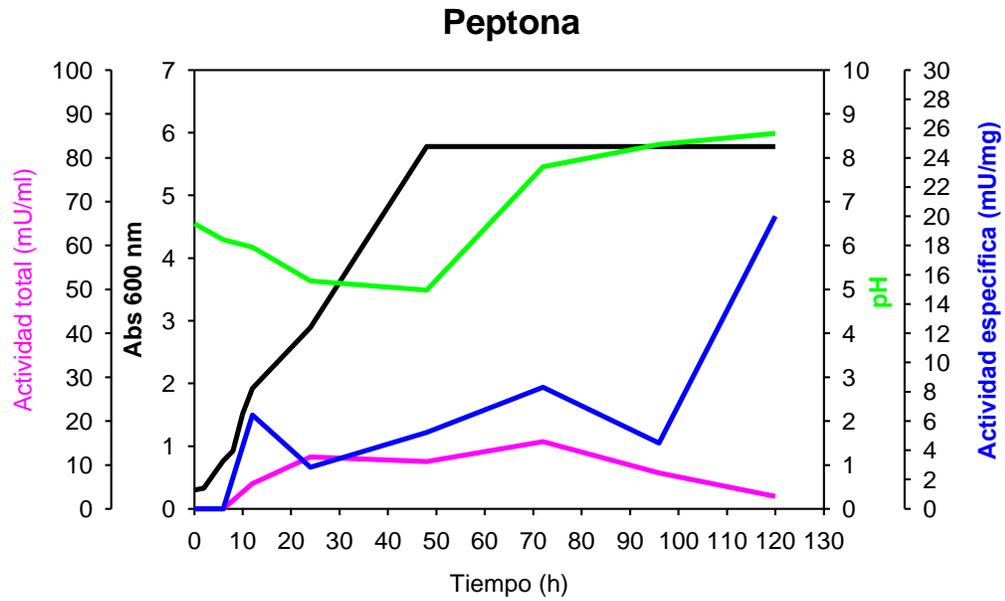


Figura 20. Cinética de producción de psrCP de *S. reilianum* en el medio Peptona. La actividad enzimática fue determinada en los extractos extracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos. Actividad específica -- Activad total -- Crecimiento -- pH --

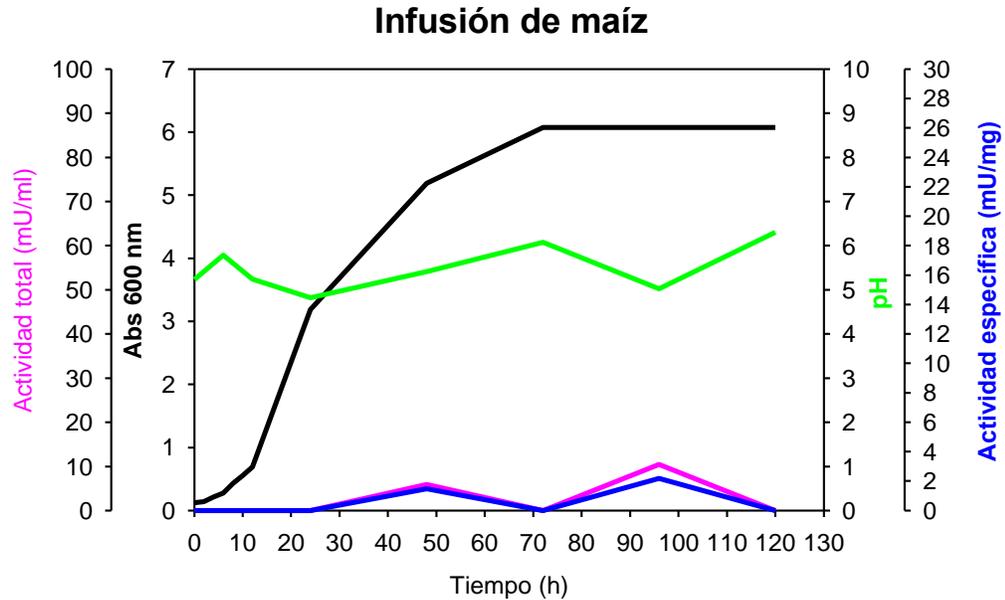


Figura 21. Cinética de producción de psrCP de *S. reilianum* en el medio de Infusión de Maíz . La actividad enzimática fue determinada en los extractos extracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos. Actividad específica -- Activad total -- Crecimiento -- pH --

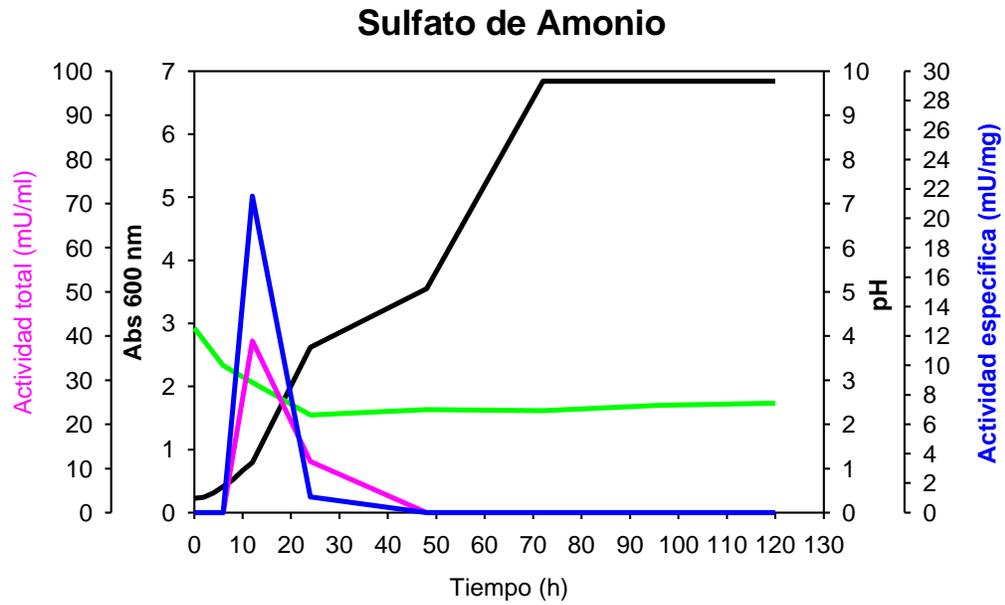


Figura 22. Cinética de producción de psrCP de *S. reilianum* en el medio de Amonio. La actividad enzimática fue determinada en los extractos extracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos. Actividad específica -- Activad total -- Crecimiento -- pH --

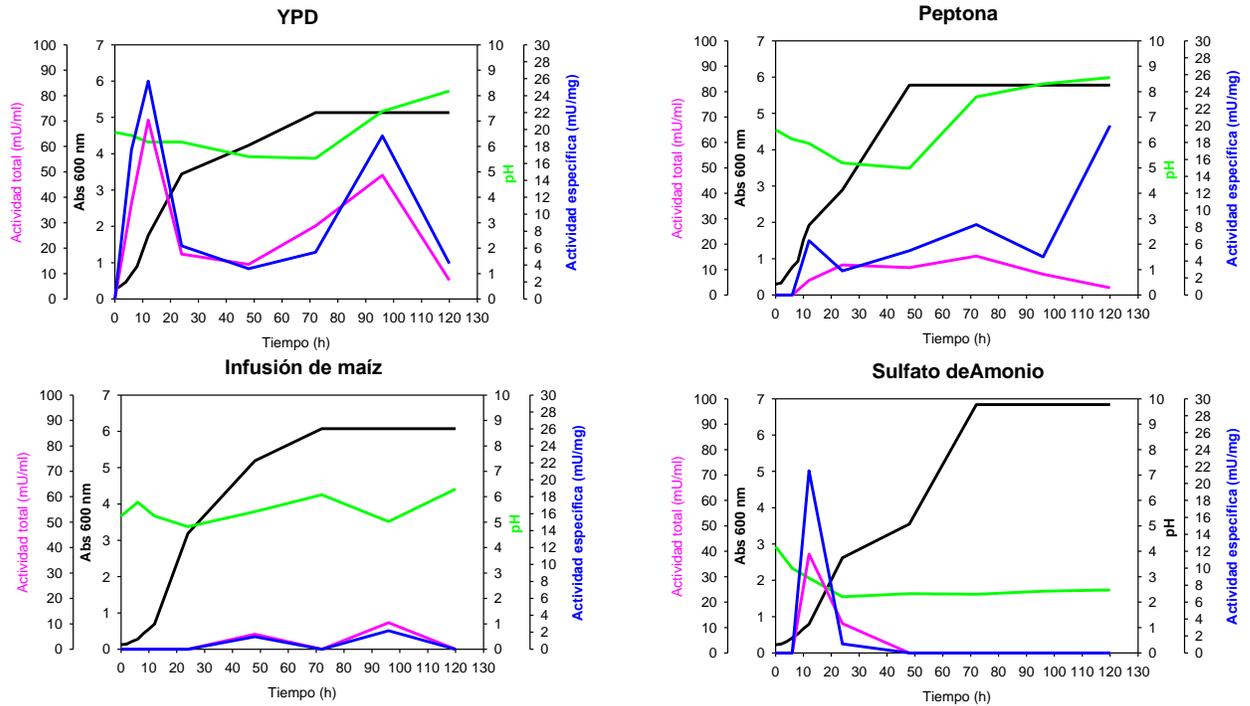


Figura 23. Estudio cinético de la producción de psrCP de *S. reilianum* en diferentes medios de cultivo. La actividad enzimática fue determinada en los extractos intracelulares obtenidos como se describe en los materiales y métodos.

VI.4. FRACCIONAMIENTO Y LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA PROTEASAS psrAPE, psrDAP y psrCP.

La actividad de psrAPE se encontró localizada únicamente en la fracción soluble (psrAPEs), por otro lado la proteasa psrDAP además de ser encontrada en esta misma fracción (psrDAPs) también se localizó en la fracción membranal (psrDAPm), estos mismos resultados fueron encontrados para psrCP (psrCPs y psrCPm), sin embargo, en el caso de psrDAP la actividad fue mayoritaria en la fracción soluble mientras que psrCP fue en la fracción membranal (Tabla 1).

Al realizar geles de poliacrilamida en condiciones nativas para revelar el perfil de isoenzimas de las proteasas psrAPE y psrDAP, se encontró una sola banda de actividad para ambas enzimas en la fracción soluble y dos bandas de psrDAP en la fracción membranal (Figura 24).

TABLA 1. Distribución de la actividad de psrAPE, psrDAP y psrCP en diferentes fracciones celulares de *S. reilianum*.

Fracción celular	psrAPE Porcentaje de actividad	psrDAP Porcentaje de actividad	psrCP Porcentaje de actividad	Enolasa Porcentaje de actividad
Sobrenadante de 23 000 X g (Extracto libre de células)	100	100	100	100
Sobrenadante de 100 000 X g (Fracción soluble)	98	62	25	100
Precipitado de (Fracción membranal)	0	30	63	0

Las células fueron obtenidas a partir de un cultivo de 96 horas en medio YPD.

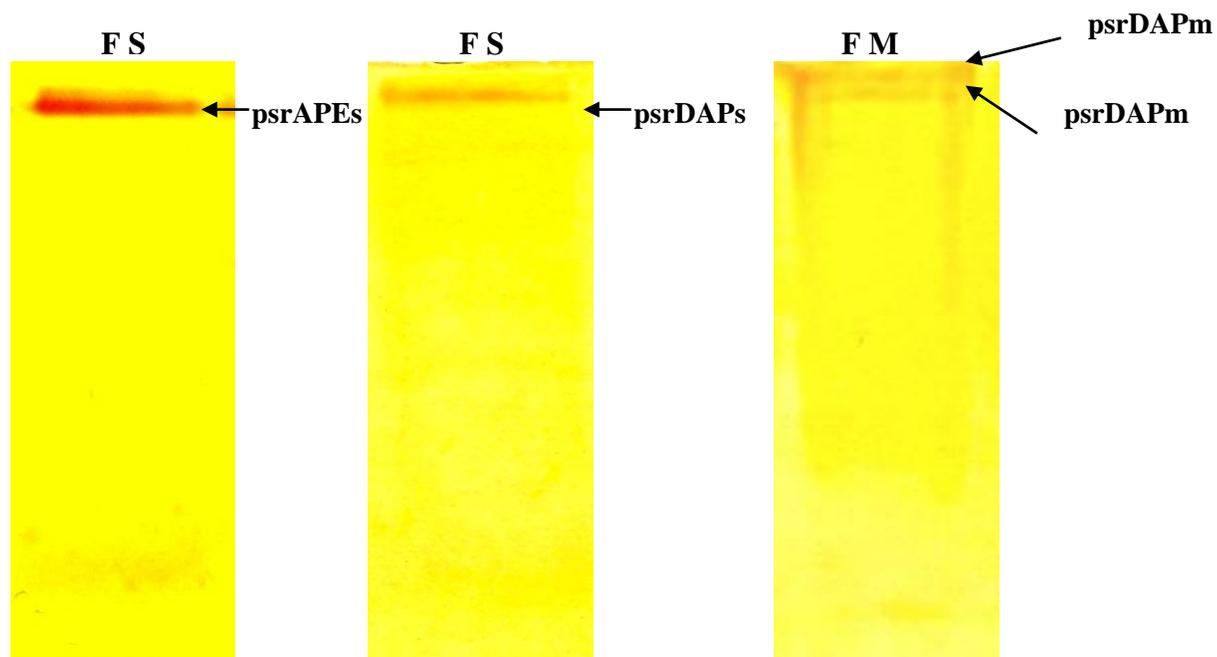


Figura 24. Geles de actividad de psrAPE y psrDAP. FS= Fracción Soluble. FM= Fracción Membranal. Las bandas se tiñen de color rojo las cuales indican la presencia de la actividad.

VI.5. EFECTO DE INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE PROTEASAS SOBRE LAS ACTIVIDADES DE psrAPE, psrDAP y psrCP de *S. reilianum*.

La actividad psrAPEs resultó ser una serín metalo proteasa al ser inhibida por el PMSF (inhibidor de serín proteasas), EDTA y 1-10, fenantrolina (inhibidores de metalo proteasas), sin embargo, se observó un claro efecto de inhibición debido a la acción de pepstatina A (inhibidor de aspartil proteasas). Como era de esperarse la Bestatina (inhibidor de aminopeptidasas) también inhibió considerablemente la actividad de la enzima. El E-64 presentó un ligero efecto sobre la proteasa.

La psrDAPs fue inhibida considerablemente por el E-64, lo que indica que se trata de una cisteín proteasa, sin embargo, se observó un ligero efecto de inhibición debido a la acción de inhibidores de metalo proteasas (EDTA y 1-10, fenatrolina). En cambio, psrDAPm fue inhibida mayoritariamente por PMSF aunque se observó una ligera inhibición con pepstatina A.

Probablemente la actividad de psrCPs es una serin proteasa al ser inhibida por PMSF, aunque inhibidores como pepstatina A y 1-10, fenantrolina mostraron cierto efecto inhibitorio sobre la enzima.

Al igual que psrCPs, la actividad de psrCPm también fue inhibida mayoritariamente por PMSF y considerablemente por la pepstatina A, sin embargo, esta misma enzima mostró sensibilidad al EDTA y al E-64. (Tabla 2).

TABLA 2. Efecto de inhibidores específicos de proteasas sobre la actividad de psrAi de *S. reilianum*.

Inhibidor	Concentración	Porcentaje de Actividad (%)				
		YPD*				
		psrAPEs	psrDAPs	psrDAPm	psrCPs	psrCPm
Sin inhibidor		100	100	100	100	100
Bestatina mM	100	81	100	100	100	100
	200	56	100	100	100	100
Pepstatina μ M	5	77	100	94	72	81
	25	4	100	87	39	49
PMSF mM	1	59	100	100	28	86
	5	2	100	76	14	5
EDTA mM	1	42	100	100	100	81
	10	2	90	100	100	19
1-10 fenatrolina mM	1	3.9	100	100	99	90
	10	3.7	75	94	62	83
E-64 μ M	10	98	100	97	100	72
	50	79	8	79	100	59

*Los extractos enzimáticos fueron obtenidos a partir de un cultivo de 96 horas. Los sufijos s y m indican que las actividades fueron determinadas en la fracción soluble o en la fracción membranal respectivamente.

VII. DISCUSIÓN

Uno de los cultivos más utilizados a nivel mundial en la alimentación humana y de ganado, es el maíz, se sabe que aproximadamente mas de 120 millones de hectáreas son utilizadas en todo el mundo para la producción de este cereal. Dentro de las enfermedades más importantes de este cultivo se encuentra el carbón de la espiga ocasionado por *S. reilianum*, una enfermedad de distribución mundial cuyos síntomas se manifiestan al final de la etapa de floración. (Munkvold, 2003; Matyac y Kommedahl, 1985).

Para la realización del presente trabajo, se utilizó una cepa de *S. reilianum* aislada de la localidad de Cinta Larga municipio de Mixquiahuala Hgo lugar en donde la enfermedad es un problema importante. Se encontró que la morfología colonial y microscópica correspondían a las reportadas por Romero en 1993, sin embargo para corroborar su identidad fue necesario realizar la metodología descrita por Xu *et al.* (1999), la cual se basa en la utilización de una PCR específica, la cual nos permitió realizar la identificación a nivel molecular de la cepa utilizada.

El estudio de la biología de *S. reilianum* se ha limitado a escasos reportes enfocados a la determinación de su ciclo de vida (Baier y Kruger 1962; Al-Sohaily *et al.*, 1963; Frederiksen, 1977; Teferi *et al.*, 1989; Martinez *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2002), sin embargo, las actividades proteolíticas específicas intracelulares de este hongo no se habían estudiado. En este trabajo se encontró que *S. reilianum* produce al menos una proteasa con actividad de aminopeptidasa denominada psrAPE, probablemente esta enzima es similar a la que ha sido reportada en *U. maydis* (pumAPE) la cual ya fue purificada y caracterizada bioquímicamente (Mercado-Flores, 2003b, 2004). Tanto psrAPE y pumAPE se localizan en la fracción soluble y son afectadas por los mismos inhibidores específicos de proteasas (Bestatina, PMSF, EDTA y 1-10, fenantrolina) lo que nos indica que pertenecen al grupo de la serín metalo proteasas. A pesar de que las aminopeptidasas están ampliamente distribuidas en eucariotes y procariotes (Taylor, 1993), los reportes acerca del estudio de este tipo de enzimas en basidiomicetos son muy escasos. Por ejemplo se han purificados y caracterizado las aminopeptidasas intracelulares de los hongos *Lyophyllum cinerascens* y *Grifola frondosa* (Abdus-Sattar *et al.*, 1989; Nishiwaki y Hayashi, 2001), la aminopeptidasa de *Trametes trogi* ha sido detectada en los sobrenadantes de los medios de cultivo durante el crecimiento del

micelio (Caporale *et al.*, 1996) y *Coprinus cinereus* produce una leucin-aminopeptidasa que es detectada durante la profase de la meiosis (Ishizaki *et al.*, 2002).

En la levadura *S. cerevisiae* se ha descrito una aminopeptidasa de localización vacuolar denominada yscCo, la cual solo es activa en presencia de pequeñas cantidades de iones Co^{2+} . La enzima corta de manera eficiente los sustratos Alc-prop-4-pNa y Lys-4-pNa y es inhibida por el EDTA (Hirsch *et al.*, 1989). Aunque no es posible saber si la aminopeptidasa psrAPE es de localización vacuolar, muy probablemente sea similar a la yscCo debido a que hidroliza el sustrato Lys-4-pNa y es inhibida por el EDTA.

Una de las funciones importantes de las aminopeptidasas es la generación de aminoácidos básicos a partir de los péptidos generados por el proteasoma (Hilt y Wolf, 1992; Kisselev *et al.*, 1999), así como, la activación e inactivación de péptidos biológicamente activos, tal es el caso del gen *rep1* de *U. maydis* que codifica para una proteína de 652 aminoácidos producida durante el crecimiento filamentoso del hongo, a partir de la cual se generan 11 péptidos que finalmente se localizan en la pared celular y que son los encargados de mediar la hidrofobicidad del micelio aéreo del hongo, lo cual es importante durante el proceso de infección. Específicamente el péptico 1-4, requiere del corte de una lisina localizada en el extremo amino terminal para ser activo, dicha actividad tiene que ser realizada por una lisin aminopeptidasa (Wösten *et al.*, 1996). La aminopeptidasa psrAPE podría tener cualquiera de las funciones antes mencionadas.

Otra proteasa encontrada en *S. reilianum* fue la dipeptidilaminopeptidasa psrDAP. En *U. maydis* se reportó una actividad similar a esta enzima denominada pumDAP, sin embargo se pueden observar diferencias en cuanto a su producción. En el caso de pumDAP, ésta se produce únicamente en medios mínimos con prolina e infusión de maíz como fuente de nitrógeno (Mercado-Flores *et al.*, 2003b), mientras que psrDAP se produce en el medio YPD y en un medio mínimo con pepetona, aunque se detectan niveles bajos en un medio con infusión de maíz.

Las dipeptidil aminopeptidasas de origen fúngico mejor caracterizadas son las de *S. cerevisiae* denominadas yscDAP A y yscDAP B, la primera se localiza en la membrana del aparato de Golgi y participa en el procesamiento del precursor del factor sexual α , (Julius *et al.*, 1983, Santa Anna-Arriola *et al.*, 1994). La yscDAP B se encuentra unida a la membrana vacuolar y su función *in vivo* es desconocida, sin embargo la sobre expresión de yscDAP B en

mutantes que carecen de yscDAP A, da como resultado la maduración del factor sexual α (Roberts *et al.*, 1989). En *S. reilianum* se ha descrito que es necesario la producción de feromonas para la complementación sexual del hongo en este caso psrDAP se encontró asociada a las fracciones soluble (psrDAPs) y membranal (psrDAPm). Probablemente esta última sea una actividad con funciones similares a las dipeptidilaminopeptidasas membranales de *S. cerevisiae*.

S. reilianum produce la actividad de carboxipeptidasa denominada psrCP la cual se localiza tanto en la fracción soluble como en la membranal, la primera se inhibe considerablemente por PMSF (inhibidor de serín proteasas) y por inhibidores de metaloproteasas lo que podría indicar que se trata de una mezcla de enzimas con la misma actividad catalítica. En la levadura *S. cerevisiae*, se han descrito dos carboxipeptidasas de localización vacuolar denominadas yscY y yscS, la primera es una serin proteasa y la segunda es una metaloproteasas dependiente de Zinc (Hirsh *et al.*, 1989). Se ha demostrado que la levadura produce un polipéptido de localización citoplasmática denominado I^c el cual es un inhhidor específico de la carboxipeptidasa yscY. Para poner de manifiesto la actividad en lisados celulares de la levadura, es necesaria la adición de desoxiolato de sodio o una incubación previa a pH ácido para que ocurra la disociación del inhibidor endógeno y la proteasa y así poder derteminar la actividad. Algo similar deberá estar ocurriendo en *S. reilianum* debido a que para poner detectar la actividad de psrCP fue necesario adicionar desoxicolato de sodio a la mezcla de reacción, lo que nos indica la existencia de un inhibidor endógeno que regula la actividad de la enzima.

Por otro lado se enconcontró en *S. reilianum* una actividad adicional de psrCP de localización membranal (psrCPm) la cual a diferencia de psrCPs además de ser inhibida por PMSF e inhibidores de metaloproteasas su actividad se ve reducida por el E-64 (inhibidor de cisteín proteasa). En *S. cerevisiae* se ha descrito una carobixipeptidasa de localización membranal denominada ysc α la cual es inhibida por PMSF y por compuestos que contienen mercurio lo que indica que además de una serina, la enzima requiere de un grupo cisteínico en el sitio activo para llevar a cabo la catálisis (Hirsh *et al.*, 1989). Lo anterior pordría ser similar para psrCP debido a que su actividad es disminuida con inhibidores de serín y cisteín proteasas.

A diferencia de *S. reilianum* en *U. maydis* no se ha encontrado a nivel bioquímico actividad de carboxipeptidasa (Mercado-Flores *et al.*, 2003b).

Durante el desarrollo del trabajo se encontró que las actividades de psrAPE y psrCP mostraron una disminución importante en su actividad con la adición pepstatina A (inhibidor de aspartil-proteasas). En la levadura *S. cerevisiae* se ha descrito que la proteinasa vacuolar yscA activa a otras proteasas vacuolares (Hirsh *et al.*, 1989), por otro lado, en *S. reilianum* se ha descrito una aspartil proteasa intracelular denominada psrA (Hernández 2008). Podría ser el caso que al adicionar pepstatina A a la mezcla de reacción, la psrA es inhibida ocasionando que la proteasas psrAPE y psrCP también se vean afectadas en su actividad.

Los resultados que se presentan aquí son el primer reporte de las proteasas de tipo específico psrAPE, psrDAP y psrCP de *S. reilianum*, probablemente estas enzimas tengan funciones importantes durante el ciclo de vida y/o patogénesis de este basidiomiceto.

VIII. CONCLUSIONES

- Se identificó la cepa de *S. reilianum* del estado de Hidalgo mediante PCR específica utilizando el método Xu *et al.* (1999).
- Se demostró que *S. reilianum* produce las actividades de psrAPE y psrDAP mediante pruebas en placa utilizando los sustratos cromogénicos Lys- β -Naftilamida y Lys-Pro- β -Naftilamida respectivamente..
- *S. reilianum* produce la actividad proteolítica de psrAPE en todos los medios de cultivo utilizados en este trabajo.
- La actividad de psrDAP fue encontrada en los medios YPD y mínimos con peptona e infusión de maíz, mientras tanto, la psrCP además de ser detectada en los mismos medios también fue producida en un medio mínimo con amonio.
- El mejor medio para la producción de las tres actividades proteolíticas en estudio fue YPD, sin embargo, la psrAPE también fue producida mayoritariamente en el medio mínimo con amonio.
- La actividad de psrCP esta regulada por un inhibidor endógeno debido a que es necesaria la adición de desoxicolato de sodio a la mezcla de reacción para ponerla de manifiesto.
- La psrAPE resultó ser de localización soluble, mientras que las actividades de psrDAP y la psrCP se localizaron tanto en la fracción soluble como membranal.
- Mediante corrimientos electroforéticos en condiciones no desnaturizantes se encontró que *S. reilianum* produce al menos una banda de actividad de las proteasas de localización soluble psrAPE y psrDAP, sin embargo, fueron detectadas dos bandas para actividad membranal de psrDAP.
- La actividad soluble de psrAPE es una metalo-serin proteasa al ser inhibida por la Bestatina, EDTA, 1-10 fenantrolina y PMSF.
- La psrDAPs es inhibida por el E-64 indicando que se trata de una cisteín-proteasa, mientras que la psrDAPm además de ser inhibida por este mismo compuesto también es afectada por el PMSF.

- La psrCPs es una metalo-serín proteasa al ser inhibida por 1-10 fentrolina y PMSF, mientras que la psrCP de localización membranal además de ser afectada por estos mismos inhibidores su actividad se ve reducida con la adición de E-64 y EDTA.
- El estudio de las proteasas específicas intracelulares descritas en este trabajo permitirá asignar el papel fisiológico de estas enzimas en el ciclo de vida y/o patogénesis del *S. reilianum*.

IX. Referencias

1. **Abdus Sattar A. K., T. Yoshimoto y D. Tsuru. 1989.** Lyophyllum cinerascens aminopeptidase: purification and enzymatic properties. Arch. Biochem. Biophys. 274: 241-250.
2. **Achstetter, T., C. Ehmman, A. Osaki y D. H. Wolf. 1984.** Proteolysis in eucariotic cells. Proteinase yscE, a new yeast peptidase. J. Biol. Chem. **259**: 13344-13348.
3. **Agrios, G. N. 1999.** Fitopatología. Editorial Limusa, México. 3ª Edición, pp. 493-495.
4. **Alexopoulos, C. J. and C.H. Mims. 1985.** Introducción a la micología. Ediciones Omega, S. A. Plató, Barcelona. Pp. 638.
5. **Alghisi, P. y F. Favaron. 1995.** Pectin-degrading enzymes and plant-parasite interaction. Eur. J. Plant Pathol. **101**: 365-375.
6. **Al-Sohaily IA, Mankin CJ, Semeniuk G. 1963.** Physiologic specialization of *Sphacelotheca reiliana* to sorghum and corn. Phytopathology 53:723-726.
7. **Ammemer, G., C. P. Hunter, J. H. Rothman, G. C. Saari, L. A. Valls y T. H. Stevens. 1986.** PEP4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursor. Mol. Cell. Biol. **6**: 2490-2499
8. **Annis, S. L. y P. H. Goodwin. 1997.** Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. Eur. J. Plant. Pathol. **103**: 1-14.
9. **Aibara, S., R. Hayashi y T. Hata. (1971).** Physical and chemical properties of yeast proteinase C. Arg. Biol. Chem. **35**: 658-666.
10. **Ball, A. M., A. M. Ashby, M. J. Daniels, D. S. Ingram y K. Johnstone. 1991.** Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* with oilseed rape. Physiol. Mol. Plant Pathol. **38**: 147-161.
11. **Baier W, Kruger W, 1962.** *Sphacelotheca reiliana* on maize.II-Field studies on the effect of soil conditions. S Afri-can J Agric Sci 5:183-190.
12. **Bindschedler, L.V., P. Sanchez, S. Dunn, J. Mikan, M. Thangavelu, J. M. Clarkson y R. M. Cooper. 2003.** Deletion of the SNP1 trypsin protease from *Stagonospora nodorum* reveals another major protease during infection. Fungal Genet Biol. **38**: 43-53.
13. **Birnboim, R. C. y J. Doly. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleid Acids Res. **7**: 1513-1523.

14. **Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72:** 203-213.
15. **Caporale C., A. M. Garzillo, C. Caruso y V. Buonocore. 1996.** Characterization of extracellular protease from *Trametes trogii*. *Phytochemistry* **41:** 385-393.
16. **Chang, Y. H. y J. A. Smith. 1989.** Molecular cloning and sequencing of genomic DNA encoding aminopeptidase I from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **264:** 6979-6983.
17. **Chen, Z. B., A. Lax, T. Cleverland y J. Russin. 1999.** Inhibition of plant pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor over-expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65:** 1320-1324.
18. **Choi, G. H., D. M. Pawlyk, B. Rae, R. Shapira y D. L. Nuss. 1993.** Molecular analysis and overexpression of the gene encoding endothiapepsin, an aspartic protease from *Cryphonectria parasitica*. *Gene* **125:** 135-141.
19. **Clark, S. J., M. D. Templeton y P. A. Sullivan. 1997.** A secreted aspartic proteinase from *Glomerella cingulata*: purification of enzyme and molecular cloning of the cDNA. *Microbiology* **143:** 1395-1403.
20. **De León, C. 2004.** Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en el campo. 4ª. Edición. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 446-447.
21. **Di Pietro A., M. D. Huertas –Gonzalez, J. F. Gutierrez Corona, G. Martinez-Cadena, E. Megleczy y M. I. Roncero. 2001.** Molecular characterization of a subtilasa from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact.* **14:** 653-662.
22. **Emori, Y., T. Tsukahara, H. Kawasaki, S. Ishiura, H. Suhira y K. Suzuki. 1991.** Molecular cloning and functional analysis of three subunits of yeast proteasome. *Mol. Cell. Biol.* **11:** 344-353.
23. **Fredericksen, R. A. 1977.** Head smut of corn and sorghum. *Proc. Corn Sorghum Res. Conf.* **32:** 89-104.

24. **Fuentes, F. S. 1962.** Estudios sobre algunos métodos de prevención contra *Sphacelotheca reiliana* (Kuhn) Clint del maíz en la zona de el Bajío, México. (Ustilaginales, Ustilaginaceae). Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. pp. 62.
25. **Fujiwara, T., K. Tanaka, E. Orino, T. Yoshimura, A. Kumatori, T. Tamura, C. H. Chung, T. Nakai, K. Yamagushi, S. Shin, A. Kakikuza, S. Nakanishi y A. Ichihara. 1990.** Proteasomes are essential for yeast proliferation. *J. Biol. Chem.* 265: 16604-16613.
26. **Fukiya S., T. Kuge, T. Tanishima, T. Sone, T. Kamakura, I. Yamaguchi y F. Tomita. 2002.** Identification of putative vacuolar serine protease gene in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66:663-666.
27. **García-Álvarez, N., C. Bordallo, S. Gascon y P. Suárez-Rendueles. 1985.** Purification and characterization of a thermosensitive X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (dipeptidylaminopeptidase yscV from *Saccharomyces cerevisiae*). *Biochem. Biophys. Acta.* 832: 119-125.
28. **Groll, M., L. Ditzel, J. Lowö, D. Stock, M. Bochtler y H. D. Bartunik. 1997.** Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* 386: 463-471.
29. **Hansen, R., R. Switzer, H. Hinze y H. Holzer. 1977.** Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases and proteinase inhibitors in yeast. *Biochem. Biophys. Acta.* 496: 103-114.
30. **Heinemeyer, W., J. A. Kleinschmidt, J. Saidowsky, C. Escher y D. H. Wolf. 1991.** Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic- multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J.* 10: 555-562.
31. **Hemmings, B. A., G. S. Zubenko, A. Hasilik y E. W. Jones. 1981.** Mutant defective in processing of an enzyme located in the lysosome-like vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 435-439.
32. **Herrera, T. y M. Ulloa. 1990.** El reino de los hongos. *Micología básica y aplicada.* Universidad Autónoma de México, Edit. Fondo de la Cultura Económica. México D. F. pp. 294-301
33. **Hernández, M. M.** Estudio de las proteasas ácidas de localización extracelular e intracelular del hongo fitopatogeno del maíz *Sporisorium reilianum*. 2008.

34. **Hilt, W. y D. H. Wolf. 1992.** Stress-induced proteolysis in yeast. *Mol. Microbiol.* **6:** 2437-2442.
35. **Hirsch, H. H., P. Suárez-Rendueles, T. Achstetter y D. H. Wolf. 1988.** Aminopeptidase yscII of yeast. Isolation of mutants and their biochemical and genetic analysis. *Eur. J. Biochem.* **173:** 589-598.
36. **Hirsch, H. H., P. Suárez-Rendueles, and D. H. Wolf. 1989.** Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) proteinases: Structure, characteristics and functions, p. 134-200. *In:* E. F. Walton, and G. T. Yarranton (ed), *The molecular and cell biology of yeasts*, Blackie & Sons Ltd., London.
37. **Hirschhorn, E. 1986.** Las Ustilaginales de la flora Argentina. Publicación especial. Comisión de Investigaciones Científicas. La Plata Argentina. pp. 530.
38. **Hislop, E. S., J. L. Paver y J. P. P. Keon. 1982.** An acid protease produced by *Monilinia fructigena* in vitro and in infected apple fruits, and its possible role in pathogenesis. *Journal of General Microbiology.* **128:** 799-807.
39. **Hoffman, C. S. y F. Winston. 1987.** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* **57:** 267-272.
40. **Holzer H y P. C. Heinrich. 1988.** Control of proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **49:** 63-91.
41. **Ishizaki T., A. Tosaka, T. Nara, N. Aoshima, S. Namekawa, K. Watanabe, F. Hamada, A. Omori, K. Sakaguchi. 2002.** Leucine aminopeptidase during meiotic development. *Eur. J. Biochem.* **269:** 826-832.
42. **Jara, P., S. Gilbert, P. Delmas, J. C. Guillemot, M. Kaghad, P. Ferrara y G. Loison. 1996.** Cloning and characterization of the eapB y eapC genes of *Cryphonectria parasitica* encoding two new acid proteinases, and disruption of eapC. *Mol. Gen. Genet.* **250:** 97-105.
43. **Jones, E. W. 1991.** The proteolytic system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266:** 7963-7966.
44. **Kisselev, A. F., T. N. Acopian, K. M. Woo y A. L. Goldberg. 1999.** The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20S proteasomes. Implication for

- understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **274**: 3363-3371.
45. **Julius D. B., L. Brake, G. Sprague y J. Thorner. 1983.** Yeast α Factor is processed for a larger precursor polypeptide: the essential role of membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase. *Cell* 32: 839-852.
 46. **Klionsky, D. J., P. K. Herman y S. D. Emr. 1990.** The fungal vacuole: Composition, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **54**: 266-292
 - Kunits, M. 1947.** Soybean trypsin inhibitors: II. general properties. *J. Gen. Physiol.* **30**: 290-310.
 47. **Knop, M., H. H. Schiffer, S. Rupp y D. H. Wolf. 1993.** Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanism. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **5**: 990-996.
 48. **Lerach, J. F., D. Diamond, J. M. Wozney y H. Boedtke. 1977.** RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions: a critical reexaminations. *Biochemistry* **16**: 43-47.
 49. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
 50. **Lenney JF. 1975.** Three yeast proteins that specifically inhibit yeast proteases A, B and C. *J. Bacteriol* 122:1265-1273.
 51. **Mack, H. J., Baggett, J. R., and Koepsell, P. A. 1984.** Effects of cultural practices on the incidence of head smut in sweet corn. *HortScience* 19(1):77-78.
 52. **Martínez, C., M. Bue' e, A. Jauneau, G. Becard, R. Dargent, and C. Roux. 1999.** Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *Zea* in vegetative shoot apex of maize. *Phytopatology* 89:247-253.
 53. **Martínez, C., A. Jauneau, C. Roux, C. Savy and R. Dargent. 2000.** Early infection of maize roots by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Protoplasma.* **213**: 83-92.
 54. **Martínez, C., M. Bue' e, A. Jauneau, G. Becard, R. Dargent, and C. Roux. 2001.** Effects of a fraction from Maize rot exudates on haploid strains of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Plant soil* 236:145-153.
 55. **Martínez, C., C. Roux A. Jauneau and R. Dargent. 2002.** The Biological cycle of *Sporisorium reilianum* f, sp. *Zea*: an overview using microscopy.

56. **Matyac, C. A. y T. Kommedahl. 1985.** Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. *Phytopathology*. **75**: 577-581.
57. **Mechler, B. y D. H Wolf. 1981.** Analysis of proteinase A function in yeast. *Eur. J. Biochem.* **121**: 47-52.
58. **Mechler B., M. Müller, H. Müller, F. Meussdoerffer y D. H. Wolf. 1982.** In vivo biosynthesis of the vacuolar proteinase A and B in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **257**: 11203-11206.
59. **Mechler B., M. Müller, H. Müller, y D. H. Wolf. 1988.** Biogenesis of the yeast lysosome (vacuole): biosynthesis and maturation of proteinase yscB. *EMBO J.* **7**: 1705-1710.
60. **Mercado-Flores, Y., G. Guerra-Sánchez, L. Villa-Tanaca y C. Hernández-Rodríguez. 2003a.** Purification and characterization of an extracellular non-aspartyl acid protease (pumAe) from *Ustilago maydis*. *Current Microbiol.* En prensa.
61. **Mercado-Flores, Y., C. Hernández-Rodríguez, J. Ruiz-Herrera y L. Villa-Tanaca. 2003b.** Proteinases and exopeptidases from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **95**:327-339.
62. **Mercado-Flores, Y., Y. Noriega-Reyes, B. Ramírez-Zavala, C. Hernández-Rodríguez y L. Villa-Tanaca. 2004.** Purification and characterization of Aminopeptidase (pumAPE) from *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**: 247-253.
63. **Mercado-Flores, Y., A. Trejo-Aguilar, L. Villa-Tanaca y C. Hernández-Rodríguez. 2005.** Purification and characterization of an intracellular aspartil acid protease (pumAi) from *Ustilago maydis*. *Can J Microbiol.* **51**: 171-175.
64. **Monod, M., B. Hube, D. Hess y D. Sanglard. 1998.** Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinases family in *Candida albicans*. *Microbiology* **144**: 2731-2737.
65. **Movahedi, S. y J. B. Heale. 1990.** Purification and characterization of an aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers ex Pers in culture and infected carrots. *Physiol. Mol. Plant Phatol.* **36**: 289-302.
66. **Munkvold, G.P. 2003.** Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu Rev Phytopathol.* **41**: 99-116.

67. **Murphy, J. M. y J. D. Walton. 1996.** Three extracellular proteases from *Cochliobolus carbonum*: cloning and targeted disruption of ALP1. *Mol Plant Microbe Interact.* **9**: 290-297.
68. **Nishiwaki T., y K. Hayashi. 2001.** Purification and characterization of an aminopeptidase from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 424-427.
69. **Oliver, R. y A. Osbourn. 1995.** Molecular dissection of fungal phytopagenicity. *Microbiology* **141**: 1-9.
70. **Olmedo-Monfil, V., C. Cortez-Penagos y A. Herrera-Estrella. 2004.** Three decades of fungal transformation: key concepts and applications. *Methods Mol. Biol.* **267**: 297-313.
71. **Orlowsky, M. 1990.** The multicatalytic proteinase complex, a major extrasosomal proteolytic system. *Biochemistry* **45**: 10289-10297.
72. **Pernas, M., E. Lopez-Solanilla, R. Sanchez-Monge, G. Salcedo y P. Rodríguez-Palenzuela. 1999.** Antifungal activity of a plant cystatin. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **12**: 624-627.
73. **Poussereau, N., S. Creton, G. Brillon-Grand, C. Rascle y M. Fevre. 2001a.** Regulation of *acpI*, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiology* **147**: 717-726.
74. **Poussereau, N., S Gente, C. Rascle, G. Billon-Grand y Fevre M. 2001b.** *aspS* encoding and unusual aspartyl protease from *Sclerotinia sclerotiorum* is expressed during phytopathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **194**:27-32.
75. **Ramírez, D. J. L., Sánchez, G. J. J. Y Chuela, B. M. 2000.** Selección recurrente en la población de maíz subtropical PABGT-CE. *Agrociencia* **34**(1):33-39.
76. **Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge y V. V. Deshpande. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 597-635.
77. **Rauscher, M., K. Mendgen y H. Deising. 1995.** Extracellular proteases of the rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Exp. Mycol.* **19**: 26-34.

78. **Roberts C. J., J. H. Pholig, J. H. Rothman y T. H. Stevens. 1989.** Structure, Biosynthesis and localization of dipeptidyl aminopeptidase B, an integral membrane glycoprotein of the yeast vacuole. *J. Cell. Biol.* 108: 1363-1373.
79. **Romero, C. S. 1993. Hongos fitopatógenos.** Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. Pp. 347.
80. **Rothman, J. M. y T. M. Stevens. 1986.** Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway. *Cell* **47**: 1041-1051.
81. **Ryan, C. A. 1990.** Protease inhibitors in plants: genes for improving defences against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 28: 425-429.
82. **Santa Anna-Arriola S. S. e I. Herskowitz. 1994.** Isolation and DNA sequence of the STE13 gene encoding dipeptidyl aminopeptidase. *Yeast.*10: 801-810.
83. Saheky, T., Y. Matsuda y H. Holzer. 1974. Purification and characterization of macromolecular inhibitors of proteinase A from yeast. *Eur. J. Biochem.* **47**: 325-332.
84. **Saheky, T. y H. Holzer. 1975.** Proteolytic activities in yeast. *Biochem. Biophys. Acta.* **348**: 203-214.
85. Santa Anna-Arriola S. S. e I. Herskowitz. 1994. Isolation and DNA sequence of the *STE13* gene encoding dipeptidyl aminopeptidase. *Yeast.*10: 801-810.
86. **Schimke, R. T. y D. Doyle. 1970.** Control of enzyme levels in animal tissues. *Ann. Rev. Microbiol.* **26**: 103-126.
87. **Shurtleff, C. M. 1980.** Compendium of corn disease. *American Phytopathological Society.* Pp. 105.
88. **Snetselaar KM., Mims CW., 1992** Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis* *Mycologia* 84:193-203.
89. **Sreedhar, L., D. Y. Kobayashi, T. E. Bunting, B. I. Hillman y F. C. Belanger. 1999.** Fungal proteinase expression in the interaction of plant pathogen *Magnaporthe poae* with its host. *Gene* **235**: 121-129.
90. **Stoll, M., M. Piepenbring, D. Begerow, and F. Oberwinkler. 2003.** Molecular phylogeny of *Ustilago* and *Sporisorium* species (Basidiomycota, Ustilaginales) based on internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Can. J. Bot.* **81**:976-984.

91. **Stromberg, E. L., Stienstra, W. C., Kommedahl, T., Matyac, C. A., Widels, C.E., and Geadelman, J. L. 1984.** Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana* in Minnesota. *Plant Disease* 68:880-884.
92. **Suárez-Rendueles, P., L. Villa, M. J. Arbesu y B. Escudero. 1991.** The proteolytic system of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**: 215-220.
93. **Suárez-Rendueles, P. y D. H. Wolf. 1988.** Proteinase function in yeast: biochemical and genetic approaches to a central mechanism of post-translational control in eukariotic cells. *FEMS Microbiol Lett.* **54**: 17-46.
94. **Taylor, A. 1993.** Aminopeptidases: structure and functions. *FASEB J.* **7**:290-298.
95. **Ten Have A., E. Dekkers, J. Kay, L. H. Philip y J. A. van Kan. 2004.** An aspartic proteinase gene family in the filamentous fungus *Botrytis cinerea* members with novel features. *Microbiology.* **150**: 2475-2489.
96. **Teferi A, Petitprez M, Valles V, Albertini L. 1989.** Influence of soil water potential and soil texture on infection of maize by head smut. *Agronomie* 9:677-682.
97. **Tung, W. L. y K. C. Chow. 1995.** A modified medium for efficient electrotransformation of *Escherichia coli*. *Trends. Genet.* **11**: 128-129.
98. **Umezawa, H. 1982.** Low-molecular-weight enzyme inhibitors of microbial origin. *Annu Rev Microbiol.* **36**: 75-99.
99. **Urbanek, H. y A. Kaczmarek. 1985.** Extracellular proteinases of the isolate of *Botrytis cinerea* virulent to apple tissues. *Acta Biochim Pol.* **32**: 101-109.
100. **Urbanek H. y G. Yirdaw. 1984.** Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and role in phytopathogenesis. *Acta Microbiol Pol.* **33**: 131-136.
101. **Vartivarian S. E. 1992.** Virulence properties and nonimmune pathogenic mechanism. *Clin. Infect. Dis.* **14**: 30-36.
102. **Walton, J. D. 1994.** Deconstructing the cell wall. *Plant. Physiol.* **104**: 1113-1118.
103. **White C. y N. Agabian. 1995.** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by environmental factors. *J. Bacteriol.* **177**: 5215-5221.

104. **Wösten, H. A. B., R. Bohlmann, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, M. Bölker y R. Kahmann. 1996.** A novel class of small amphipathic affect aerial hyphal growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*. The EMBO Journal. **15**:4274-4281.
105. **Xoconostle-Cazares B, C. A. Specht, P. W. Robbins, Y. Liu, C. Leon, J. Ruiz-Herrera. 1997.** Umchs5, a gene coding for a class IV chitin synthase in *Ustilago maydis*. Fungal Genet Biol .22:199-208.
106. **Xu, M. L., A. E. Melchinger, and T. Lübberstedt. 1999.** Species-specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reiliana* and *Ustilago maydis* by dot blot hybridization and PCR-based assays. Plant Dis. **83**:390-395.
107. **Yasuhara, T., T. Nakai y A. Ohashi. 1994.** Aminopeptidase Y, a new aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, properties, localization and processing by protease B. J Biol Chem. **269**: 1344-13650.
108. **Yerkes, Jr. W. D., Niederhauser, J. S. and et al. . 1959.** Some plant diseases observed in México in 1958. Plant Disease Reporter. 43:500.
109. **Yuan L. y G. T. Cole. 1989.** Characterization of proteinase inhibitors isolated from fungal pathogen *Coccidioides immitis*. J. Biochem. **257**: 729-736.
110. **Zubenko, G. S. y E. W. Jones. 1979.** Catabolite inactivation of gluconeogenetic enzymes in mutants of yeast deficient in proteinase B. Proc. Natl. Acad. Sci. **79**: 4581-4586.

Paginas web consultadas

1. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>

A n e x o s

X. Anexos

ANEXO I

I. Preparación de los medios de cultivos

Medio rico YPD:

- 1% Extracto de levadura
- 2% Peptona de gelatina
- 2% Dextrosa

pH final de 6.7

MEDIOS MINIMOS

YNB-Sulfato de Amonio:

- 0.17% YNB
- 2% Dextrosa
- 0.5% Sulfato de amonio

pH final de 4.0

YNB- Peptona:

- 0.17% YNB
- 2% Dextrosa
- 1% Peptona

pH final de 5.0

YNB- Prolina:

- 0.17% YNB
 - 2% Dextrosa
 - 0.5 % Prolina
- pH final de 6.0

YNB- Prolina:

- 0.17% YNB
 - 2% Dextrosa
 - 0.5 % infusión de maíz
- pH final de 7.0

Infusión de Maíz

- 500 g de Elote se hirvieron durante 15 minutos en 800 ml en agua destilada, la infusión resultante se filtró y se suplementó con 0.17% de YNB y 2% de Glucosa y se aforo a 1L con agua destilada.

Todos los medios fueron preparados con streptomycinina a una concentración 1µg/ml.

Cuando fue necesario preparar medio sólido se adicionó agar el 2%.

Los medios de cultivo fueron esterilizados a 120 Lb por 15 min.

ANEXO 2

II. Preparación de TAE 10X

Trisma Base	48.4 g
Ácido acético glacial.....	10.9 ml
EDTA.....	2.92 g
Agua desionizada.....	1000 ml

ANEXO 3

III. Preparación de inhibidores de proteasas.

1-10 Fenatrolina

Se preparó una solución a una concentración de 50 μM , para lo cual se pesaron 0.02 g de fenatrolina en 2 ml de agua destilada.

Bestatina

Se preparó una solución a una concentración de 1 μM de bestatina para lo cual se pesaron 0.7 mg en 2 ml de agua destilada.

E-64

Se preparó una solución a una concentración de 200 μM , para lo cual se pesó 0.143 mg de E-64 en 1 ml de agua destilada estéril.

Pepstatina

Se preparó una solución a una concentración de 200 μM , para lo cual se pesó 0.137 mg de peptatina en 1 ml de metanol.

EDTA

Se preparó una solución a una concentración de 50 mM, para lo cual se pesó 18.6 mg de EDTA en 1 ml de agua destilada estéril.

PMSF

Se preparó una solución a una concentración de 50 mM, para lo cual se pesó 8.7 mg de PMSF en 1 ml isopropanol.

