

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO.
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA.
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA.**



TESIS:

“Efecto inhibitorio de una cistatina recombinante de amaranto (*AhCPI*) sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos de importancia agrícola.”

P R E S E N T A

ERICK CORTES ONOFRE

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO PARASITOLÓGO.**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Junio 2008.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.



UNIDAD GUANAJUATO.

UBICACIÓN DEL TRABAJO.

El presente trabajo de tesis “**Efecto inhibitorio de una cistatina recombinante de amaranto (*AhCPI*) sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos de importancia agrícola.**” fue realizado por Erick Cortes Onofre en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Unidad Guanajuato., bajo la dirección de la Dra. Silvia Edith Valdés Rodríguez.



Irapuato, Guanajuato, 2008.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO.
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

“Efecto inhibitorio de una cistatina recombinante de amaranto (*AhCPI*)
sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos de importancia agrícola.”

T E S I S

Presentada por:

ERICK CORTES ONOFRE.

Que somete a consideración del H. Jurado Examinador como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

DR. ALBERTO FLORES OLIVAS.
Presidente del Jurado

DRA. SILVÍA E. VALDÉS RODRÍGUEZ
Sinodal

M.C. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE
Sinodal

DR. ERNESTO CERNA CHAVEZ.
Sinodal

DR. MARIO E. VÁZQUEZ BADILLO.
Coordinador de la División de Agronomía

DEDICATORIA

A Dios, quien me ha enseñado a equivocándome, quien me ha ayudado a ser cada vez mas fuerte reponiéndome de mis caídas y sobre todo por permitirme ser lo que debo de ser.

A quien mis padres (Martín Cortés Cuate y Gregoria Onofre Flores), por haberme dejado elegir mi propio camino creyendo en mis sueños, por enseñarme que solo necesito “soñar y buscar” para lograr el verdadero éxito, y sobre todo por inculcarme que ya soy alguien en la vida, y que ahora solo buscare ser alguien mejor.

A mis hermanos (Yaneth, Israel, Jazmín, Sandy, Ana†) con quienes viví grandes momentos de mi vida, quienes creen en mi sueños aun cuando no estén conmigo.

A mis sobrinas (Lytzi, Ingrid, Daniela) quienes me han enseñado a creer que los milagros existen, y que si las cosas se piden de corazón por si solas llegan cuando sea el momento de necesitarlas.

A mis abuelos: Martín† y Ernestina, Manuela y Guillermo quienes siempre me han hecho saber que por más lejos que este, la familia estará para acompañarme. A todos mis tías y tías, y personas que ya forman partí de la familia.

... Dedicada especialmente a aquella persona que siempre creyó que con el hecho de soñar y desear podre realizar lo mas anhelado en esta vida., descanse en paz Anabel Cortes Onofre “Para nosotros siempre vivirás en nuestros corazones, “Tal vez hoy no nos veremos, pero cuanto el momento llegue así será”.

Att: Tu familia.

AGRADECIMIENTOS

A mi “Alma Terra Mater”, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, quien me formo como persona como persona y profesionalita.

A mis catedráticos, con quienes aprendí que de las mentes sencillas surgen grandes cosas, pero que con un poquito más de esfuerzo abres nuevos caminos.

A la Dra. Silvia E. Valdés Rodríguez, quien con su apoyo y paciencia me ayudo y oriento en el culmino de mi trabajo de investigación.

Al comité de asesores, que con su gran apoyo me permitió concluir con mi trabajo de tesis profesional.

Mis agradecimiento a CONCyTEG quien me proporciono la beca tesis, y por el apoyo en el proyecto.

A todos y a cada uno de mis amigos, de licenciatura, de trabajo (CINVESTAV), y de cada lugar en el cual he tenido que llegar, con los cuales compartí grandes momento y de lo que conservo una gran amistad.

En general, a todas las personas que contribuyeron de una o de otra manera en la culminación de este trabajo profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. El Amaranto	4
3.2. Mecanismo de defensa de las plantas.	5
3.2.1. Proteínas	6
3.2.1.1. Importancia de las proteínas en la naturaleza.	7
3.2.1.1.1. Enzimas.	7
3.2.1.1.2. proteasas	7
3.2.2. Inhibidores de proteasas (IPs).	8
3.2.2.1. Importancia de los IPs.	8
3.2.2.2. Clasificación de los IPs.	8
3.2.2.2.1. Inhibidores de cisteín proteinasa.	8
3.2.2.2.2. Funciones de las cistatinas.	9
3.2.2.2.3. Fitocistatinas.	9
3.2.2.2.3.1. Importancia de las fitocistatinas.	10
3.2.2.2.3.2. Mecanismos de acción.	11
3.2.2.2.3.3. Fitocistatinas como defensa de las plantas.	11
3.2.2.2.3.3.1. ¿Cómo atacan los patógenos a las plantas?	11
3.2.2.2.3.3.2. ¿Cómo se defienden los patógenos de las plantas?	13
3.2.2.2.3.4. Fitocistatinas y su efecto ante hongos fitopatógenos.	14

3.3. Proteínas recombinantes.	15
3.3.1. Importancia de una proteína recombinante.	15
3.3.2. Aplicaciones biotecnológicas.	15
3.4. Características generales de hongos fitopatógenos.	16
3.4.1. Genero <i>Phytophthora</i> .	16
3.4.2. Genero <i>Pythium</i> .	17
3.4.3. Genero <i>Glomerella</i> .	18
3.4.4. Genero <i>Alternaria</i> .	18
3.4.5. Genero <i>Fusarium</i> .	19
3.4.6. Genero <i>Sclerotium</i> .	19
3.4.7. Genero <i>Rhizoctonia</i> .	20
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. OBJETIVOS	22
6. HIPOTESIS	22
7. MATERIALES Y METODOS	23
7.1. Análisis de la actividad inhibitoria de la cistatina recombinante <i>AhCPI</i> .	24
7.1.1. Titulación del sitio activo de cisteín proteinasas con el inhibidor sintético E-64.	24
7.1.1.1. Titulación del sitio activo de papaína.	25
7.1.1.2. Titulación del sitio activo de ficína.	25
7.1.1.3. Titulación del sitio activo de bromelaína.	25
7.1.2. Actividad inhibitoria de la cistatina recombinante <i>AhCPI</i> purificada o de liado celular ante cisteín proteinasas	26
7.1.2.1. Determinación de actividad inhibitoria de la cistatina <i>AhCPI</i> purificada contra papaína.	26
7.1.2.2. Determinación de actividad inhibitoria de la cistatina <i>AhCPI</i> purificada contra ficína.	27
7.1.2.3. Determinación de actividad inhibitoria de la cistatina <i>AhCPI</i> purificada contra bromelaína.	27

7.2. Cuantificación de proteínas por el micro método de Bradford.	27
7.3. Efecto antifúngico de la cistatina recombinante <i>AhCPI</i> .	29
7.3.1. Inhibición de crecimiento de micelio en medio PDA.	29
7.3.2. Inhibición de germinación inoculo de hongos en medio PDB.	30
8. RESULTADOS	
8.1. Titulación de sitio activo de papaína, ficína y bromelaína con el inhibidor E-64.	31
8.2. Efecto inhibitorio de la cistatina recombinante <i>AhCPI</i> sobre papaína, ficína y bromelaína.	35
8.3. Efecto antifúngico de una cistatina recombinante <i>AhCPI</i> .	41
8.3.1. Ensayos - Inhibición en medio sólido PDA	41
8.3.2. Ensayos - Inhibición en medio líquidos PDB	41
8.3.2.1. Efecto de la cistatina recombinante <i>AhCPI</i> presente en lisado celular.	41
8.3.2.2. Efecto de la cistatina recombinante <i>AhCPI</i> purificada por cromatografía de afinidad.	46
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIÓN	60
LITERATURA CITADA	61
ANEXOS	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Relación de componentes en los ensayos de actividad inhibitoria en tubo...	24
Cuadro 2.- Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	28
Cuadro 3.- Distribución de tratamientos en placa ELISA.....	30
Cuadro 4.- Actividad proteolítica residual de papaína preincubada con diferentes concentraciones de E-64.	33
Cuadro 5.- Actividad proteolítica residual de ficína preincubada con diferentes concentraciones de E-64.	34
Cuadro 6.- Unidades de inhibición de papaína por la cistatina <i>AhCPI</i>	36
Cuadro 7.- Actividad proteolítica residual (%) y unidades de inhibición de papaína preincubada con <i>AhCPI</i>	37
Cuadro 8.- Inhibición de la actividad de ficína producida por la cistatina recombinante purificada.	38
Cuadro 9.- Actividad proteolítica residual de ficína preincubada con diferentes concentraciones de cistatina recombinante.	38
Cuadro 10.- Unidades de Inhibición de bromelaína por la cistatina recombinante <i>AhCPI</i>	40
Cuadro 11.- Valores de absorbancia de los cultivos de <i>F. oxysporum</i> crecido en presencia de diferentes concentraciones de lisado celular de <i>E.coli</i>	43
Cuadro 12.- Absorbancia de cultivos de <i>S. cepivorum</i> crecidos, en presencia de cistatina recombinante presente en el lisado celular de <i>E.coli</i>	44
Cuadro 13.- Lecturas de Absorbancia con respecto al crecimiento de <i>R. solani</i> ., utilizando cistatina recombinante <i>AhCPI</i> de lisado celular.	45
Cuadro 14.- Lecturas de Absorbancia de cultivos de <i>F. oxysporum</i> crecidos en presencia de cistatina recombinante <i>AhCPI</i> purificada.	48
Cuadro 15.- Porcentaje de crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada.	49
Cuadro 16.- Lecturas de Absorbancia de cultivos de <i>S. cepivorum</i> crecidos en presencia de cistatina recombinante <i>AhCPI</i> purificada.	52

Cuadro 17.- Lecturas de Absorbancia de cultivos de <i>R. solani</i> crecidos en presencia de cistatina recombinante <i>AhCPI</i> purificada.	54
Cuadro 18.- Porcentaje de crecimiento de <i>R. solani</i> en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada.	55
Cuadro 19.- Promedios de lecturas de actividad proteolítica residual de papaína.	66
Cuadro 20.- Promedios de lecturas de actividad (%) de papaína.....	66
Cuadro 21.- Promedios de lecturas de inhibición de papaína (%).	67
Cuadro 22.- Promedios de lecturas de actividad proteolítica residual de ficína.....	67
Cuadro 23.- Promedios de lecturas de actividad (%) de ficína.....	68
Cuadro 24.- Promedios de lecturas de inhibición (%) de ficína.....	68
Cuadro 25.- Promedios de lecturas de actividad proteolítica residual de bromelaína....	69
Cuadro 26.- Promedios de lecturas de actividad (%) de ficína.....	69
Cuadro 27.- Promedios de lecturas de inhibición (%) de ficína.....	70
Cuadro 28.- Lecturas de absorbancias de actividad proteolítica de papaína ante E-64.	70
Cuadro 29.- Unidades de Actividad de papaína ante E-64.....	71
Cuadro 30.- Lecturas de absorbancias de actividad proteolítica de ficína ante E-64.	71
Cuadro 31.- Unidades de Actividad de ficína ante E-64.	72
Cuadro 32.- Lecturas de Absorbancia a λ 592 nm y de crecimiento (%) de <i>F. oxysporum</i>	73
Cuadro 33.- Lecturas de Absorbancia a λ 592 nm y de crecimiento (%) de <i>S. cepivorum</i>	75
Cuadro 34.- Lecturas de Absorbancia a λ 592 nm y de crecimiento (%) de <i>R. solani</i>	77

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1.- Principales familias de cistatinas.....	8
Fig. 2.- Esquema y estructura tridimensional de la orizacistatina I de arroz (OC-I)....	9
Figura 3.- Hidrólisis del sustrato BAPA y la liberación de p-nitroanilina.....	24
Fig. 4.- Determinación de proteínas.....	27
Fig 5.- (a) inoculación del hongo, (b) Perforación de la placa para incorporar la cistatina e (c) Inhibición del hongo por la cistatina.....	29
Figura 6.- Actividad proteolítica residual de papaína en presencia de diferentes concentraciones de E-64.....	33
Figura 7.- Actividad proteolítica residual de Ficina en presencia de diferentes concentraciones de E-64.	34
Figura. 8.- Actividad proteolítica residual (%) de papaína preincubada con concentraciones crecientes de cistatina <i>AhCPI</i>	37
Figura 9.- Actividad proteolítica residual de ficina preincubada con diferentes concentraciones de <i>AhCPI</i>	39
Figura 10.- Actividad proteolítica residual de bromelaína preincubada con diferentes concentraciones de <i>AhCPI</i>	40
Fig. 11.- Perfil electroforético en gel de poliacrilamida-SDS de la cistatina recombinante purificada por cromatografía de afinidad.	43
Figura 12.- Cinética de crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en presencia de diferentes concentraciones de lisado celular de <i>E.coli</i>	44
Figura 13.- Cinética de crecimiento de <i>S. cepivorum</i> en presencia de diferentes concentraciones de lisado celular de <i>E.coli</i>	45
Figura 14.- Cinética de crecimiento de <i>R. solani</i> en presencia de diferentes concentraciones de lisado celular de <i>E.coli</i>	46
Figura 15.-Cinética de crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada por cromatografía de afinidad.....	49
Figura 16.- Efecto de la cistatina recombinante purificada sobre el crecimiento de <i>F. oxysporum</i>	50

Figura 17.- Microfotografías de la morfología micelial de <i>F. oxysporum</i> crecidos en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada.....	51
Figura 18.- Cinética de crecimiento de <i>S. cepivorum</i> en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada por cromatografía de afinidad.....	52
Figura 19.- Microfotografías de la morfología micelial y de los esclerocios de <i>S. cepivorum</i> crecido en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada...	53
Figura 20.- Cinética de crecimiento de <i>R. solani</i> en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada.	54
Figura 21.-Efecto de la cistatina recombinante purificada sobre el crecimiento de <i>R. solani</i>	58
Figura 22.- Microfotografías de la morfología micelial y de los esclerocios de <i>R. solani</i> crecido en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada.....	59

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

<i>AhCPI</i>	Inhibidor de Cisteín Proteinasa de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .
<i>E. coli</i>	Cepa <i>Escherichia coli</i>
IPs	Inhibidores de Proteasas.
<i>et al</i>	Y colaboradores
ml	Militros
mg	Miligramos
μ	Micra
μg	Microgramos
L	Litro
μl	Microlitros
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Micromolar.
N	Normalidad
°C	Grados Centígrados
min	Minuto
xg	Fuerza centrífuga relativa
rpm	Revoluciones por minuto.
nm	Nanómetros
kDa	Kilodaltons
pH	Potencial de hidrogeno
PM	Peso molecular
h	Hora
DO	Densidad óptica
λ	Longitud de onda
\bar{X}	Promedio
VIS	Visible.
UI	Unidades de Inhibición.

AI	Actividad Inhibitoria.
% A	% de Actividad.
% I	% de Inhibición.
Abs.	Absorbancia.
DE	Desviación Estándar.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
LB	Medio Lurina Bertani
PDA	Papa Dextrosa Agar.
PDB	Papa Dextrosa Caldo.
V8	Jugo de tomate V8.
cDNA	ADN complementario
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.
IPTG	Isopropil- β -D- tiogalactopiranosido
Cb	Antibiótico carbenicilina
Km	Antibiótico Kanamicina
DMSO	Dimetil sulfoxido
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético.
BAPA	N α -Benzoil-D-L-arginine 4-nitroanilida hidrociorudo).
DTT	DL-ditiotreitrol.
DTE	1,4-Ditioeritrol.
E-64	trans-EpoxysucciniL-L-Leucilamido-(4-guanidino)butane).

RESUMEN

En trabajos anteriores realizados en el laboratorio de Bioquímica y Biología molecular de proteínas, después detectar la presencia de cistatinas en amaranto, se procedió a aislar el cDNA de esta cistatina, y se clonó en el vector pQE-2 de expresión en *Escherichia coli*. Se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento de la bacteria que permitieran una mayor producción de cistatina recombinante. Posteriormente, se implementó la metodología para purificar esta cistatina por cromatografía de afinidad.

En el presente trabajo se determinó el efecto inhibitorio de la cistatina recombinante AhCPI purificada sobre la actividad proteolítica de cisteín proteinasas de origen vegetal, Se demostró que la cistatina recombinante inhibe la actividad proteolítica de papaína y ficína, pero que no ejerce ningún efecto sobre bromelaína. Con el fin de evaluar el potencial biotecnológico de la cistatina recombinante se realizaron bioensayos de inhibición de crecimiento en medio líquido PDB con *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum* y *Rhizoctonia solani*. En *F. oxysporum* la cistatina recombinante pura afectó el crecimiento de micelio y la germinación de esporas produciendo alteraciones morfológicas, como reducción en la longitud y ramificación de las hifas, además de la deformación de las conidias, confiriéndoles un aspecto globoide. En *R. solani* y *S. cepivorum* los efectos son similares, con concentraciones más bajas de cistatina, que las usadas en *F. oxysporum* mostraron un mayor efecto, principalmente en la germinación de los cuerpos fructífero (esclerocios), así como también el crecimiento micelial, y ramificaciones de las hifas; el efecto sobre la germinación fue analizado por el brote de hifas sobre los esclerocios.

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, las plantas y otros organismos viven en constante interacción, ambos están expuestos a diversos factores bióticos y abióticos en los cuales determinan su supervivencia. Esta diversidad de condiciones provoca daños físicos y bioquímicos dentro de cada organismo. En la actualidad el sector agrícola es uno de los sustentos de la humanidad, ya que su dieta alimenticia depende en un gran porcentaje de sus productos y subproductos; los cultivos agrícolas están expuestos a un gran número de organismos plaga, tales como: Hongos, procariotes, virus, nematodos, etc. Además de ácaros e insectos todos ellos causantes de daños físicos o fisiológicos que causan un gran número de enfermedades que conllevan a grandes pérdidas económicas en este sector.

Las plantas a través de su evolución han desarrollado un sinnúmero de formas de defenderse o por lo menos de poder evitar daños que repercutan en su descendencia. A esta característica se le conoce como “Mecanismos de defensa de las plantas”, las plantas han desarrollado estructuras físicas que protegen a los tejidos externos de hojas, tallos, flores y frutos; sustancias químicas de repelencia producidos dentro de la planta y procesos metabólicos que dan como resultado a la producción biomoléculas tales como proteínas inhibidoras, enzimas y otras más.

Con los mecanismos de defensa, las plantas reducen los daños causados principalmente por insectos y patógenos. En el caso del ataque de insectos la planta sintetiza una serie de compuestos químicos que los repelen o para la atracción de organismos benéficos que conllevan a su regulación o desencadenen mecanismos bioquímicos metabólicos. Para el caso de patógenos se desarrollan mecanismos bioquímicos o estructuras bioquímicas que se forman ante la infección.

Un mecanismo de defensa de las plantas ante patógenos, es la síntesis de proteínas inhibidoras de proteasas, estas proteínas son fabricadas por las plantas para contribuir en la defensa contra patógenos. Las cistatinas son un grupo de gran importancia, entre ellas las de origen vegetal las “Fitocistatinas” ya que de forma natural en las plantas es capaz de inhibir la actividad proteolítica de cisteín proteinasas de muchos varios fitopatógenos.

En la actualidad no se conoce específicamente en los mecanismos de acción sobre patógenos; existe poca investigación que argumente el efecto de la cistatina sobre los hongos fitopatógenos. En recientes investigaciones se ha observado alteraciones en la permeabilidad de las membranas de *Botrytis cinérea* y *Fusarium oxysporum* crecidos en presencia de cistatina de cebada (HvCPI-1) (Martínez *et al.*, 2003). Sin embargo, la cistatina de taro presenta un claro efecto tóxico sobre el crecimiento del micelio de *Sclerotium rolfii* siendo capaz de inhibir, a la vez, las cisteín-proteasas de extractos de dicho micelio (Yang *et al.*, 2005; Díaz *et al.*: www.biojournal.net/pdf/27.pdf).

Actualmente en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas de CINVESTAV Campus Guanajuato se estudian los alcances biotecnológicos de un inhibidor de cisteín proteinasa, denominado cistatina, el cual fue detectado en la semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L). En estudios preliminares se observó que extractos crudos de semilla de amaranto inhibían la actividad de enzimas digestivas de algunos insectos, la cual fue expresada en *Escherichia coli* para así ser producida en mayores cantidades para así poder determinar su actividad inhibitoria ante (insectos plaga, hongos fitopatógenos, etc.). Dentro de la línea de investigación del presente proyecto se realizaron pruebas para determinar el efecto de la cistatina recombinante de amaranto AhCPI (Inhibidor de Cisteín-Proteinasas de *A. hypochondriacus*), evaluando extractos crudos de la proteína expresada en *E. coli* de (lisado celular) y extractos purificados (proteína pura), sobre hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum*, *Glomerella cingulata*, *Pythium sp.* y *Phytophthora cinnamomi*. En el cual se determinó el efecto inhibitorio de la cistatina recombinante sobre dichos hongos fitopatógenos.

ANTECEDENTES

En trabajos anteriores es aislado el gen responsable de la síntesis del inhibidor cistatina *AhCPI* (Inhibidor de Cisteín Proteasas de (*Amaranthus hypochondriacus* L), el cual se clonó en un vector de expresión pQE2 el cual permite obtener una proteína recombinante en *Escherichia coli*. Posteriormente por medio de lisado celular bacteriano se purificó la cistatina *AhCPI* por cromatografía de alta afinidad en columna de Ni-NTA (Níquel-Acido-Nitrilo-Tricloro-Acético). De este modo se desarrolló la metodología para la producción de una cistatina recombinante para ser evaluada en diversos estudios de actividad inhibitoria. Finalmente, una vez obtenida la cistatina recombinante pura se hizo un estudio comparativo de la especificidad del inhibidor, frente a proteasas de insectos plaga observándose actividad inhibitoria de diferentes enzimas de insectos.

3. REVISIÓN DE LITERATURA.

3.1. El amaranto

Se cultiva en América desde hace 5000-7000 años, ocupó un lugar muy importante en la dieta de los aztecas; también lo cultivaban los mayas y para los incas era una planta sagrada (Becerra, 2002: www.canabio.gob.mx). A la llegada de los españoles a América al amaranto se le consideraba como un grano muy apreciado, un alimento ritual; se utilizaba en ceremonias religiosas, por esta razón fue prohibida su siembra y consumo (Barros y Buenrostro, 1997; Brenner *et al.*, 2000).

En la familia Amarantaceae se distinguen 3 especies, las cuales su semilla es comestible: *Amaranthus hypochondriacus* (norte y centro México) y *Amaranthus cruentus* (México y sudoeste de USA), *Amaranthus caudatus* nativa de Perú y otros países andinos (Mapes *et al.*, 1996; Iturbide *et al.*, 1992; Espitia *et al.*, 1994; Gorinstein *et al.*, 2002). Son plantas herbáceas anuales que llevan a cabo la fotosíntesis mediante la ruta especializada C4. Son unos de los pocos cultivos con metabolismo C4 que no son pastos. Debido a esta característica la planta de amaranto se adapta y tolera adversidades en su entorno (Kilge *et al.*, 1994; Schnetzler *et al.*, 1994; Mapes *et al.*, 1996).

El cultivo de amaranto en las últimas décadas se ha distribuido de manera exponencial, esto por sus rasgos biológicos y sus características nutricionales; se considera como una de las plantas más nutritivas del mundo por sus altos contenidos de proteínas, calcio, ácido fólico, hierro, vitamina C y minerales. Los contenidos proteicos del 16% son superiores al del trigo 12-14%, arroz 7-10% y maíz 9-10% (Paredes-López *et al.*, 1989; Abugoch *et al.*, 2003). Su semilla contiene un balance casi perfecto de aminoácidos para formar la proteína humana. La planta de amaranto presenta cualidades de resistencia a la sequía y capacidad de desarrollo en terrenos de temporal, soporta diferentes climas, al ataque de plagas. Las plantas han generado con la evolución una serie de sistemas de defensa contra el ataque de insectos y patógenos. Existe un elevado número de proteínas que han sido descritas como parte de los mecanismos de defensa de las plantas, las cuales solo actuarán sobre los depredadores que ataquen a la planta (Blanco-Labra *et al.*, 2002)

3.2. Mecanismo de defensa de las plantas.

Las plantas están expuestas al ataque de todo tipo de patógenos, sufren grandes daños los cuales pueden ser considerables o de poca importancia, sobreviven a los ataques y con frecuencia continúan su desarrollo normal y llegan a producir con buenos rendimientos (Agrios, 2002). Las plantas presentan diversos mecanismos de defensa ante el ataque de organismos plaga (Joshi *et al.*, 1998; Soares-Costa *et al.*, 2002). Los mecanismos de defensa son el resultado de los factores ambientales bióticos y abióticos, los cuales permiten enfrentar las condiciones adversas (Joshi *et al.*, 1998).

La interacción con organismos microbianos, herbívoros y otras especies de plantas pueden ser de carácter positivo, negativo o neutro. Cuando se presenta un carácter negativo, casi siempre asociado a la supervivencia ante el ataque de depredadores, parásitos o patógenos; comportan un marco de competencia interespecífica

Interacción entre plantas y microorganismos.

En 1905, Marshall Ward postuló que los “anticuerpos” y las toxinas producidas por las plantas desempeñaban una función importante para frenar el proceso infeccioso. Estos compuestos infecciosos podían encontrarse, preformados, antes de la infección o podían sintetizarse en respuesta a la misma y ser, por tanto, inducibles o subsiguientes a la interacción (Vivanco *et al.*, 2005).

En 1941, Müller y Börger refinaron la concepción de Ward. Bautizaron con el nombre de fitoalexinas a los compuestos químicos sintetizados por la planta en respuesta a una invasión microbiana (Vivanco *et al.*, 2005).

Las fitoalexinas tienen por misión servir de barrera inicial a la propagación de bacterias u hongos dentro de los tejidos de la planta. Pueden, pues, ejercer una presión selectiva sobre los patógenos potenciales; éstos, andando el tiempo, desarrollan, por mutación, mecanismos de resistencia, y perpetúan así el ciclo de cambio por mutación en patógenos y hospederos. La función primordial de muchos de tales metabolitos secundarios no es necesariamente antibacteriana o antifúngica. Algunos inhiben la germinación de esporas (Vivanco *et al.*, 2005).

Principios

Ante la invasión de tejidos vegetales por un microorganismo foráneo, la respuesta defensiva inducible más temprana es la muerte celular controlada. Esta “respuesta hipersensible” de las células vegetales ocurren aproximadamente en 24 horas después de que la planta percibe un patógeno potencial (Vivanco *et al.*, 2005).

Respuestas locales y sistémicas.

La respuesta de defensa se manifiesta en dos niveles. Ambos se inician, directa o indirectamente: El primer nivel de respuesta es local, implica la síntesis de fitoalexinas y pueden o no incorporar el elemento apoptótico de “respuesta hipersensible”. Los efectos posteriores son sistémicos, se manifiestan a distancias y vienen instados por la señalización secundaria producida por células que han activado genes defensivos (Vivanco *et al.*, 2005).

Las respuestas secundarias presentan a tejidos y órganos para defenderse de un proceso infectivo. Tales relaciones comprenden una elevación de los niveles de toxinas defensivas constitutivas, de receptores de patógenos y de reforzamiento estructural de paredes celulares en tejidos (Vivanco *et al.*, 2005).

3.2.1. Proteínas.

Las proteínas son moléculas de gran tamaño, pertenecen a la categoría de macromoléculas; compuestas de aminoácidos e unidos por enlaces peptídico. Es un constituyente de los seres vivos participando en todos los procesos biológicos, en el impulso de movimiento celular de energía y forman bastoncillos y cables macromoleculares que dan integridad estructural. Las proteínas llevan a cabo funciones físicas y catalíticas complejas, ya que ubican grupos químicos específicos en una disposición tridimensional precisa. Estas biomoléculas las podemos clasificar en órdenes de acuerdo a su estructura proteica: Estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

3.2.1.1. Importancia de las proteínas en la naturaleza.

3.2.1.1.1. Enzimas.

Las enzimas son polímeros biológicos que catalizan las reacciones químicas que hacen la vida posible como se conoce (Harper *et al*, 1988). Son esenciales para la desintegración de los nutrientes a fin de proporcionar la energía y unidades químicas de construcción.

Los nombres comunes para las enzimas provienen de sus características más distintivas: su aptitud para catalizar una reacción química específica. Por ejemplo las deshidrogenasas quitan átomos de hidrogeno, las proteasas hidrolizan proteínas y las isomerasas catalizan rearrreglos en la configuración. Hay algunos nombramientos complicados, pero de acuerdo a *International Union of Biochemists* (IUB) la cual enumera 6 clases de enzimas y las reacciones que catalizan.

3.2.1.1.2. Proteasas.

Las proteasa son enzimas proteolíticas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. Según su mecanismo de acción, las proteasas se dividen en dos categorías: proteólisis limitada la cual la proteasa rompe sólo un limitado número de enlaces peptídicos de una proteína blanco, produciendo la activación o maduración de una forma previa inactiva de la proteína y las no limitada son proteínas que son degradadas en sus componentes aminoácidos. Las proteínas al ser degradadas son generalmente fusionadas con múltiples moléculas del polipéptido ubiquitina. Esta transformación las marca para una rápida hidrólisis por el proteosoma en presencia de ATP. Otra ruta de degradación consiste en la compartimentalización de las proteasas, por ejemplo en lisosomas. Las proteínas transferidas a este compartimiento son rápidamente degradadas (Schaller 2004).

3.2.2. Inhibidores de proteasas (IPs).

Son proteínas que inhiben enzimas hidrolíticas y están presentes casi en todos los seres vivos. En plantas están generalmente acumuladas en tejidos de almacenamiento (Richardson, 1980) como semillas y tubérculos, también se ha encontrado en raíces y hojas de géneros de otras familias, también en secreciones como la goma arábiga y látex (Filho y Campos, 1989).

3.2.2.1. Importancia de los IPs.

Los inhibidores de proteasas fabricados por las plantas son pequeñas proteínas que contribuyen a la defensa contra insectos. Al bloquear la síntesis de proteasas intestinales, frenan el crecimiento y provocan la muerte por inanición. Los inhibidores de proteasas bloquean las proteasas de serina, cisteína y aspartato, así como a las metalocarboxipeptidasas. Estos inhibidores se encuentran principalmente en los granos y tejidos de reserva de las plantas; alcanzan concentraciones bastante altas (5-15% de la proteína total) menciona (Vivanco *et al.*, 2005).

En respuesta a las señales desencadenadas durante la producción de una herida, los inhibidores de proteasas no solo se sintetizan localmente, sino también a distancia. Las señales que inducen a esta síntesis incluyen algunos oligosacáridos, señales eléctricas, ácidos absíscicos y sistemina, un pequeño péptido de 18 aminoácidos (Vivanco *et al.*, 2005).

3.2.2.2. Clasificación de los IPs.

Los inhibidores de proteasas de plantas, se han clasificado en base al mecanismo de acción de las proteasas: serín, cisteín, aspártico y métalo (García-Olmedo *et al.*, 1987). La actividad inhibitoria se atribuye a su capacidad para formar complejos estables con proteasas; bloqueando, modificando o previniendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima (Laskowski y Qasim, 2000; Otlewski *et al.*, 2005).

3.2.2.2.1. Inhibidores de cisteín proteinasa.

El término cistatina es el nombre que se utilizó por primera vez en una proteína obtenida de huevos de gallina (Barrett, 1987). Las proteínas inhibidoras de cisteín proteinasa son conocidas como cistatinas, refiriendo así a proteínas que inhiben específicamente la actividad de la papaína y las cisteín proteasas relacionadas (Catepsina B, H y L, Ficína y Bromelaína). Se encuentran presentes en microorganismos, animales y plantas.

Las cistatinas agrupan un gran número de proteínas, por ello se dividen en cuatro familias: estéfinas, cistatinas y kininógenos, todas de origen vegetal. Y un cuarto grupo que incluye solo a las fitocistatinas (Brown y Dziegielewska, 1987; Hiroto et al., 1991; Kondo et al., 1990), véase (Fig1).

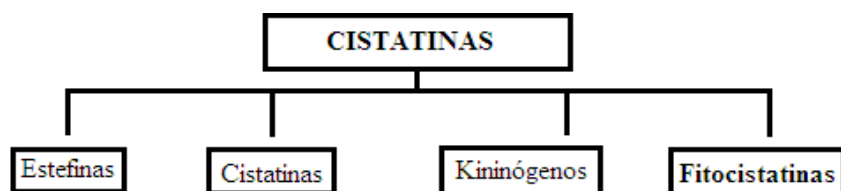


Fig. 1.- Clasificación de las cistatinas (Barrett *et al.*, 1986; Barrett, 1987).

3.2.2.2.2. Funciones de las cistatinas.

Entre las funciones atribuidas a las fitocistatinas se encuentran las siguientes:

- ✓ La regulación de la actividad de proteasas endógenas, durante la maduración y germinación de las semillas (Oliveir *et al.*, 2003); dar y en condiciones de estrés biótico y abiótico; e hipersensibilidad (Mosolov y Valueva, 2005).
- ✓ Involucrada en la defensa de la planta contra el ataque de plagas (Oliveira *et al.*, 2003) y microorganismos fitopatógenos (Mosolov y Valueva, 2005).

3.2.2.2.3. Fitocistatinas.

Las cistatinas de plantas (fitocistatinas) constituyen una familia formada por más de 80 miembros descritos tanto en mono- como en di- cotiledóneas. Se caracterizan por presentar, además de la secuencia conservada LARFAV exclusiva de vegetales, tres motivos comunes a todas las cistatinas implicados en la interacción enzima-inhibidor: i) el sitio reactivo QxVxG; ii) una o dos glicinas en el extremo amino terminal de la proteína y iii) un triptófano en la segunda parte de la molécula (Fig. 2) (Díaz *et al.*: www.biojournal.net/pdf/27.pdf).

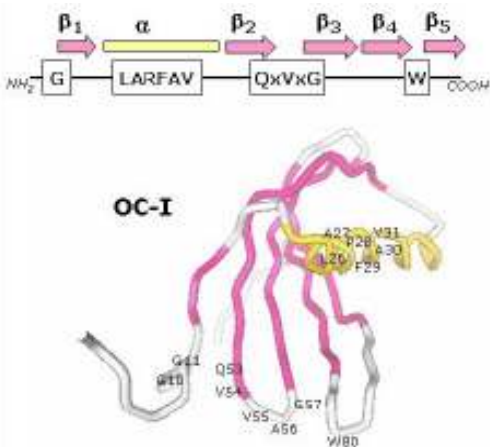


Fig. 2.- Esquema y estructura tridimensional de la orizacistatina I de arroz (OC-I) indicando la secuencia de aminoácidos LARFAV y los motivos indicados en la interacción enzima-inhibidor, basada en datos estructurales de Negata *et al.* (2000).citado por Díaz *et al.*: www.biojournal.net/pdf/27.pdf.

Las fitocistatinas, son inhibidores no competitivos que inhiben de forma específica peptidasas de la familia de la papaína. Presentan puntos isoelectricos neutros o ácidos, carecen de puentes de disulfuro, no sufren procesos post-traduccionales de glicosilacion y son estables a variaciones de temperatura y pH. (Díaz *et al.*: www.biojournal.net/pdf/27.pdf).

3.2.2.2.3.1. Importancia de las fitocistatinas.

Se ha demostrado que las fitocistatinas son capaces de inhibir la actividad de proteasas endógenas relacionadas con otros procesos fisiológicos, lo que apoya su papel como regulador de la proteólisis. Este es el caso de la cistatina de papaya que inhibe *in vitro* caricaína, una cisteín-proteasa endógena (*Díaz *et al.*: www.biojournal.net/pdf/27.pdf).

3.2.2.2.3.2. Mecanismos de acción.

Existen varias referencias bibliográficas que describen la implicación de cisteín-proteinasas y sus inhibidores las cistatinas en procesos relacionados con la muerte celular programada (MCP) en plantas (Solomon *et al.*, 1999). Comprobaron que la expresión ectópica de una cistatina de soya inhibe la actividad de cisteín-proteasa endógena y bloquea la respuesta de MCP inducida por una infección de una cepa de *Pseudomonas* o por estrés oxidativo. Igualmente, la sobre-expresión de la fitocistatinas AtCYS1 de arábido, bloquea la MPC activada por la herida, patógeno a virulentos y óxido nítrico. Recientemente se ha demostrado que la cistatina de *Celosia cristata* es capaz de conferir resistencia frente a virus del mosaico del tabaco (VMT) en plantas de *Nicotiana glutinosa*, al bloquear las cisteín-proteasas que se activan durante el proceso de MCP en respuesta a la infección vírica (Díaz *et al.*, www.biojournal.net/pdf/27.pdf).

3.2.2.2.3.3. Fitocistatinas como defensa de las plantas.

Las fitocistatinas están mucho más estudiadas y avaladas por su: (Díaz *et al.*: www.biojournal.net/pdf/27.pdf).

- ✓ Su capacidad de inhibir *in vitro* cisteín-proteinasas de insectos, ácaros, nematodos y virus.
- ✓ Su capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de hongos.
- ✓ Su inducción en distintos tejidos de la planta en respuesta a herida, ácido jasmónico e infección por patógenos.

3.2.2.2.3.3.1. ¿Cómo atacan los patógenos a las plantas?

Los patógenos atacan a las plantas por la necesidad de adquirir las sustancias producidas por su hospedero, a diferencia de un insecto los patógenos necesitan penetrar en los tejidos de la planta para poder obtener los nutrientes que necesita, primeramente tiene que penetrar las barreras externas formadas por cutícula, además debe de travesar las paredes celulares externas (Agrios, 1988).

Para que un patógeno infecte a la planta, este debe de ser capaz de abrirse paso al interior de esta, obtener sus nutrientes y neutralizar sus reacciones de defensa. Los patógenos logran infectar a las plantas principalmente a través de la secreción de compuestos químicos que afectan a ciertos componentes o mecanismos metabólicos de sus hospedantes. La penetración y la infección del patógeno sobre su hospedero se logran parcial o totalmente mediante una fuerza mecánica que ejerce algunos de ellos sobre las paredes celulares de las plantas (Agrios, 1988).

Muchos contenidos de las células vegetales no siempre se encuentran en una forma disponible para el patógeno, estos deben ser transformados en unidades más simples que el patógeno pueda absorber y asimilar. La planta al ser invadidas por un patógeno reaccionan produciendo estructuras y sustancias químicas que interfieran con el avance o existencia del mismo, de este modo para que el patógeno pueda vivir a costa de la planta este debe de tener la capacidad de vencer tales obstáculos (Agrios, 1988).

Armas químicas de los patógenos

Los efectos ocasionados sobre las plantas por lo general son resultado de las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo entre las sustancias que secreta el patógeno y las que contienen o produce la planta (Agrios, 1988).

Los principales grupos de sustancias químicas que secretan los patógenos en las plantas parecen participar en la aparición de la enfermedad, ya sea directa o indirectamente, en los cuales incluyen: las enzimas, toxinas, reguladores de crecimiento y polisacáridos. Así podemos distinguir algunas enfermedades, como las pudriciones blandas las enzimas probablemente son las más importantes, la agalla de la corona para el caso de los reguladores de crecimiento, el tizón que ocasiona *Helminthosporium sp* se debe al fundamentalmente a la toxina que secreta el patógeno sobre la planta. La mayoría de los fitopatógenos secretan enzimas durante toda su existencia o al entrar en contacto con un sustrato (Agrios, 1988).

3.2.2.2.3.3.2. ¿Cómo se defienden las plantas de los patógenos?

A través del tiempo se ha observado que las plantas están expuestas al ataque de todo tipo de patógenos, probablemente por cientos o miles de individuos de una misma clase de patógenos. Sin embargo aun cuando estas plantas sufren grandes daños los cuales pueden ser considerables o de poca importancia, sobreviven a los ataques y con frecuencia continúan su desarrollo normal y legan a producir buenos rendimientos

Por lo general para contrarrestar el ataque del patógeno hacia la planta, las plantas poseen características estructurales las cuales actúan como barreras físicas que impiden el arribo, penetración o la propagación del patógeno. En el caso de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en células y tejidos, estas producen sustancias químicas tóxicas para el patógeno o crean condiciones que inhiben su desarrollo. Estas características en combinación son ampliamente utilizadas por las plantas para defenderse de los patógenos, aunque estas difieren con el hospedante, incluso varían con la edad de la planta, tipo de órgano y tejido atacado, nutrición de la misma o así como las condiciones climatológicas (Agrios, 1988).

Defensas estructurales

Encontramos las **estructuras de defensa preexistente**, primera línea de defensa la cual se encuentra en la superficie, esta debe de ser penetrada para que el patógeno pueda causar la infección e incluso antes de que se ponga en contacto con la planta (cantidad y calidad de la cera y de la cutícula que cubre las células de la epidermis, estructuras de las paredes celulares, tamaño y localización de estomas y lenticelas). **Las estructura de defensa que se forman en respuesta a la infección**, cuando un patógeno logra penetrar y causar una infección en los tejidos de las plantas estas muestran varios grados de resistencia, tales como: estructuras histológicas de defensa (formación de capas de corcho, capaz de abscisión, formación de tílides y depósito de sustancias gomosas), estructuras celulares de defensa (cambios morfológicos en la pared celular al ser invadida por el patógeno), reacciones de defensa citoplásmica (en hongos, el citoplasma de las células envuelve al grupo de hifas y el núcleo se extiende hasta el punto en que se divide en dos partes) y reacciones de defensa necrótica (necrosis y muerte celular) cita (Agrios, 1988).

Defensas metabólicas.

Las características estructurales proporcionan un cierto grado de defensa a la planta, pero para un contraataque estas presentan **defensas bioquímicas preexistentes:** Inhibidores liberados por las plantas en su medio ambiente, defensa debida a la falta de factores esenciales (falta de reconocimiento entre el hospedante y el patógeno, falta de receptores sensibles del hospedante para las toxinas del patógeno y falta de nutrientes esenciales para el patógeno), inhibidores presentes en las células vegetales antes de la infección (Compuestos fenólicos y taninos). **Defensas metabólicas inducidas por el ataque del patógeno:** Inhibidores bioquímicos que producen las plantas en respuesta a los daños ocasionados por el patógeno, defensa por medio de la reacción de hipersensibilidad, defensa debida a una mayor concentración de compuestos fenólicos; defensa debido a la formación de sustratos resistentes a las enzimas de los patógenos, a la inactivación del patógeno, a la liberación de cianuro fungitóxico a partir de complejos no tóxicos, a la detoxificación de las toxinas del patógeno, a la resistencia inducida (Agrios, 1988).

3.2.2.2.3.4. Fitocistatinas y su efecto ante hongos fitopatógenos.

En 1999 se describió por primera vez la actividad antifúngica de una cistatina de castaño como inhibidor del crecimiento de los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum graminicola* y *Septoria nodorum* y el saprofito *Trichoderma viride*, cuyos mRNAs se acumula en hojas inoculadas con esporas de *B. cinerea*. Posteriormente, se demostró que las propiedades fúngicas de la fitocistatinas de caña de azúcar, cebada, fresa y taro (Díaz *et al.*: www.biojournal.net/pdf/27.pdf).

Sin embargo, aun se desconoce el mecanismo de acción de esta actividad. Se ha comprobado mediante mutagénesis dirigida de la cistatinas HvCPI-1 de cebada que los dominios de la proteína implicados en la inhibición enzimática no son los responsables de su actividad antifúngica. Además, la cistatinas HvCP-1 impide el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*, pero no se ha podido detectado la presencia de cisteín-proteínasa de extractos proteicos del micelio ni del medio cultivo del hongo (Martínez *et al.*, 2003).

Recientemente, se ha observado alteraciones en la permeabilidad de las membranas de *B. cinérea* y *Fusarium oxysporum* crecidos en presencia de FaCPI-1 (Martínez *et al.*, 2005). Sin embargo, la cistatina de taro que presenta un claro efecto tóxico sobre el crecimiento del micelio del hongo fitopatógenos *Sclerotium rolfsii* es capaz de inhibir, a la vez, las cisteín-proteinasas de extractos de dicho micelio (Yang *et al.* 2005)

3.3. Proteínas recombinantes.

3.3.1. Importancia de la proteína recombinante.

Uno de los mayores problemas de la agricultura moderna son los daños causados por especies fitopatógenos que producen pérdidas anuales de las cosechas estimadas en un 18% en el caso de los insectos fitófagos y casi un 20% debido a las enfermedades bacterianas y fúngicas.

La necesidad de desarrollar métodos de control alternativos ecológicamente aceptables es cada vez más apremiante y una de las estrategias de lucha ha insistido en el aislamiento, transferencia y expresión de genes con capacidad insecticida y/o fungicidas de origen natural, en especies vegetales de interés agronómico. La tecnología de ADN recombinante y la transgénesis vegetal han permitido que esta estrategia sea posible (Díaz., *et a:* www.biojournal.net/pdf/27.pdf/).

3.3.1. Aplicaciones Biotecnológicas.

En muchos estudios refuerzan el papel de las fitocistatinas como proteínas en la defensa vegetal, y confirman su potencial biotecnológico para la obtención para la obtención de las plantas resistentes a organismos fitopatógenos.

Las fitocistatinas más utilizadas como transgén ha sido la orizacistatina I de arroz, OC-I. Aparte de esta, de las más de 80 fitocistatinas identificadas, solo las cistatinas OC-II de arroz, CC-I de maíz, AtCYS de arábidoopsis, SC de girasol y HvCPI de cebada se ha expresado transgénicamente en plantas tal como lo menciona Álvarez (2006), Irie (1996), Delledonne (2001), Samac (2003) y Urwin (2003) citados por Díaz (www.biojournal.net/pdf/27.pdf/).

Gutiérrez-Campos *et al.*, (2001), menciona que la expresión de genes que codifican para cistatinas en plantas transgénicas pueden ser una estrategia para generar plantas con características agronómico deseables, pues se ha observado que en plantas de tabaco modificadas con el gen *oc-I* (Orizacistatina I) se desarrollan un mayor número de flores y frutos, un crecimiento más rápido y una ganancia en el tamaño de la lamina foliar.

3.4. Características generales de hongos fitopatógenos.

Dentro del presente proyecto se evalúa los efectos de una cistatina recombinante sobre hongos fitopatógenos de importancia agrícola, de los cuales se consideran los siguientes géneros y especies de hongos descritos a continuación.

Los hongos son organismos microscópicos que producen esporas, son eucarióticos, ramificados y a menudos filamentosos, carecen de clorofila y tiene paredes celulares que contienen quitina y celulosa o ambos componentes. La mayoría de los 100, 000 especies son estrictamente saprófitas y viven sobre material orgánica muerta, mas de las 8, 000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas. Algunos hongos crecen y se reproducen solo cuando establecen una cierta asociación con las plantas que les sirven de hospedante (Agrios, 1988).

3.4.1. Genero *Phytophthora*.

P. cinnamomi., descrita primeramente por Rands en 1922, quien lo aisló de canchales de *Cinnamomum burmani* en Sumatra. Presenta un **micelio** cenocítico, muy toruloso, con vesículas globosas a piriformes de diferentes tamaños, hifas con diámetro (de 3.5-21.0 μ), colonia micelial con aspecto de camelia, debido a su crecimiento deprimido y algodonoso; **esporangióforos** simples o ramificados en simpodio, a veces por proliferación esporangial, cortos o largo; **esporangios** no se producen en medios sólidos, pero en extracto de suelo se forman en abundancia, ovoides y oval-alargados, sin papila, de 23-63 / 15-38 μ ; **clamidiosporas** numerosas, esféricas, ovoides, piriformes, frecuentemente en racimos; **oogonios** esféricos, terminales, de 40 μ de diámetro (máximo 58 μ), amarillo palido al envejecer; **anteridios** subclaviformes, largos de 21 a 23 por 17 μ ; las oosporas casi llenan al oogonio (Romero, 1993).

3.3.2. Genero *Pythium*.

El género *Pythium* fue descrito por Pringsheim en 1858, con *P. monospermum* como tipo. Este género se caracteriza por: Presentar micelio cenocítico con hifas cuyo diámetro varía de 1-8 μ , generalmente, 2-5 μ , con abundante protoplasma y numerosas ramificaciones; las septas se forman únicamente para delimitar porciones de hifas dañadas, o en los sitios donde nacen las ramas hifales fértiles (Romero, 1993).

El patógeno *Pythium*, es el causante más importante del ahogamiento de plántulas durante la fase de preemergencias y poseemergencias. Forma un micelio blanco, filamentoso, profusamente ramificado y de rápido crecimiento. El **micelio** produce esporangios terminales o que pueden ser en forma esférica, filamentosa, etc. Los **esporangios**, germinan directamente o producen de uno a varios tubos germinales, o bien forman una hifa corta en el extremo de la cual se forma una vesícula. El protoplasma se difunde desde el esporangio hacia la vesícula y ahí forma más de cien zoosporas. Cuando las zoosporas son liberadas, nadan en el agua durante unos cuantos minutos, entran en reposo, se enquistan al envolverse en una cubierta protectora y germinan al producir un tubo germinal. Por lo general el tubo germinativo penetra en los tejidos del hospedante y produce una nueva infección, pero en ocasiones produce otra vesícula en la que se forman varias zoosporas secundarias, evento que se puede repetir varias veces. La germinación de los esporangios y las oosporas están determinadas por la temperatura del medio; las temperaturas por arriba de 18 °C favorecen la germinación de los tubos germinales, mientras que las temperaturas entre 10 y 18 °C inducen a la germinación por medio de zoosporas (Agrios, 1988).

3.3.3. Genero *Glomerella*.

Genero más típico de la familia Diaporthaceae. Alexopolus en 1962, lo clasifica en el orden Diporthales, pero en 1979, al igual que Müller y Von Arx (1973) lo reclasificó, colocó en la familia Polystigmataceae. Actualmente el género *Glomerella* está retenido en el orden Diaporthales. En todo caso las características más sobresalientes son: peritecios, producidos homotálica o heterotálicamente, globosos, pilosos y picudos (con ostiolo largo); ascas claviformes, cortas, pedicelo deliçuenses; ascosporas hialinas, unicelulares alantoides. Fase conidial *Gloesporium* (acérvulo sin setas), o *Colletotrichum* (acérvulos con setas, según la especie). Lilly y Barnett (1951), mencionan a *Glomerella cingulata* la cual requiere sustancias nitrogenadas como la sucrosa y fuentes de Ca más favorables (Romero, 1993).

3.3.4. Genero *Alternaria*.

El género *Alternaria* fue descrito por Nees en 1817 con *A. tenuis* como tipo. En 1933 Wiltshire redefinió al género y señaló las siguientes características: Esporas de color oscuro, con pico, obclaviformes, aunque pueden ser notablemente polimórficas, en cadena (\pm), con pico (\pm), ramificados, según la especie; los conidios pueden ser simples o ramificados, individuales o agrupados (Romero, 1993).

Alternaria sp tiene un micelio de color oscuro, en tejidos infectados forma conidióforos cortos, simples y erectos que dan origen a cadenas simples o ramificadas de conidios. Los conidios son grandes, alargados y oscuros, o bien multicelulares y en forma de pera y presentan septas tanto transversales como longitudinales. Los conidios se desprenden con facilidad y son diseminados por las corrientes de aire (Agrios, 1988).

3.3.5. Genero *Fusarium*.

El género *Fusarium* fue descrito por Link en 1915, quien considero las siguientes características: Conidióforos alargados en forma de botella, con ramas a intervalos regulares o verticiladas, septados, individuales o agrupados en esporoquios; conidios de dos tipos: 1) microconidios elípticos o piriformes, unicelulares o bicelulares, no curvados, en cabezuelas o en cadenas, 2) macroconidios falcados, en forma de media luna o elípticos, dos a nueve septas, ápice puntiagudo, roma o en forma de gotero, base puntiaguda, roma o en forma de pie; clamidosporas si se producen, globosas, ovals o piriformes, individuales o en grupos, intercalares o terminales, uni o bicelulares, lisas o rugosas y generalmente de color café (Agrios, 1988).

Fusarium oxysporum (Sheld). Snyder y Hansen. Es la especie de género más ampliamente distribuida y perjudicial a la agricultura. Presenta macroconidios finos, alargados puntiagudos pared delgada, anchura máxima de 3.0-4.5 μ . Masa de esporas acre rosa, pigmento rosa, purpura o violeta (Romero, 1993).

3.3.6. Genero *Sclerotium*.

El género *Sclerotium* presenta ausencia de cuerpo fructífero y esporas; esclerocios cafés a negros, globosos o irregulares, compactos; micelio generalmente de color claro (Romero, 1993).

El hongo *Sclerotium* sp., produce un micelio abundante de color blanco, vellosos y ramificado que forma numerosos esclerocios pero comúnmente es estéril, es decir, no produce esporas. El hongo ataca directamente a los tejidos, produce una masa abundante de micelio, mata y desintegra a dichos tejidos al secretar ácido oxálico, así como también enzimas pectinolíticas, celulóticas y otras enzimas antes de penetrar al hospedante. Una vez que se ha establecido el hongo en las plantas, el hongo avanza y forma micelio y esclerocios con rapidez, especialmente cuando hay suficiente humedad y la temperatura es alta (entre 30 y 35°C).

Sclerotium cepivorum produce la pudrición blanca de la cebolla y ajo, además de esclerocios, en ocasiones produce también conidios en esporodoquios; sin embargo, todo parece indicar que esos conidios son estériles (Agrios, 1988). Esta especie fue descrita en Inglaterra por Berkeley (1984) es actualmente conocida en Europa, Australia, África, Argentina, Brasil, varios estados de la Unión Americana y México. La enfermedad es más severa en suelos fríos y ligeramente húmedos, pero la humedad es menos importante que la temperatura. En medios de cultivo *S. cepivorum* crece bien a temperaturas de 4 a 29 °C, aunque para infectar requiere de 10 a 24°C, óptimas de 15 a 18°C (Romero, 1993).

3.3.7. Género *Rhizoctonia*.

El género *Rhizoctonia sp*, pertenece al grupo de aquellos que no producen esporas, su capacidad saprófita de su micelio y esclerocios (estructuras asexuales de resistencia). Sin embargo como muchos hongos imperfectos, en condiciones apropiadas de humedad y nutrimentos, algunas especies pueden reproducirse asexualmente. Como es el caso de *R. solani* en papa, cuando la temperatura es fresca y el tiempo lluviosos, produce basidios y basidiosporas.

Presenta características de fructificación asexual y esporas sexuales ausentes; esclerocios café o negros, de formas variables, frecuentemente pequeños y no muy compactos, formados por filamentos miceliales y conectados a ellos; hifas del micelio café, con células grandes y ramas saliendo aproximadamente en ángulo recto (Romero, 1993).

4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la producción agrícola depende del uso de plaguicidas y otras sustancias tóxicas, lo cual a través del tiempo ha ocasionado grandes daños al ecosistema. Debido a lo anterior, existe la necesidad de producir más, y con altos estándares de inocuidad alimentaria. Las nuevas alternativas requeridas nos llevan a una agricultura en donde se haga uso de variedades resistentes, plantas mejoradas genéticamente, insumos agrícolas de origen orgánico; así como bioplaguicidas, y enemigos naturales para obtener productos agrícolas libres de residuos o sustancias tóxicas.

En este sentido se ha planteado el uso de inhibidores de proteinasas como una herramienta valiosa en el control de plagas. El efecto inhibitorio que produce una cistatina sobre enzimas del tipo de cisteín proteinasa, puede dar como resultado una inhibición en el crecimiento de hongos. Esta es una característica muy selectiva para un cierto tipo de enzimas en las especies de hongos fitopatógenos.

Durante el desarrollo de este proyecto se pretende evaluar el efecto antifúngico que presenta una cistatina recombinante *AhCPI* de amaranto expresada y producida en *Escherichia coli*. Para esto, primeramente se evaluará la capacidad de la cistatina recombinante de inhibir enzimas proteolíticas del grupo de las cisteín proteinasas y posteriormente redefinirá su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de diferentes especies de hongos fitopatógenos, responsables de pérdidas importantes en productos agrícolas en el campo.

Comprobar el efecto inhibitorio que ejerce la cistatina recombinante frente a diferentes géneros de dichos patógenos plantea la posibilidad de utilizar a futuro esta información en los programas de mejoramiento genético, ya sea para la selección de variedades con mejores características genéticas que propicien una resistencia al ataque de tales patógenos; o bien hacia el desarrollo de plantas transgénicas que expresen la cistatina como un mecanismo de defensa contra fitopatógenos.

De este modo entraremos dentro de la visión de la nueva agricultura que busca producir más y mejores productos a bajo costo, sin causar daño al ecosistema, reduciendo el riesgo de crear resistencia en plagas y sobre todo obtener productos agrícolas libres de sustancias tóxicas que afecten a los consumidores.

5. OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar el efecto de la cistatina recombinante *AhCPI* sobre el crecimiento de diferentes géneros de hongos fitopatógenos.

Objetivos específicos.

- ✓ Determinar la actividad inhibitoria de una cistatina recombinante sobre cisteín proteinasas de origen vegetal.
- ✓ Titulación de sitio activo de cisteín proteinasas en base al inhibidor E-64.
- ✓ Optimización de las condiciones para los bioensayos de inhibición de crecimiento de hongos fitopatógenos.
- ✓ Evaluación de diferentes concentraciones de cistatina sobre el crecimiento y desarrollo de hongos.

6. HIPÓTESIS

Se especula que la cistatina recombinante *AhCPI* expresada en *Escherichia coli*, y purificada por Cromatografía de afinidad, presenta un efecto inhibitorio sobre la actividad proteolítica de cisteín proteinasas de origen vegetal y es capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de cepas de hongos fitopatógenos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- **Sales de amortiguadores y reactivos** (Fosfatos de sodio, acetato de sodio, cloroacetato de sodio), EDTA (Ácido etilendiamino tetracético), DTT (DL-ditiotreitol), DTE (1,4-Ditioeritrol) de uso común los cuales fueron de grado analítico provistos Por J.T.Baker:
- **Medios de cultivo:** Papa dextrosa agar (PDA-DIFCO), Papa destroza caldo (PDB-DIFCO) y Agar - jugo de tomate V8 (Campbell's).
- **Enzimas:** (Sigma-Aldrich): Papaína 3.4.22.2 (23.406 kDa) de látex de papaya, ficina 3.4.22.3 (23.8 kDa) de látex de higuera y bromelaína 3.4.22.32 (33 kDa) de tallo de piña.
- **Sustratos:** N α -Benzoil-D-L-arginine 4-nitroanilida hidrocloreto (BAPA). Sigma-Aldrich.
- **Inhibidor:** cistatina E-64 (457.4 Da) Sigma-Aldrich. La cistatina recombinante *AhCPI* presente en lisado celular de *E.coli* y purificada por cromatografía de afinidad fueron provista por el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de proteína. .
- **Cepas de hongo:** *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum*, *Rhizoctonia solani* A-G-3, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium sp*, *Alternaria alternata*, *Glomerella cingulata*. Provistas por el Dr. Víctor Olalde Portugal del laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV, Campus Guanajuato.

7.1. Análisis de la actividad inhibitoria de la cistatina recombinante *AhCPI*.

7.1.1. Titulación del sitio activo de cisteín proteinasas con el inhibidor sintético E-64.

Titulación de sitio activo.

La actividad proteolítica residual de papaína, ficína y bromelaína, fue medida después de preincubarlas con el inhibidor de cisteín proteinasas E-64 durante 15 min a 40° C el cual se une al sitio activo de las cisteín proteasas activas en la reacción. Para evaluar la actividad de las enzimas se utilizó el sustrato cromogénico N α -Benzoil-D-L-arginine 4-nitroanilida hidrocioruro (BAPA), el cual libera p-nitroanilina al ser hidrolizado por la proteasa (Fig. 3), esto es cuantificado por medio de un espectrofotómetro (Beckman DU 640) utilizando una longitud de onda de 410 nm, de acuerdo a lo descrito por (Barrett *et al*, 1982).

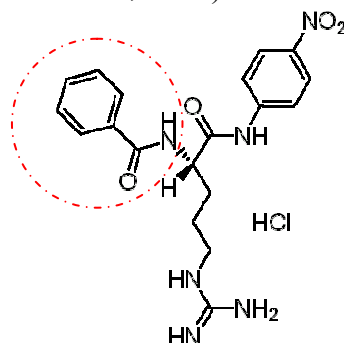


Figura 3.- Hidrólisis del sustrato BAPA y la liberación de p-nitroanilina.

Cuadro 1.- Relación de componentes en los ensayos de actividad inhibitoria en tubo.

Volumen μ l.	B	C 1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Buffer de activación	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Agua desionizada estéril	625	625	615	605	595	585	575	565	555	545	535
E-64	0	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Enzima	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Sustrato BAPA	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Solución para detener reacción.	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

B= Blanco para calibrar, C= Concentración que corresponde a cada tubo dentro del ensayo.

7.1.1.1. Titulación del sitio activo de papaína.

Pre incubar en baño maría a 40°C, de 0-100 µl de E-64 (20 µM) con intervalos de 10 µl y con 100 µl de papaína (20 µM) en 250 µl de buffer de activación (0.1 M de Fosfatos, 4 mM de EDTA y 8 mM de DTT) pH 6.8; ajustando el volumen a 975 µl con agua. Incuba por 15 con la adición de 25 µl de BAPA (100 mM); Detener la reacción con la adición de 1 ml de solución (0.1 M de cloroacetato de sodio/0.2 M de acetato de sodio, pH 4.3); Leer la actividad proteolítica residual en un espectrofotómetro mediante lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 410 nm

7.1.1.2. Titulación del sitio activo de ficína.

Metodología similar al de papaína, excepto que en el buffer de activación el agente reductor DTT es sustituido por DTE a misma concentración. Esto a un pH 7 y una temperatura de incubación de 37 °C; y una concentración de 4.75-5 mg/ml de ficína.

7.1.1.3. Titulación del sitio activo de bromelaína.

Metodología similar al de ficína, excepto que el pH de 6.5, una concentración de enzima 30 mg/ml y 50 µM de E-64, (La inhibición es muy baja, pero la actividad proteolítica aun es cuantificable); Por ello se dice que E-64 inhibe a bromelaína pero baja actividad.

La titulación del sitio activo se determina por medio de las unidades de actividad proteolítica de la enzima en el sustrato, así una unidad de actividad define como la disminución de la densidad óptica de 0.01 con respecto a la actividad proteolítica del control.

7.1.2. Actividad inhibitoria de la cistatina *AhCPI* purificada o de lisado celular ante cisteín proteinasas.

Actividad inhibitoria.

Se determinó la actividad inhibitoria de *AhCPI* presente en lisados celulares de *E. coli*; así como de la cistatina recombinante purificada por Cromatografía de afinidad, sobre cisteín proteinasas de origen vegetal. Para esto se determinó la actividad proteolítica residual de papaína, ficína y bromelaína, después de preincubarlas con el lisado celular o cistatina purificada durante 15 min a 37° C . Para evaluar la actividad proteolítica se utilizó el sustrato cromogénico N α -Benzoil-D-L-arginine 4-nitroanilida hidrocloreto (BAPA), de acuerdo al método descrito por (Yoza *et al.*, 2002).

Una unidad de inhibición se definió como la cantidad de inhibidor/ml que produjo una disminución del 0.01 en la densidad óptica con respecto a la actividad proteolítica del control, esto expresado en la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de Inhibición} = \frac{\text{DO de control} - \text{DO de muestra con inhibidor}}{(0.01)(\text{ml usados de inhibidor})}$$

7.1.3. Determinación de actividad inhibitoria de la cistatina *AhCPI* purificada contra papaína.

Pre incubar por 15 minutos a 37 °C, cistatina (0 - ... μ g) junto con solución de papaína (0.1 mg/ml agua) en 1.4 ml de buffer de activación (0.05 M de fosfatos de sodio 0.01 M de EDTA, 0.0025 M DTT) pH 6.8 ajustando a un volumen pree final de 1.8 ml. Incubar con 200 μ l de BAPA (0.01 M/ ml DMSO) por 15 minutos. Detener la reacción adicionando 500 μ l de ácido acético al 30%; medir la actividad proteolítica residual en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.

7.1.4. Determinación de actividad inhibitoria de la cistatina *AhCPI* purificada contra ficína.

Metodología similar al de papaína, excepto a que se preincuba en un buffer de activación (se cambia DTT por DTE (0.003 M) pH 6.5, y la concentración de 1.5 mg/ml de ficína.

7.1.5. Determinación de actividad inhibitoria de la cistatina *AhCPI* purificada contra bromelaína.

Metodología similar al de ficína, excepto que el buffer de activación varia en (1 M de fosfatos de sodio, 0.3 M de KCl, 0.1 mM de EDTA, 0.003 M DTE), y la concentración de bromelaína es de 3.5 mg/ml (centrifugada, pulso de 5 seg).

7.2. Cuantificación de proteínas por el micro método de Bradford.

Un método sensible, rápido y muy confiable, se basa en la unión del Azul de Comassie G-250 con los aminoácidos básicos (Arginina) y residuos de aminoácidos aromáticos (Tirosina, fenilalanina y triptófano) de la proteína, esto forma un complejo proteína-colorante el cual es cuantificable a una longitud de onda de 595 nm en espectrofotómetro (Bradford *et al.*, 1976), véase en (Fig. 4).

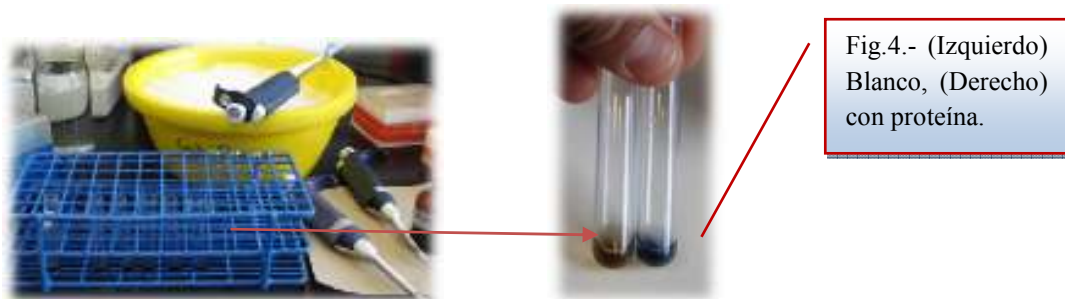


Fig. 4.- Determinación de proteínas, en base al método de cuantificación (Bradford *et al.*, 1996).

Colocar solución de proteína (μl) ajustando con agua a un volumen final de $400 \mu\text{l}$; posteriormente se le adiciona $100 \mu\text{l}$ de reactivo de Bradford y agitar (Fig. 4). Del mismo modo se prepara un blanco el cual no lleva proteína (Para calibrar); una vez preparado se deja incubando a temperatura ambiente por 15 minutos; y finalmente se cuantifica por medio de lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman DU 640) a una longitud de onda de 595 nm . Se busca un volumen de inhibidor que registre una lectura de absorbancia de cercana a 0.3000 valor que es aplicado en la formula $Y = 10.202 (x) - 0.1034$ en donde:

Y= Concentración de proteína en μg
 x = Promedio de absorbancia a 595 nm .

Cuadro 2.- Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Alícuota	Proteína (μl)	Agua μl	S. B. en μl	Vol. Total. μl
Blanco	0	400	100	500
A1	1	399	100	500
A2	2	398	100	500
A3	3	397	100	500
A4	4	396	100	500

A= tratamiento, SB = Solución de Bradford.; (Bradford *et al.*, 1996)

7.3. Efecto antifúngico de la cistatina recombinante *AhCPI*.

Se desarrollo bioensayos de inhibición de crecimiento de hongos fitopatógenos sobre medio Papa Dextrosa Agar (PDA) utilizando lisado celular bacteriano como inhibidor; posteriormente se realizan ensayos sobre microplacas ELISA de 96 pozos adicionando medio Papa Dextrosa Caldo (PDB) diluido a 1/3 en el cual se analiza la inhibición de germinación de inóculo de patógenos planteados, utilizando la *AhCPI* presente en lisado celular y de purificada por cromatografía de afinidad.

7.3.1. Inhibición de crecimiento de micelio en medio PDA.

Los bioensayos se realizaran en cajas de 50 mm, en las cuales se les colocara 25 ml de medio de cultivo PDA. Con un sacabocados se hicieron cuatro pozos con un diámetro de 5 mm, colocados en forma simétrica a 4 cm de distancia del centro de la placa (Fig. 5). Después de inocular el hongo en el centro de la placa, se colocaron diferentes cantidades de lisado celular, previamente esterilizado por ultrafiltración utilizando filtros PVDF de 0.2 de μm de poro. Las placas se incubaron a 28°C (*Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Glomerella cingulata*) y a 24° C (*Sclerotium cepivorum*, *Pythium sp.* y *Phytophthora cinnamomi*) por 7-10 días, haciendo observaciones a las 24, 48, 72 y 96 hrs.

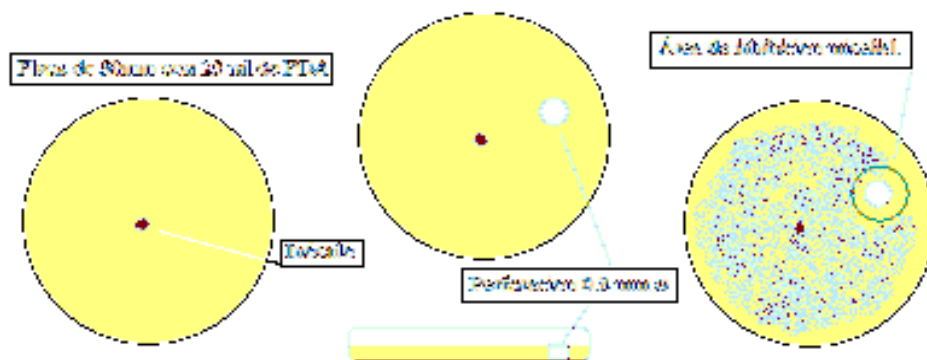


Fig. 5.- (a) inoculación del hongo, (b) Perforación de la placa para incorporar la cistatina e (c) Inhibición del hongo por la cistatina

7.3.2. Inhibición de la germinación de inoculo de hongos.

Por medio de la utilización de esporas, se realiza una incubación de inoculo del hongo sobre cajas petrí con medio PDA, incubando a 28° C por 7-10 días; una vez logrado el crecimiento deseado se realiza un lavado de micelio adicionando 10 ml de agua estéril, posteriormente por medio de agitaciones se logra desprendimiento de esporas, las cuales se recupera como solución sobrenadante, posteriormente por medio de diluciones se cuantifica con una cámara de Newbauer para así obtener concentraciones de 10⁴ esporas/ml.

Para determinar la inhibición de inoculo en placas de Elisa, en un volumen final de 250 µl se incuban cistatina (lisado celular bacteriano o cistatina purificada) e inoculo de hongo (*S. cepivorum* y *R. solani*, se utilizan 6 esclerocios y para *F. oxysporum* se utiliza 1000 conidias) en 83.3 µl de medio de cultivo PDB (24 g/L: Difco; al final adicionado agua estéril. Los ensayos son incubados a 24 (*S. cepivorum*) y 28° C (*F. oxysporum* y *R. solani*) por 72-96 hrs, el crecimiento es monitoreando por medio de lecturas de absorbancia en el lector de placas de Elisa (Microplate Manager Versión 5.2.1 Build 106, Bio-Rad) en base a la longitud de onda de 592 nm. Procedimientos con ligeras modificaciones (Pernas *et al.*, 1999; B. N. Joshi *et al.*, 1998; Broekaert *et al.*, 1990 and Martínez *et al.*, 2003).

Cuadro 3.- Distribución de tratamientos en placa Elisa (96 pozos): B= Blanco, C= 0 µg, T1= 10µg, T2= 20 µg, T3= 30 µg, T4= 40 µg y T5= 50 µg de la cistatina *AhCPI*.

B	B	B	B	B
C	C	C	C	C
T1R1	T1R2	T1R3		
T2R1	T2R2	T2R3		
T3R1	T3R2	T3R3		
T4R1	T4R2	T4R3		
T5R1	T5R2	T5R3		

B = Blanco para calibrar, C = Sin tratamiento, T= Tratamiento, R =Repetición del tratamiento.

8. RESULTADOS

En trabajos preliminares en el laboratorio se clonó y expresó el gen de la cistatina de amaranto en *Escherichia coli*, produciendo cistatina recombinante en altos rendimientos. Sin embargo, no se había comprobado que esta proteína producida en *E.coli* fuera biológicamente activa. Para esto primeramente se planteó evaluar la capacidad de la cistatina recombinante de inhibir enzimas proteolíticas del grupo de las cisteín proteinasas, tales como papaína, ficína y bromelaína. Para lo cual primeramente se evaluó la concentración de enzima activa en las enzimas comerciales con que recontaba en el laboratorio.

8.1. Titulación de sitio activo de papaína, ficína y bromelaína con el inhibidor E-64.

Para determinar la concentración de enzima activa, se realizaron pruebas de titulación del sitio activo. Para lo cual a una concentración conocida de enzima se le adicionaron diferentes concentraciones de el inhibidor E-64, evaluando la actividad proteolítica residual. En el caso de papaína los resultados obtenidos se muestran en el (Cuadro 4), en el cual se puede observar que conforme se incrementa la concentración de E-64 disminuye la actividad proteolítica residual. En la (Fig. 6) se muestra por extrapolación de los resultados de actividad proteolítica residual que una concentración de 0.0256 μM de E-64 inhibe el 100% de la actividad enzimática de la papaína. Considerando que la interacción de la papaína-E-64 se da en una relación molar 1:1, podemos inferir que la concentración de papaína activa en el ensayo corresponde a 0.0256 μM . En base a lo anterior, considerando que en el ensayo se utilizó una concentración de papaína de 2 μM , se pudo determinar que sólo el 12.8% de esta cantidad corresponde a enzima activa.

En el caso de ficína, los resultados obtenidos se muestran en el (Cuadro 5). En este caso partiendo de una concentración de ficína de 24.56 μM a la que corresponden 30.87 unidades de actividad proteolítica, se observó una disminución gradual de la actividad proteolítica al incrementar la concentración de E-64. En la (Fig. 7) se muestra como 0.18 μM de E-64 inhibió en su totalidad la actividad de la ficína, de lo cual se calculó que solo 0.738% de esta enzima está activa.

En el caso de bromelaína no fue posible titular su sitio activo, debido a que esta enzima presentó muy poca actividad proteolítica. Para detectar su actividad en el ensayo se requería utilizar concentraciones muy altas de la preparación enzimática, lo cual producía inestabilidad en el sistema de medición debido a la falta de solubilidad.

Cuadro 4.- Actividad proteolítica residual de papaína preincubada con diferentes concentraciones de E-64.

[E-64] ml	[E-64] μM	[Papaína] μM	\bar{X} Abs.	DE	U. A	DE
0.000	0	2	0.3087	0.0085	30.87	0.85
0.002	0.04	2	0.2496	0.0051	24.96	0.51
0.004	0.08	2	0.2058	0.0007	20.58	0.07
0.006	0.12	2	0.1678	0.0081	16.78	0.81
0.008	0.16	2	0.1345	0.0069	13.45	0.69
0.010	0.2	2	0.0738	0.0028	7.38	0.28
0.012	0.24	2	0.0076	0.0038	0.76	0.38
0.014	0.28	2	0.0206	0.0150	2.06	1.50
0.016	0.32	2	0.0081	0.0018	0.81	0.18
0.018	0.36	2	0.0259	0.0276	2.59	2.76
0.020	0.4	2	0.0038	0.0038	0.38	0.38

U.A= Unidades de actividad, DE = Desviación estándar, Abs= Absorbancia a λ 410 nm.

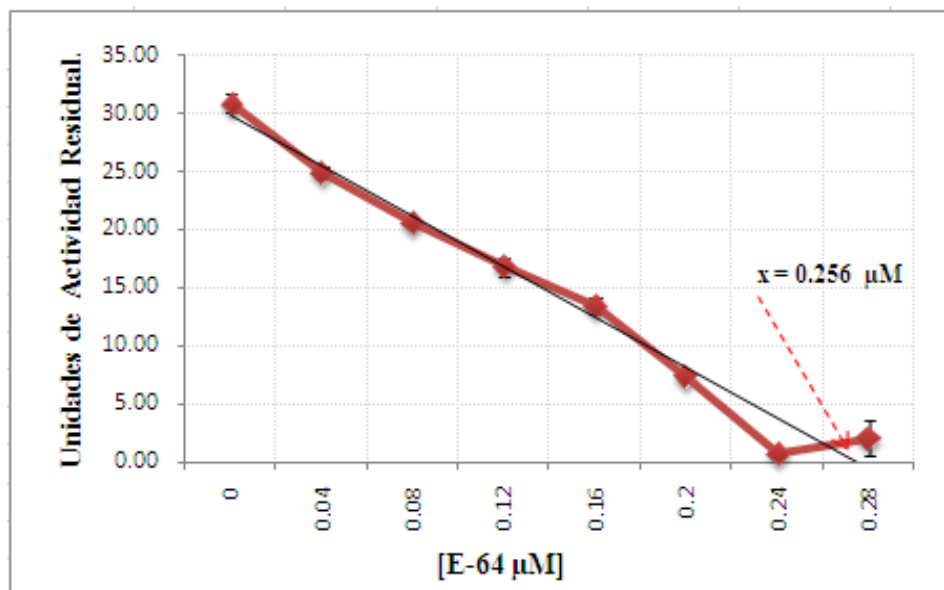


Figura 6.- Actividad proteolítica residual de papaína en presencia de diferentes concentraciones de E-64. Se determinó la actividad proteolítica residual de papaína después de incubar con diferentes concentraciones de E-64, utilizando BAPA como sustrato. Cada punto representa la media de tres repeticiones. La desviación estándar es menor que el tamaño de los puntos de la gráfica.

Cuadro 5.- Actividad proteolítica residual de ficina preincubada con diferentes concentraciones de E-64.

[E-64] ml	[E-64] μ M	[Ficina] μ M	\bar{X} Abs.	DE	U.A	DE
0.000	0	24.56	0.3034	0.0118	30.34	1.18
0.002	0.02	24.56	0.2680	0.0087	26.80	0.87
0.004	0.04	24.56	0.2520	0.0017	25.20	0.17
0.006	0.06	24.56	0.2043	0.0084	20.43	0.84
0.008	0.08	24.56	0.1574	0.0015	15.74	0.15
0.010	0.1	24.56	0.1155	0.0031	11.55	0.31
0.012	0.12	24.56	0.0757	0.0036	7.57	0.36
0.014	0.14	24.56	0.0464	0.0040	4.64	0.40
0.016	0.16	24.56	0.0179	0.0039	1.79	0.39
0.018	0.18	24.56	0.0071	0.0017	0.71	0.17
0.020	0.2	24.56	0.0058	0.0005	0.58	0.05

U.A= Unidades de actividad, DE = Desviación estándar, Abs.= Absorbancias a λ 410 nm.

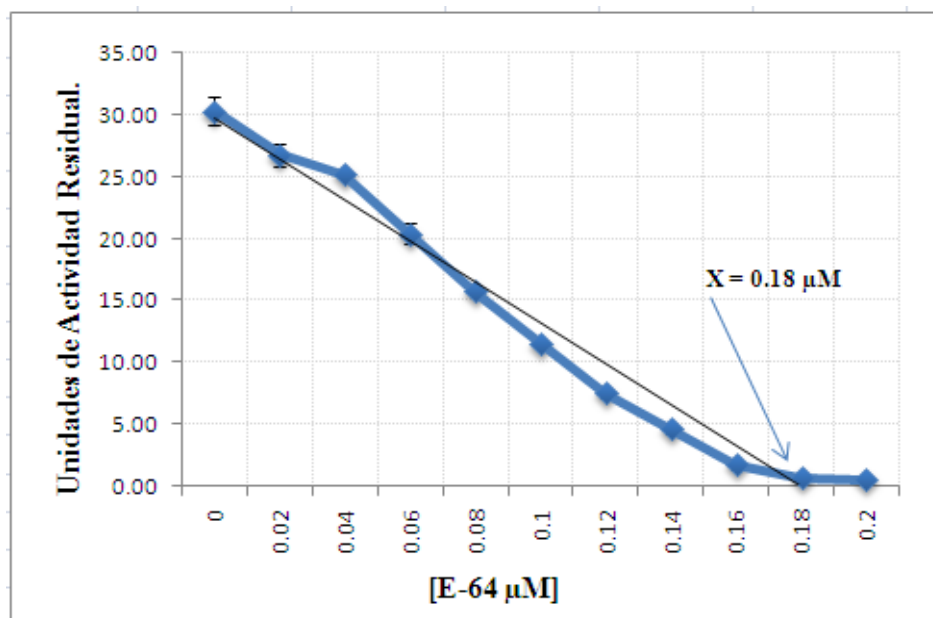


Figura 7.- Actividad proteolítica residual de Ficina en presencia de diferentes concentraciones de E-64. La ficina se preincubó con diferentes concentraciones de E-64 y se determinó la actividad proteolítica residual, utilizando BAPA como sustrato. Cada punto representa la media de tres repeticiones. La desviación estándar es menor que el tamaño de los puntos de la gráfica.

8.2. Efecto inhibitorio de la cistatina recombinante *AhCPI* sobre papaína, ficína y bromelaína.

Una vez que se corroboró la actividad de las enzimas comerciales se procedió a evaluar el efecto de la adición de concentraciones crecientes de cistatina recombinante sobre la actividad proteolítica de papaína, ficína y bromelaína. En el (Cuadro 7) se muestra como la cistatina recombinante inhibió la actividad proteolítica de la papaína conforme se incrementó la concentración de cistatina, observándose que 3.75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cistatina inhiben el 57% de la actividad de la papaína (Fig. 8).

En el caso de la ficína en el (Cuadro 9) se muestra el efecto de la cistatina recombinante sobre la actividad proteolítica de esta enzima. En este caso la actividad de la ficína también fue inhibida por la cistatina recombinante. Sin embargo, se requirieron concentraciones más altas de la cistatina para abatir la actividad de la enzima, observándose el 55% de la actividad proteolítica con 17.5 $\mu\text{g}/\mu\text{mg}$ de cistatina (Fig. 9).

En cuanto a la bromelaína, no se observó inhibición de la actividad proteolítica aún utilizando altas concentraciones de la cistatina recombinante. **La actividad proteolítica se mantuvo constante aún con concentraciones de cistatina de hasta 22.5 μg (Fig. 10).** De lo anterior se concluye que la cistatina recombinante se recupera en forma activa, siendo capaz de inhibir a la papaína y a la ficína, pero no mostró ningún efecto con bromelaína.

De las 3 cisteín-proteasas empleadas en los ensayos de actividad inhibitoria solo papaína y ficína presentaron inhibición en su actividad proteolítica por las cistatina *AhCPI* purificada; en el caso de bromelaína se determina que *AhCPI* no presenta ninguna inhibición contra su actividad proteolítica:

Papaína: Se determino que por cada 2 μM de papaína solo el 12.8% se encuentra activa (Fig. 6), de este modo con una concentración de 0.2372 μM de papaína se logra obtener 100% actividad proteolítica promedio (densidad óptica de 0.03). En base a concentraciones crecientes de la cistatina *AhCPI* se reduce de un 100% a un 3% lo que representa a un 97% de inhibición de actividad proteolítica, esto con una concentración de 10.15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cistatina recombinante (Cuadro 7). Se estima que de los 0.2372 μM de papaína usados en los ensayos de actividad inhibitoria solo el 0.03036 μM esta activa y es inhibida por la cistatina recombinante *AhCPI*.

Ficina: Se determina que por cada 24.56 μM de ficina solo el 0.73% se encuentra activa (Fig. 7), así con una concentración de 2.52 μM de ficina se logra obtener el 100% de actividad proteolítica promedio (densidad óptica de 0.03). En base a las concentraciones crecientes de la cistatina *AhCPI* se reduce de un 100% a un 27 %, lo que representa una inhibición del 73% de actividad proteolítica (Fig. 9) con una concentración de 29 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cistatina recombinante (Cuadro 9). Se estima que de los 2.5208 μM de ficina usados en los ensayos de actividad inhibitoria solo 0.01847 μM están activas y es inhibida por la cistatina recombinante *AhCPI*.

Bromelaína: La concentración de 5.89 μM bromelaína permite el 100% de actividad proteolítica promedio (Cuadro 10), se determina que no existe ningún efecto inhibitorio de la cistatina recombinante *AhCPI* sobre la actividad proteolítica de la proteasa (Fig. 10).

Cuadro 6.- Unidades de inhibición de papaína por la cistatina *AhCPI*. Concentraciones crecientes de cistatina recombinante se preincubaron con papaína y se determinó la actividad proteolítica residual, utilizando BAPA como sustrato.

Cistatina <i>AhCPI</i> purificada			Abs. λ 410 nm		Unid. Inh. /ml	
ml	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	[μM]	\bar{X} Abs.	DE	\bar{X} U.I	DE
0	0.00	0.00	0.0291	0.0000	0	0
0.001	1.45	51.79	0.0283	0.0003	76.67	0.8648
0.002	2.90	103.57	0.0178	0.0002	563.33	0.5249
0.003	4.35	155.36	0.0124	0.0002	555.56	0.5249
0.004	5.80	207.14	0.0073	0.0006	544.17	1.8926
0.005	7.25	258.93	0.0035	0.0005	512.00	1.5748
0.006	8.70	310.71	0.0023	0.0006	447.22	1.9840
0.007	10.15	362.50	0.0010	0.0004	401.43	1.2390
0.008	11.60	414.29	-0.0015	0.0004	382.92	1.4307
0.009	13.05	466.07	-0.0016	0.0002	341.11	0.6873
0.01	14.50	517.86	-0.0033	0.0001	323.50	6.4504

Los valores representan la media de al menos tres repeticiones. Abs.= Absorbancias; U.I.= Unidades de inhibición, DE= Desviación estándar.

Cuadro 7.- Actividad proteolítica residual (%) y unidades de inhibición de papaína preincubada con *AhCPI*.

[<i>AhCPI</i> µg/µl]	% Actividad	DE	% Inhibición	DE
0.00	100	0.0000	0	0.0000
1.45	97	3.5264	3	3.5264
2.90	61	1.6579	39	1.6579
4.35	43	1.4791	57	1.4791
5.80	25	2.3095	75	2.3095
7.25	12	1.4485	88	1.4485
8.70	8	1.9744	92	1.9744
10.15	3	1.3163	97	1.3163
11.60	-5	1.2718	105	1.2718
13.05	-6	0.8357	106	0.8357
14.50	-7	6.4511	107	6.4511

Los valores representan la media de al menos tres repeticiones. DE= Desviación estándar.

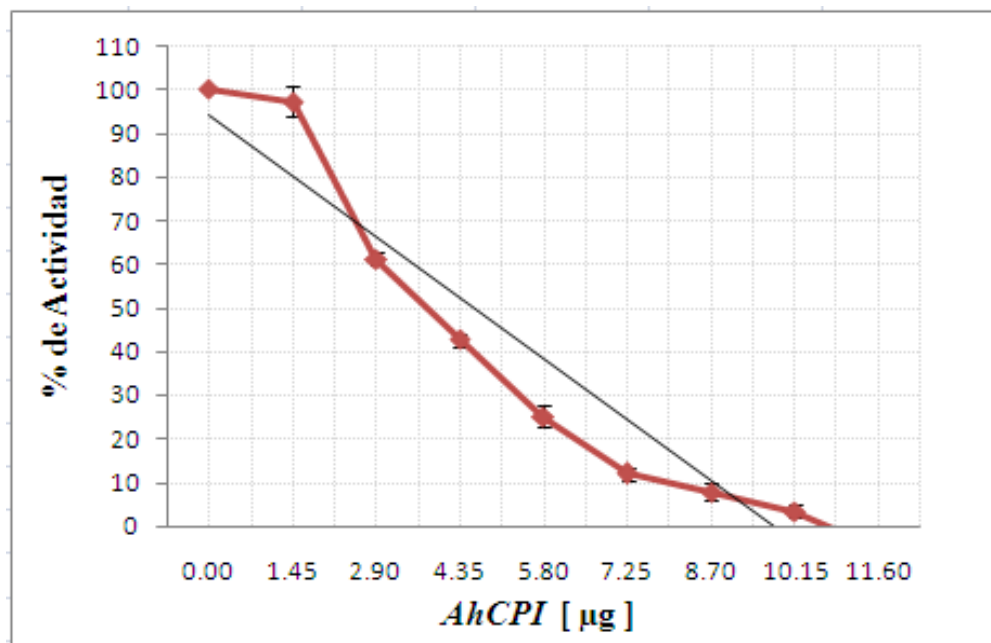


Figura. 8.- Actividad proteolítica residual (%) de papaína preincubada con concentraciones crecientes de cistatina *AhCPI*. La papaína se preincubó con diferentes concentraciones de cistatina y se determinó la actividad proteolítica residual, utilizando BAPA como sustrato. Cada punto representa la media de tres repeticiones. La desviación estándar es menor que el tamaño de los puntos de la gráfica.

Cuadro 8.- Inhibición de la actividad de ficina producida por la cistatina recombinante purificada.

Cistatina <i>AhCPI</i> purificada			Abs. a λ 410 nm		Unidades Inhibición.	
ml	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	μM	\bar{X} Abs.	DE	\bar{X} U.I.	DE
0	0	0.00	0.0267	0.000493	0.00	0.0000
0.002	2.9	103.57	0.0263	0.000404	21.67	1.6230
0.004	5.8	207.14	0.0246	0.000208	53.33	7.9900
0.006	8.7	310.71	0.0220	0.000850	78.89	17.7278
0.008	11.6	414.29	0.0194	0.000723	90.83	27.2160
0.01	14.5	517.86	0.0168	0.000300	99.00	37.0787
0.012	17.4	621.43	0.0146	0.000416	101.11	45.4432
0.014	20.3	725.00	0.0125	0.000436	101.43	53.1835
0.016	23.2	828.57	0.0104	0.000200	101.88	61.0487
0.018	26.1	932.14	0.0086	0.000693	100.56	67.7903
0.02	29	1035.71	0.0073	0.000520	97.00	85.9274

Los valores representan la media de al menos tres repeticiones. Abs. = Absorbancia, U.I.= Unidades de inhibición, DE= Desviación estándar.

Cuadro 9.- Actividad proteolítica residual de ficina preincubada con diferentes concentraciones de cistatina recombinante.

[<i>AhCPI</i>] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	% Actividad	DE	% Inhibición	DE
0	100	1.8475	0	1.8475
2.9	98	1.5137	2	1.5137
5.8	92	0.7797	8	0.7797
8.7	82	3.1854	18	3.1854
11.6	73	2.7094	27	2.7094
14.5	63	1.1236	37	1.1236
17.4	55	1.5593	45	1.5593
20.3	47	1.6325	53	1.6325
23.2	39	0.7491	61	0.7491
26.1	32	2.5948	68	2.5948
29	27	1.9461	73	1.9461

Los valores representan la media de al menos tres repeticiones, DE= Desviación estándar,

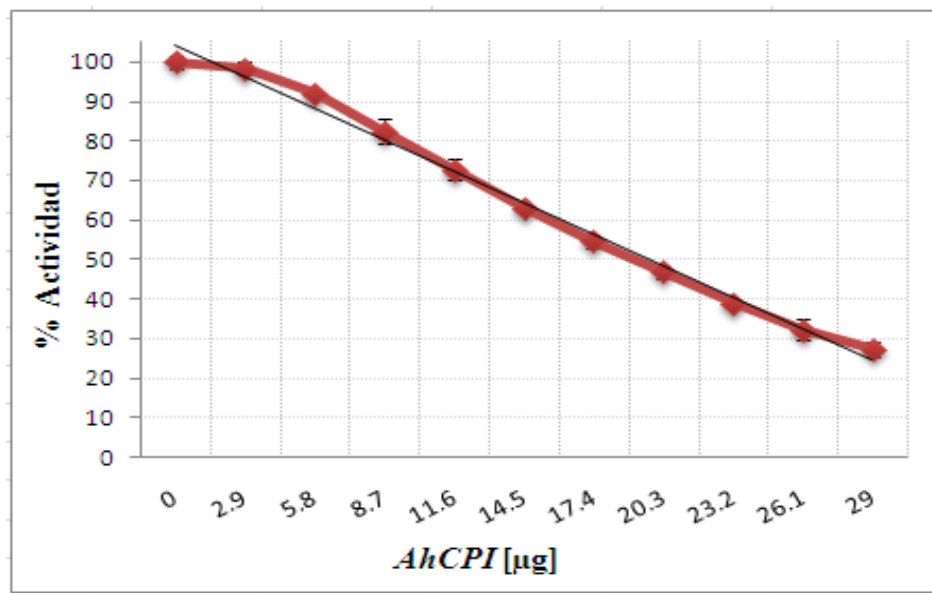


Figura 9.- Actividad proteolítica residual de ficina preincubada con diferentes concentraciones de AhCPI. La ficina se preincubó con diferentes concentraciones de cistatina y se determinó la actividad proteolítica residual, utilizando BAPA como sustrato. Cada punto representa la media de tres repeticiones. La desviación estándar es menor que el tamaño de los puntos de la gráfica.

Cuadro 10.- Unidades de Inhibición de bromelaína por la cistatina recombinante *AhCPI*. Se demuestra que aun con altas concentraciones de cistatina recombinante no se encuentra alguna inhibición sobre la actividad proteolítica de bromelaína.

<i>AhCPI</i>		Lecturas de Absorbancia					Efecto	
ml	µg/µl	Abs. 1	Abs. 2	Abs.3	\bar{X} Abs.	DE	% Act.	% Inh.
0	0	0.0317	0.03112	0.0321	0.0316	0.000493	100	0
0.001	2.04	0.0322	0.0317	0.0315	0.0318	0.000361	101	-1
0.002	4.08	0.0311	0.0313	0.0338	0.0321	0.001504	101	-1
0.003	6.12	0.0329	0.0332	0.0326	0.0329	0.000300	104	-4
0.004	8.16	0.0332	0.0359	0.0327	0.0339	0.001721	107	-7
0.005	10.2	0.0349	0.0379	0.033	0.0353	0.002470	112	-12
0.006	12.24	0.038	0.0377	0.0357	0.0371	0.001250	118	-18
0.009	14.28	0.0347	0.0352	0.0334	0.0344	0.000929	109	-9
0.01	16.32	0.0355	0.0356	0.0338	0.0350	0.001012	111	-11
0.02	18.36	0.0338	0.0337	-	0.0338	0.000071	107	-7
0.03	20.4	0.0353	0.0351	-	0.0352	0.000141	111	-11
0.04	22.44	0.0376	0.0347	-	0.0362	0.002051	114	-14

Abs.= Absorbancias, a λ 410 nm, DE = Desviación estándar, Act.= Actividad, Inh.= Inhibición.

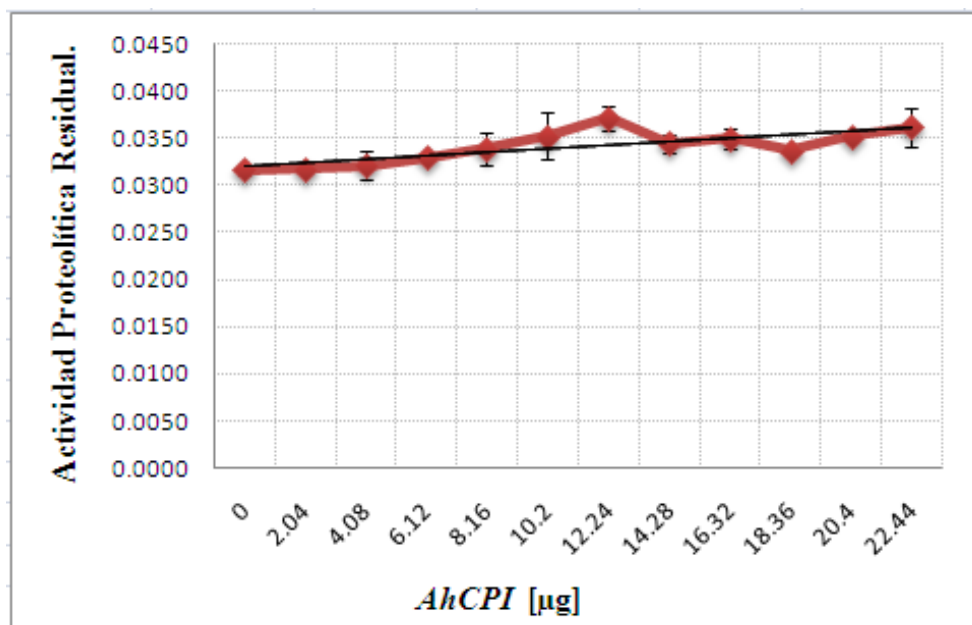


Figura 10.- Actividad proteolítica residual de bromelaína preincubada con diferentes concentraciones de *AhCPI*. La bromelaína se preincubó con diferentes concentraciones de cistatina y se determinó la actividad proteolítica residual, utilizando BAPA como sustrato. Cada punto representa la media de tres repeticiones. La desviación estándar en algunos casos fue menor que el tamaño de los puntos de la gráfica.

8.3. Efecto antifúngico de la cistatina recombinante *AhCPI* purificada por cromatografía de afinidad.

8.3.1. Ensayos - Inhibición en medio solido PDA.

Para evaluar el efecto antifúngico de la cistatina recombinante se realizaron ensayos preliminares utilizando lisados de *E.coli* que expresaron la cistatina en altos niveles. Diferentes concentraciones de proteína de este lisado se colocaron en medio PDA y se inocularon los hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Glomerella cingulata*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium sp*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium cepivorum*.

En estos ensayos la cistatina recombinante del lisado celular no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de micelio de las diferentes especies de hongos, aún utilizando concentraciones de proteína de 1 mg. Si bien las evaluaciones se realizaron cada 24 h durante 96 h, en ningún caso se observó un retardo significativo en el crecimiento del hongo, con respecto al control crecido en ausencia de cistatina.

8.3.2. Ensayos Inhibición en medio liquido PDB.

8.3.2.1. Efecto de la cistatina recombinante *AhCPI* presente en lisado celular.

En estos ensayos debido a la facilidad en el manejo de los inóculos se continuó trabajando sólo con tres especies de hongos fitopatógenos: *F. oxysporum* (conidias), *S. cepivorum* y *R. solani* (esclerocios). Los cultivos se realizaron en medio líquido contenido en placas de Elisa, a los cuales se les adicionaron 0, 400, 1000, 2000 y 3000 µg/ml de proteína recombinante presente en lisado celular y se evaluó el crecimiento midiendo la turbidez del medio cada 12 horas.

Los resultados obtenidos con: *F. oxysporum* se muestran en la (Fig. 12). En la cual se observó que concentraciones de cistatina de 400 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ no mostraron ningún efecto en el crecimiento de este hongo, observándose un creciendo similar al del control. Sin embargo, las concentraciones de 2000 y 3000 $\mu\text{g/ml}$ aunque no mostraron ningún efecto en el crecimiento del hongo durante las primeras 40 horas, después de este tiempo se observó una estimulación significativa del crecimiento. La estimulación de crecimiento observada con las altas concentraciones de cistatina quizá se deba a que el hongo sea capaz de metabolizar algunas de las proteínas presentes en el lisado celular.

En el caso de *S. cepivorum* no se observó ningún efecto durante las 42 horas de duración de la fase lag de crecimiento de este hongo con concentraciones de cistatina de 400 y 1000 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, después de esta fase se observó una inhibición total de crecimiento del hongo con respecto al control, lo cual se comprobó en observaciones al microscopio en donde se ratificó la ausencia del crecimiento del hongo. Las dosis de 2000 y 3000 $\mu\text{g/ml}$ produjeron una inhibición total del crecimiento, pero en este caso se reportó un incremento en densidad óptica atribuido a la alta cantidad de proteína que se adicionó al medio, lo cual se aprecia (Fig.13).

El efecto de la cistatina del lisado celular sobre *R. solani* se ilustra en la (Fig. 14), en la cual se observó que concentraciones de 2000 y 3000 $\mu\text{g/ml}$ de proteína inhibieron la germinación de los esclerocios, mientras que las dosis de 400 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ produjeron una ligera inhibición del crecimiento en las primeras horas de incubación, estimulando el crecimiento después de 42 y 65 horas, respectivamente.

Los resultados obtenidos con lisado celular de *Escherichia coli* sugieren que la cistatina recombinante *AhCPI* confiere un efecto inhibitorio de la sobre el crecimiento y el desarrollo de las especies de hongos probados. Para corroborar lo anterior se evaluó el efecto con la cistatina purificada por cromatografía de afinidad. Por este proceso se eliminaron las proteínas presentes en el lisado celular y así recuperando proteína *AhCPI* pura; lo cual se corroboró observándose una sola banda de cistatina de 28kDa en geles de poliacrilamida (Fig. 11).

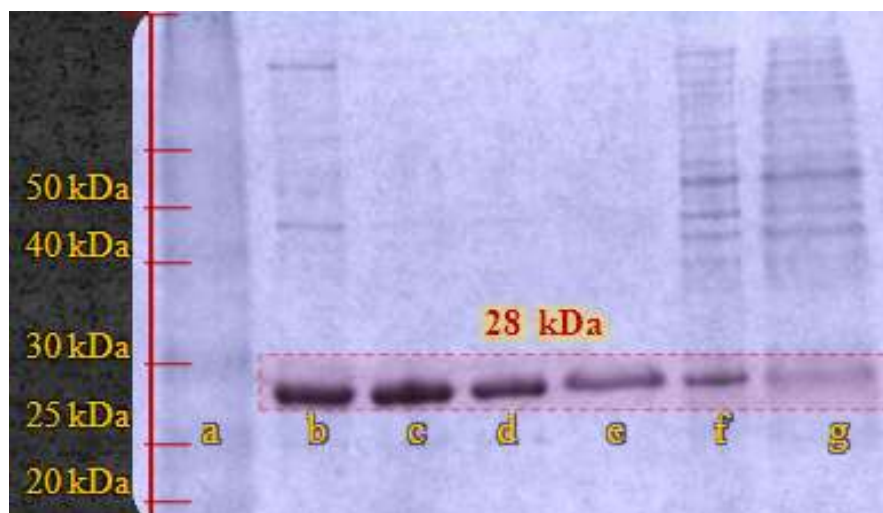


Fig. 11.- Perfil electroforético en gel de poliacrilamida-SDS de la cistatina recombinante purificada por cromatografía de afinidad. El sobrenadante del lisado celular se pasó a través de una columna de Ni. Después de lavar la columna con buffer de lisis, se eluyó la cistatina con el mismo buffer, conteniendo 250 mM de imidazol. Carril (a) marcador de masa molecular (10-220 kDa/ Invitrogen), (b, c, d, e) Cistatina purificada eluída de la de columna de afinidad , f) lisado celular, g) fracción no retenida en la columna. Concentraciones de 2 μ g de proteína por carril.

Cuadro 11.- Valores de absorbancia de los cultivos de *F. oxysporum* crecido en presencia de diferentes concentraciones de lisado celular de *E.coli*. El crecimiento se determinó a diferentes tiempos de incubación midiendo la absorbancia a λ 592 nm, durante 65 h.

Promedio de Absorbancias						
<i>AhCPI</i>	0 hrs	19 hrs	32 hrs	42 hrs	56 hrs	65 hrs
0 μ g/ml	0.1987	0.0937	0.7917	0.9847	1.0640	0.9468
400 μ g/ml	0.1633	0.1030	0.8183	1.0797	1.1663	1.0214
1000 μ g/ml	0.1583	0.1157	0.4547	0.8463	1.1683	0.8231
2000 μ g/ml	0.1843	0.1993	0.5430	1.1057	1.9283	1.1923
3000 μ g/ml	0.2527	0.3020	0.5863	1.1700	1.8730	1.2098
Desviaciones Estándar						
<i>AhCPI</i>	0 hrs	19 hrs	32 hrs	42 hrs	56 hrs	65 hrs
0 μ g/ml	0.1307	0.0051	0.1441	0.1736	0.1067	0.1401
400 μ g/ml	0.0111	0.0087	0.0910	0.0361	0.0959	0.1812
1000 μ g/ml	0.0300	0.0015	0.2801	0.1324	0.0998	0.3574
2000 μ g/ml	0.0064	0.0031	0.0771	0.1716	0.1985	0.6967
3000 μ g/ml	0.0029	0.0066	0.0595	0.2829	0.1535	0.6443

Los valores representan la media de al menos tres repeticiones, DE= Desviación estándar.

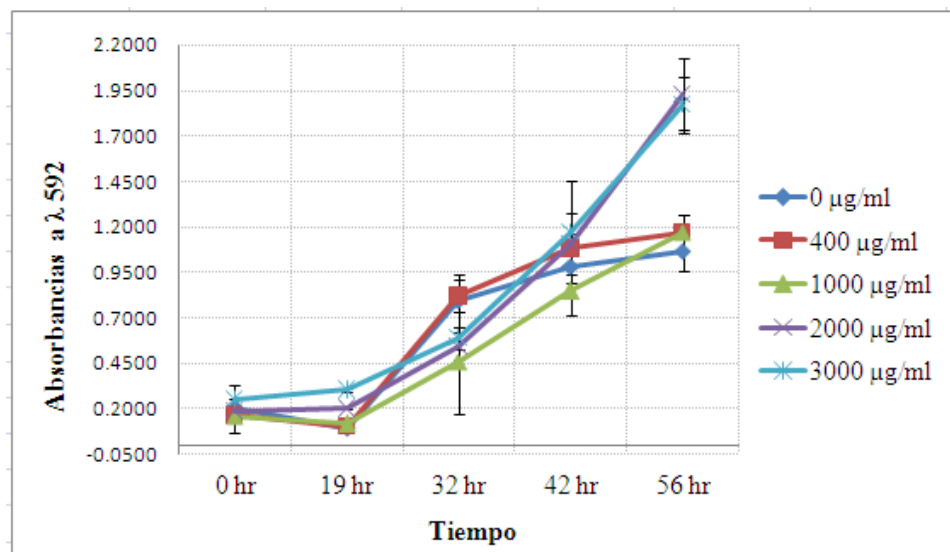


Figura 12.- Cinética de crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de diferentes concentraciones de lisado celular de *E.coli*. *F. oxysporum* se incubó en caldo de papa-dextrosa al que se le incorporaron diferentes concentraciones del lisado de *E.coli* en la que se expresó la cistatina. Se leyó la absorbancia a 592 nm durante 56 h. Como control se utilizó un cultivo del mismo hongo sin lisado celular.

Cuadro 12.- Absorbancia de cultivos de *S. cepivorum* crecidos, en presencia de cistatina recombinante presente en el lisado celular de *E.coli*. Las lecturas se realizaron a λ 592 nm a diferentes tiempos de incubación. Los valores registrados representan la media de tres repeticiones.

Promedios de Absorbancias							
<i>AhCPI</i>	0 hrs	19 hrs	32 hrs	42 hrs	56 hrs	65 hrs	79 hrs
0 µg/ml	0.0993	0.0937	0.0867	0.0927	0.1780	0.2597	0.4113
400 µg/ml	0.1140	0.1030	0.0937	0.0957	0.1050	0.1157	0.1193
1000 µg/ml	0.1217	0.1157	0.1113	0.1150	0.1210	0.1280	0.1297
2000 µg/ml	0.1947	0.1993	0.2047	0.2147	0.2275	0.2337	0.2360
3000 µg/ml	0.2253	0.3020	0.3100	0.3167	0.3310	0.3340	0.3420
Desviaciones estándar							
<i>AhCPI</i>	0 hrs	19 hrs	32 hrs	42 hrs	56 hrs	65 hrs	79 hrs
0 µg/ml	0.0112	0.0051	0.0006	0.0072	0.0400	0.0367	0.0301
400 µg/ml	0.0191	0.0087	0.0031	0.0040	0.0182	0.0248	0.0215
1000 µg/ml	0.0154	0.0015	0.0032	0.0035	0.0026	0.0026	0.0040
2000 µg/ml	0.0231	0.0031	0.0025	0.0006	0.0078	0.0068	0.0079
3000 µg/ml	0.0051	0.0066	0.0036	0.0032	0.0026	0.0036	0.0026

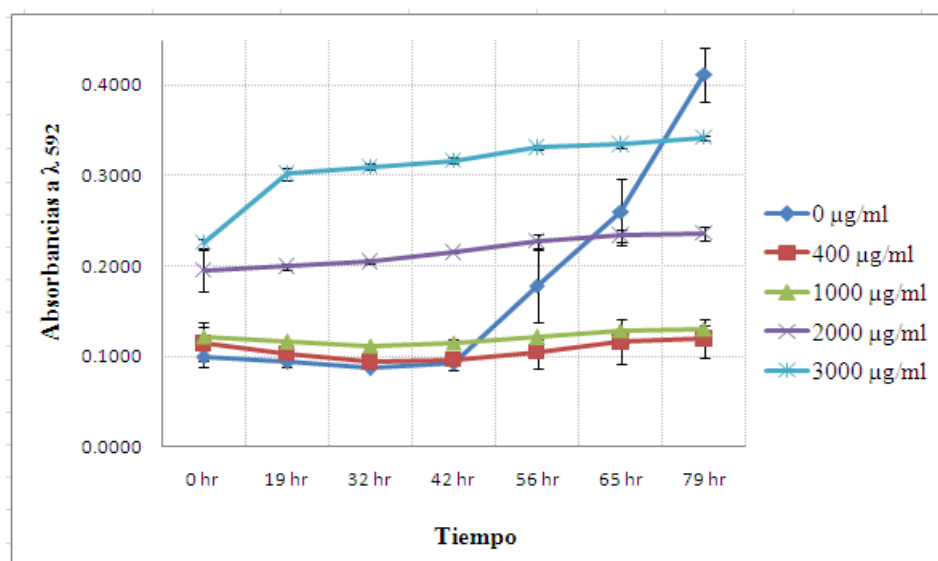


Figura 13.- Cinética de crecimiento de *S. cepivorum* en presencia de diferentes concentraciones de lisado celular de *E.coli*. *S. cepivorum* se incubó en caldo de papa-dextrosa al que se le incorporaron diferentes concentraciones del lisado de *E.coli* en la que se expresó la cistatina. Se leyó la absorbancia a 592 nm durante 79 h. Como control se utilizó un cultivo del mismo hongo sin lisado celular.

Cuadro 13.- Lecturas de Absorbancia con respecto al crecimiento de *R. solani*, utilizando cistatina recombinante *AhCPI* de lisado celular. Las lecturas se realizaron a 592 nm a diferentes tiempos de incubación. Los valores registrados representan la media de tres repeticiones.

Promedios de Absorbancias						
<i>AhCPI</i>	19 hrs	32 hrs	42 hrs	56 hrs	65 hrs	79 hrs
0 µg/ml	0.1460	0.1903	0.3873	0.7570	0.8137	0.8037
400 µg/ml	0.1530	0.1470	0.2417	1.0980	1.2137	1.2423
1000 µg/ml	0.1727	0.1473	0.1937	0.4317	0.8857	1.3220
2000 µg/ml	0.2525	0.2265	0.2885	0.3180	0.2900	0.5755
3000 µg/ml	0.3475	0.3550	0.4020	0.3475	0.4840	0.3170
Desviaciones Estándar						
<i>AhCPI</i>	19 hrs	32 hrs	42 hrs	56 hrs	65 hrs	79 hrs
0 µg/ml	0.0156	0.0241	0.1238	0.0684	0.0712	0.0858
400 µg/ml	0.0121	0.0280	0.0407	0.0973	0.0866	0.0779
1000 µg/ml	0.0080	0.0150	0.0135	0.0664	0.1860	0.0547
2000 µg/ml	0.0007	0.0021	0.0700	0.0396	0.0424	0.0686
3000 µg/ml	0.0191	0.0354	0.0311	0.0615	0.0792	0.0354

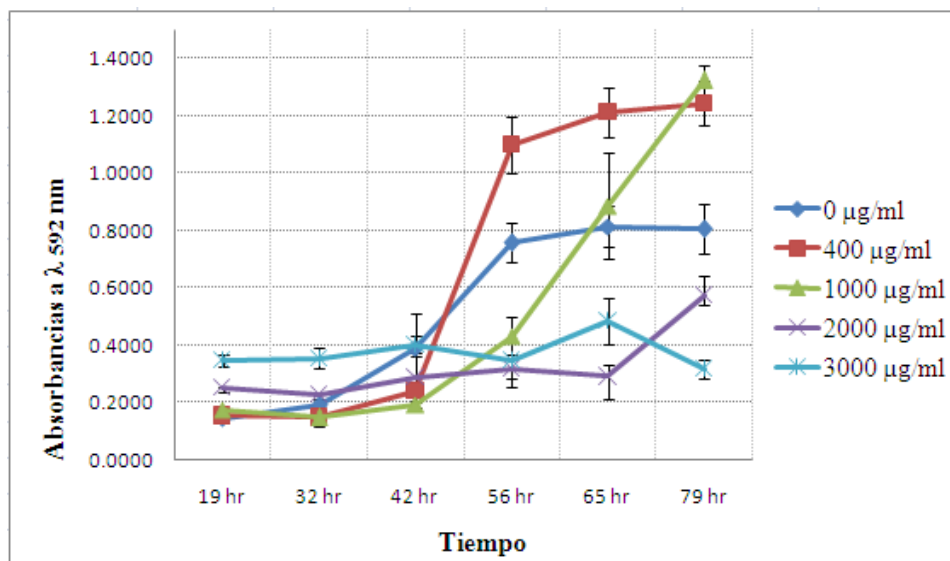


Figura 14.- Cinética de crecimiento de *R. solani*. en presencia de diferentes concentraciones de lisado celular de *E.coli.*, *R. solani* se incubó en caldo de papa-dextrosa al que se le incorporaron diferentes concentraciones del lisado de *E.coli* en la que se expresó la cistatina. Se leyó la absorbancia a 592 nm durante 79 h. Como control se utilizó un cultivo del mismo hongo sin lisado celular.

8.3.2.2. Efecto de la cistatina recombinante *AhCPI* purificada por cromatografía de afinidad.

El efecto de la cistatina recombinante purificada, sobre el crecimiento de *F. oxysporum* se muestra en la (figura 15), en la que se hace evidente que concentraciones de 120 µg/ml inhibieron el crecimiento de este hongo. Esta inhibición aumentó conforme se incrementó la concentración de cistatina en el medio de cultivo, observándose una inhibición total del crecimiento con 400, 600 y 800 µg/ml. Los resultados presentados en la (figura 16) ponen de manifiesto que el efecto inhibitorio de crecimiento fue proporcional a la concentración de cistatina utilizada en el ensayo, y que se presentó desde las primeras horas de incubación de *F. oxysporum*. . Con concentraciones de 120 y 240 µg/ml de cistatina se observó cierta recuperación en el crecimiento del hongo a las 24 y 30 h, respectivamente, observándose una menor inhibición del crecimiento con respecto al control a tiempos de incubación más prolongados. En cambio con las concentraciones de 400, 600 y 800 µg/ml la inhibición fue mayor conforme aumentó el tiempo de incubación.

El análisis microscópico de los cultivos de *F. oxysporum* a las 48 horas de incubación (Fig. 17) permitió determinar cambios estructurales importantes con las diferentes concentraciones de cistatina. En el control sin cistatina se observa la presencia de hifas alargadas con ramificaciones largas; en cambio con las concentraciones de 120 (30 μg) y 240 (60 μg) $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cistatina se observa que los septos de las hifas se acortan y presentan ramificaciones muy cortas. Con concentraciones de cistatina de 400(100 μg), 600 (150 μg) y 800 (200 μg) $\mu\text{g}/\text{ml}$ se observó una inhibición total de la germinación de conidias, las cuales sufren un hinchamiento semejando conidias deformes y globosas.

En el caso de *S. cepivorum* utilizando como inóculo cuerpos fructíferos (esclerocios), se observó que concentraciones de 40 a 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cistatina purificada produjeron un severo efecto inhibitorio en el crecimiento de este hongo, con respecto al control, ver (Fig. 18). Observaciones microscópicas de los cultivos a las 72 h mostraron que concentraciones de 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cistatina reducen fuertemente el crecimiento y longitud de las hifas, con 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se observó una alta inhibición en la aparición de brotes de las hifas, las cuales se observan cortas y poco ramificadas. Con concentraciones superiores a 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se obtuvo una inhibición total de la germinación de los esclerocios, ver (Fig. 19)

En lo que respecta a la inhibición de crecimiento de *R. solani*, los resultados obtenidos se muestran en la (Fig. 20) que de igual manera se utilizan cuerpos fructíferos (esclerocios). Todas las concentraciones de cistatina utilizadas (40-240 $\mu\text{g}/\text{ml}$) provocaron una inhibición en el crecimiento de este hongo fitopatógeno. Esta inhibición ocurrió a partir de las primeras horas de incubación de los cultivos (Fig. 21). En el caso de las concentraciones de 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cistatina se observó, aunque muy baja, cierta recuperación del crecimiento después de 30 horas de incubación. Con las concentraciones más altas se observó una mayor inhibición en el crecimiento con respecto al control, conforme se aumentó el tiempo de incubación de los cultivos.

Observaciones al microscopio de los cultivos permitieron determinar que conforme aumentó la concentración de cistatina en el medio, hubo un menor crecimiento de micelio, lográndose una inhibición total de la germinación de con la concentración de cistatina de 240 µg/ml (Fig. 22).

La cistatina recombinante de amaranto purificada es capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de los hongos fitopatógenos *F. oxysporum*, *S. cepivorum*. y *R. solani*.; mostrando un mayor efecto frente a estos dos últimos. Esto plantea la posibilidad de que a futuro, crear una planta transformada genéticamente que sea capaz de expresar el gen de la cistatina y así inducir a la producción de proteínas útil para el control estos organismos plaga, y otros patógenos, así como sistemas alternativo de la planta. Con ello se abatirá algunos problemas fitosanitarios que se presenta en la producción del sector agrícola.

Cuadro 14.- Lecturas de Absorbancia de cultivos de *F. oxysporum* crecidos en presencia de cistatina recombinante *AhCPI* purificada. Las lecturas se realizaron a 592 nm, cada 6 h durante 48 h. Los valores registrados representan la media de tres repeticiones.

Promedios de Absorbancias									
<i>AhCPI</i>	0 hrs	6 hrs	12 hrs	18 hrs	24 hrs	30 hrs	36 hrs	42 hrs	48 hrs
0 µg/ml	0.1093	0.1050	0.1072	0.3000	0.4677	0.5847	0.6590	0.7017	0.7007
120 µg/ml	0.1180	0.1107	0.1143	0.2197	0.3243	0.4267	0.5483	0.6057	0.6217
240 µg/ml	0.1163	0.1077	0.1120	0.1160	0.1420	0.2177	0.3260	0.4400	0.5463
400 µg/ml	0.1190	0.1113	0.1152	0.0993	0.0973	0.1057	0.1213	0.1237	0.1073
600 µg/ml	0.1200	0.1080	0.1140	0.0993	0.0947	0.1033	0.1223	0.1233	0.1020
800 µg/ml	0.1110	0.1010	0.1060	0.0973	0.0967	0.1003	0.1033	0.1010	0.1023
Desviaciones Estándar									
<i>AhCPI</i>	0 hrs	6 hrs	12 hrs	18 hrs	24 hrs	30 hrs	36 hrs	42 hrs	48 hrs
0 µg/ml	0.0038	0.0140	0.0315	0.0383	0.0349	0.0525	0.0632	0.0351	0.0846
120 µg/ml	0.0069	0.0115	0.0409	0.0876	0.0875	0.0847	0.0842	0.0981	0.1030
240 µg/ml	0.0006	0.0042	0.0087	0.0044	0.0131	0.0284	0.0478	0.0387	0.0263
400 µg/ml	0.0053	0.0090	0.0119	0.0055	0.0045	0.0095	0.0100	0.0164	0.0124
600 µg/ml	0.0020	0.0035	0.0095	0.0015	0.0021	0.0080	0.0080	0.0117	0.0096
800 µg/ml	0.0079	0.0044	0.0040	0.0029	0.0006	0.0032	0.0078	0.0017	0.0015

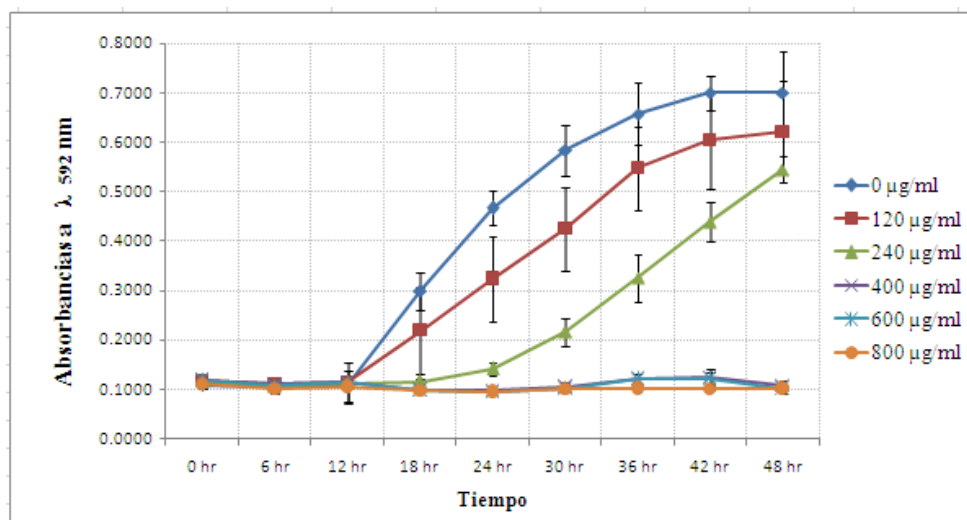


Figura 15.- Cinética de crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada por cromatografía de afinidad. *F. oxysporum* se incubó en caldo de papa-dextrosa al que se le incorporaron diferentes concentraciones cistatina. Se determinó el crecimiento midiendo la absorbancia a 592 nm durante 56 h. Como control se incluyó un cultivo del mismo hongo sin cistatina.

Cuadro 15.- Porcentaje de crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada. La absorbancia de los cultivos de *F. oxysporum* en ausencia de cistatina, a los diferentes tiempos de incubación representó el 100% de crecimiento. Los valores registrados representan la media de tres repeticiones.

Promedios de lecturas (%)								
AhCPI	0 hrs	12 hrs	18 hrs	24 hrs	30 hrs	36 hrs	42 hrs	48 hrs
0 µg/ml	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
120 µg/ml	100.00	94.95	72.80	69.17	72.85	83.03	86.12	88.46
240 µg/ml	100.00	80.56	39.24	30.62	37.75	50.27	63.00	78.96
400 µg/ml	100.00	77.73	33.34	20.86	18.08	18.43	17.59	15.33
600 µg/ml	100.00	72.85	33.47	20.32	17.70	18.61	17.58	14.67
800 µg/ml	100.00	59.55	32.73	20.74	17.24	15.73	14.41	14.75
Desviaciones Estándar								
AhCPI	0 hrs	12 hrs	18 hrs	24 hrs	30 hrs	36 hrs	42 hrs	48 hrs
0 µg/ml	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
120 µg/ml	5.8880	23.4373	26.0785	16.8981	11.6300	7.4176	11.5885	5.9579
240 µg/ml	4.2924	14.8675	6.7943	5.2470	8.6394	12.6325	8.6473	12.6063
400 µg/ml	1.1137	13.1860	2.7079	1.1720	0.6050	0.4212	1.7527	0.0918
600 µg/ml	2.6204	12.5123	4.1824	1.5996	0.9063	0.8945	1.5034	1.8405
800 µg/ml	10.2131	9.7174	3.4059	1.4732	1.4013	1.0748	0.5073	1.7434

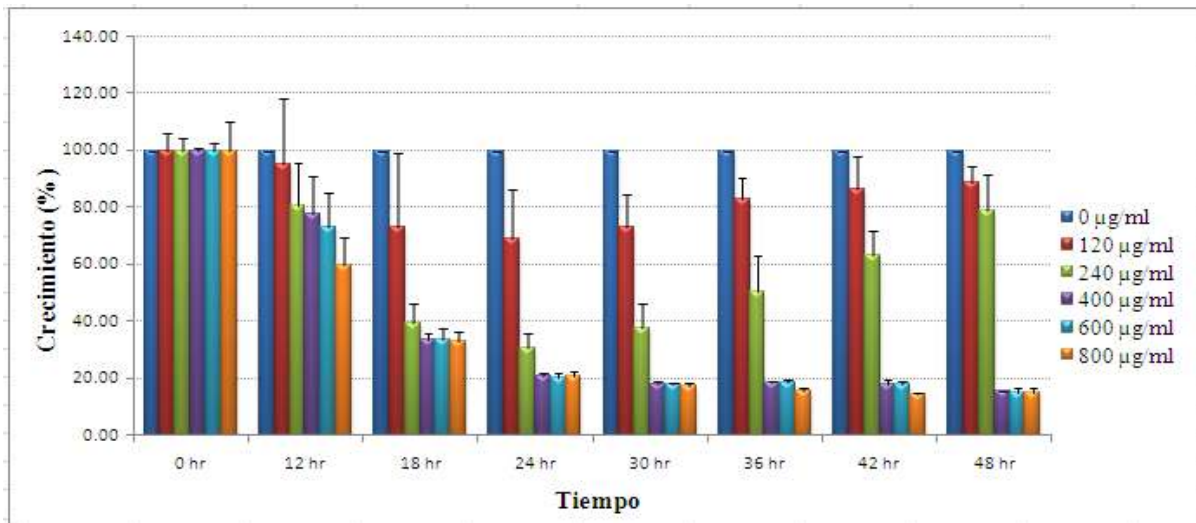


Figura 16.- Efecto de la cistatina recombinante purificada sobre el crecimiento de *F. oxysporum*. A cultivos de *F. oxysporum* crecidos en medio líquido adicionado de diferentes concentraciones de cistatina purificada, se les monitorio el crecimiento, midiendo la absorbancia a 592 nm cada 6 h durante 48 horas, Como control se utilizó un cultivo del mismo hongo carente de cistatina. Los resultados representan la media de al menos tres repeticiones.

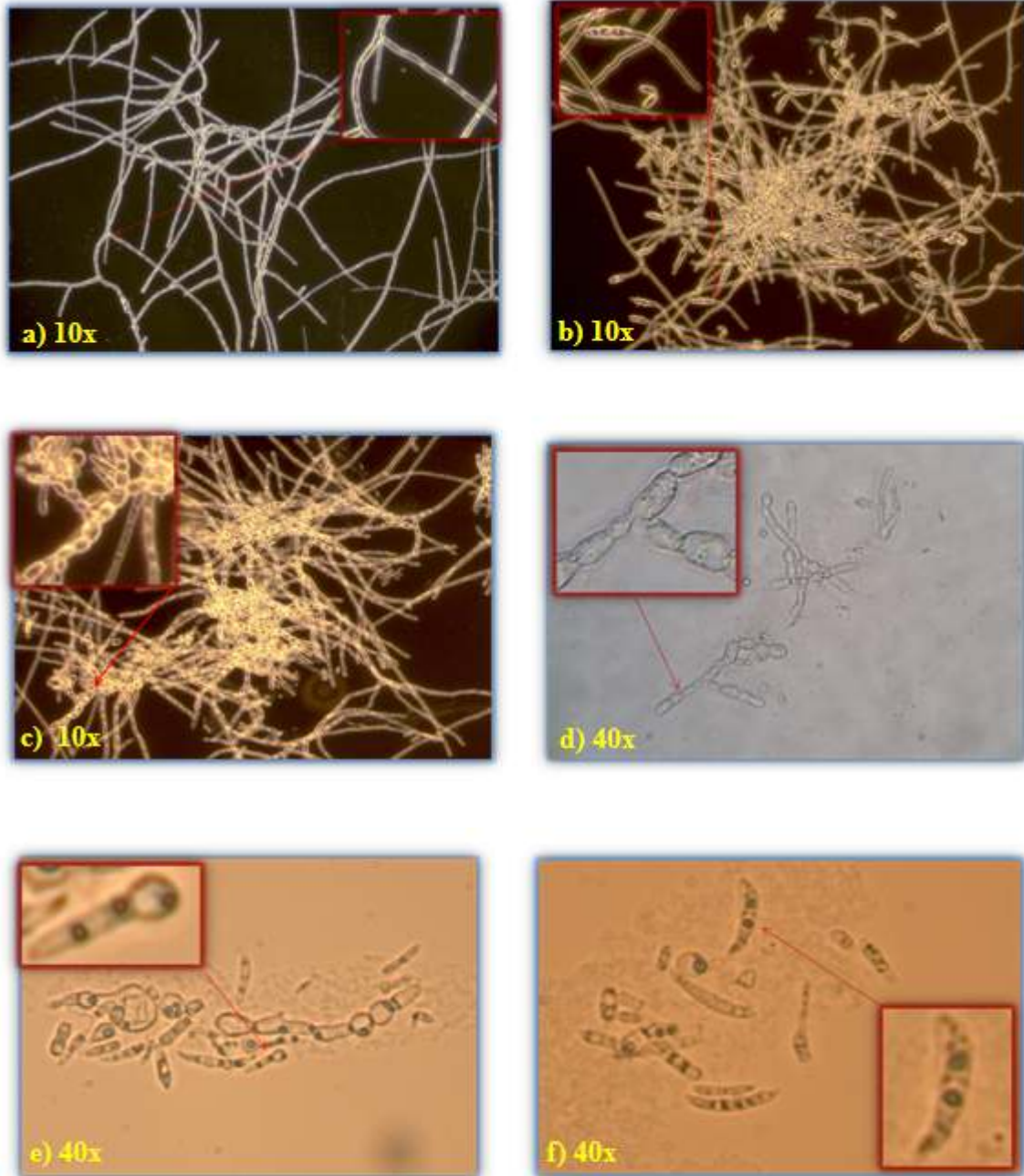


Figura 17.- Microfotografías de la morfología micelial de *Fusarium oxysporum* crecidos en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada. . Fotos tomadas a las 48 hrs de incubación con: a) 0 $\mu\text{g/ml}$, b) 120, c) 240, d) 400, e) 600 y f) 800 $\mu\text{g/ml}$ de cistatina recombinante *AhCPI* purificada. Las imágenes se obtuvieron en microscopio en campo oscuro, en cada caso se indica el aumento utilizado.

Cuadro 16.- Lecturas de Absorbancia de cultivos de *S. cepivorum* crecidos en presencia de cistatina recombinante AhCPI purificada. Las lecturas se realizaron a 592 nm, cada 6 h durante 48 h. Los valores registrados representan la media de tres repeticiones.

Promedios de Absorbancias									
AhCPI	0 hrs	12 hrs	18 hrs	24 hrs	30 hrs	36 hrs	42 hrs	48 hrs	54 hrs
0 µg/ml	0.1443	0.1190	0.1123	0.1107	0.1147	0.1257	0.1773	0.4087	0.7037
40 µg/ml	0.1825	0.2230	0.2053	0.2190	0.1640	0.1823	0.2167	0.1607	0.1633
80 µg/ml	0.1800	0.1957	0.1370	0.1423	0.1340	0.1377	0.1573	0.1130	0.1320
120 µg/ml	0.2343	0.1407	0.1423	0.1400	0.1623	0.1733	0.1430	0.1293	0.1517
160 µg/ml	0.2270	0.1620	0.1433	0.1917	0.2200	0.2177	0.2390	0.1903	0.1873
200 µg/ml	0.1383	0.1053	0.1063	0.1177	0.1210	0.1193	0.1343	0.1783	0.1853
Desviaciones Estándar									
AhCPI	0 hrs	12 hrs	18 hrs	24 hrs	30 hrs	36 hrs	42 hrs	48 hrs	54 hrs
0 µg/ml	0.0310	0.0297	0.0289	0.0358	0.0307	0.0211	0.0191	0.1596	0.4070
40 µg/ml	0.0332	0.0198	0.0659	0.0166	0.0490	0.0261	0.0790	0.0123	0.0117
80 µg/ml	0.0305	0.0711	0.0352	0.0405	0.0325	0.0320	0.0514	0.0017	0.0340
120 µg/ml	0.0567	0.0021	0.0306	0.0428	0.0475	0.0367	0.0185	0.0216	0.0380
160 µg/ml	0.0255	0.0467	0.0434	0.0146	0.0545	0.0604	0.0771	0.0505	0.0511
200 µg/ml	0.0127	0.0136	0.0035	0.0194	0.0282	0.0076	0.0100	0.1029	0.1134

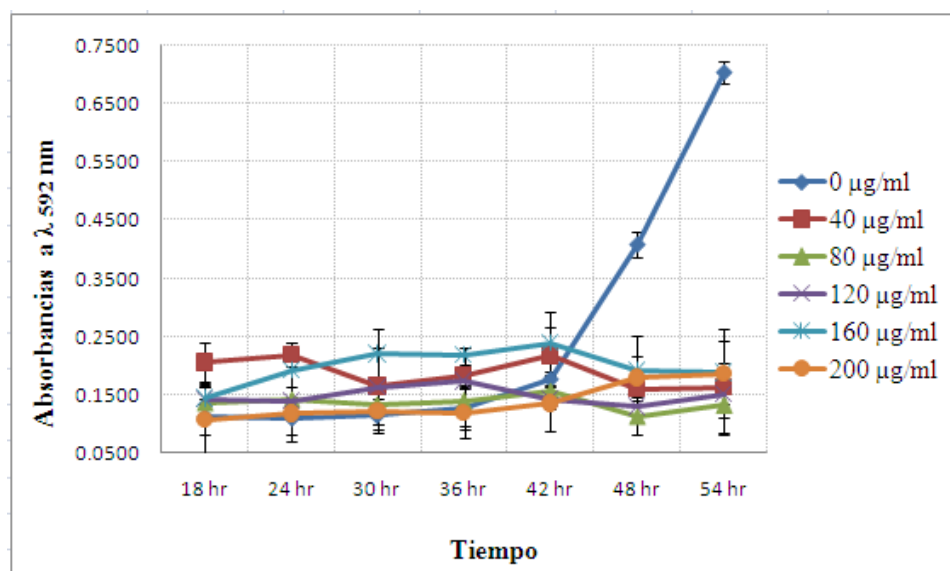


Figura 18.- Cinética de crecimiento de *S. cepivorum* en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada por cromatografía de afinidad. *S. cepivorum* se incubó en caldo de papa-dextrosa al que se le incorporaron diferentes concentraciones de cistatina. Se determinó el crecimiento midiendo la absorbancia a 592 nm cada 6 hrs durante 54 h. Como control se incluyó un cultivo del mismo hongo sin cistatina.

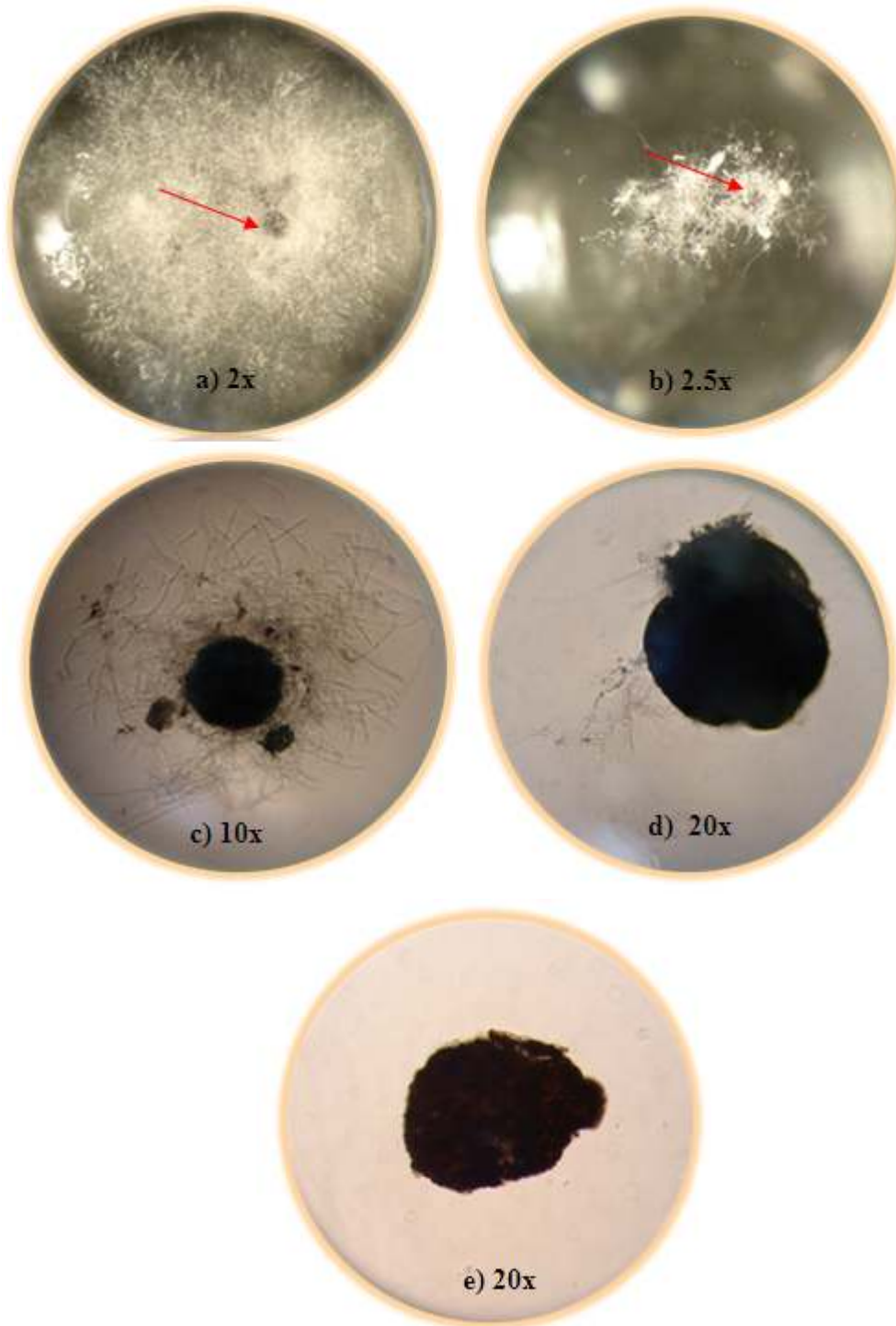


Figura 19.- Microfotografías de la morfología micelial y de los esclerocios de *S. cepivorum* crecido en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada. Fotos tomadas a las 72 h de incubación con: a) 0 µg/ml, b) 40, c) 80, d) 120, e) 160 µg/ml de cistatina recombinante *AhCPI*. Las imágenes se obtuvieron en microscopio de luz blanca, en cada caso se indica el aumento utilizado.

Cuadro 17.- Lecturas de Absorbancia de cultivos de *R. solani* crecidos en presencia de cistatina recombinante *AhCPI* purificada. Las lecturas se realizaron a 592 nm, cada 6 h durante 48 h. Los valores registrados representan la media de tres repeticiones.

Lecturas de Absorbancia								
<i>AhCPI</i>	0 hrs	12 hrs	18 hrs	24 hrs	30 hrs	36 hrs	42 hrs	48 hrs
0 µg/ml	0.4540	0.3210	0.7337	0.9700	1.1187	1.2333	1.2877	1.3867
40 µg/ml	0.1163	0.1093	0.1313	0.1677	0.1813	0.2100	0.2720	0.4247
80 µg/ml	0.1093	0.0950	0.0970	0.1160	0.1330	0.1377	0.1523	0.2307
120 µg/ml	0.5685	0.3550	0.4300	0.6620	0.3817	0.5473	0.5970	0.6590
160 µg/ml	0.5835	0.1102	0.1797	0.2990	0.2453	0.1357	0.1147	0.1413
200 µg/ml	0.5450	0.5025	0.3087	0.2627	0.3043	0.5977	0.6697	0.5407
240 µg/ml	0.3253	0.1373	0.1163	0.1040	0.1017	0.1053	0.1117	0.1070
Desviaciones Estándar								
<i>AhCPI</i>	0 hrs	12 hrs	18 hrs	24 hrs	30 hrs	36 hrs	42 hrs	48 hrs
0 µg/ml	0.2305	0.2001	0.4678	0.4879	0.4614	0.4640	0.4308	0.3928
40 µg/ml	0.0232	0.0197	0.0067	0.0072	0.0130	0.0218	0.0223	0.0263
80 µg/ml	0.0101	0.0052	0.0060	0.0040	0.0096	0.0090	0.0222	0.0332
120 µg/ml	0.0318	0.0071	0.2393	0.1109	0.1010	0.0485	0.0904	0.1801
160 µg/ml	0.0813	0.1134	0.1458	0.1216	0.2379	0.0704	0.0341	0.0476
200 µg/ml	0.3012	0.1831	0.2814	0.2373	0.2735	0.6827	0.6984	0.4001
240 µg/ml	0.3851	0.0638	0.0318	0.0070	0.0025	0.0045	0.0115	0.0017

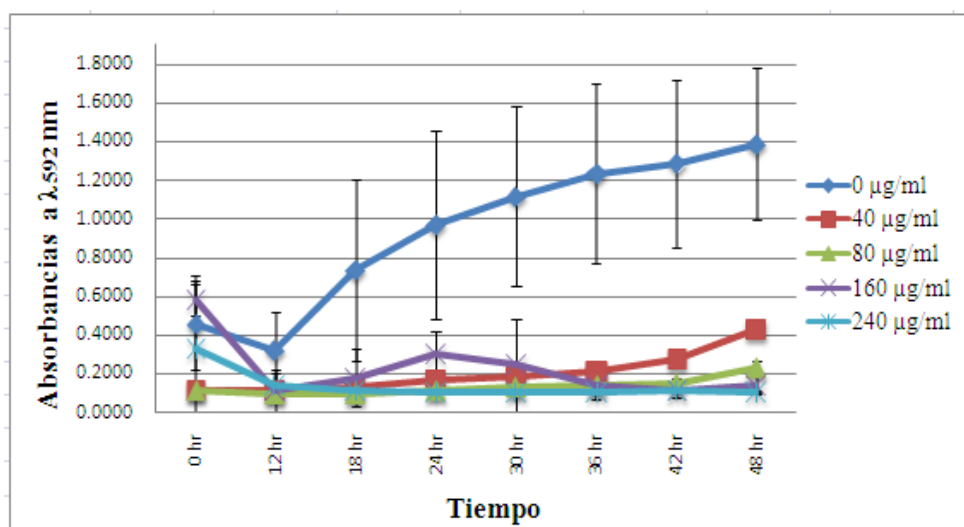


Figura 20.- Cinética de crecimiento de *R. solani* en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada. *R. solani* se incubó en caldo de papa-dextrosa al que se le incorporaron diferentes concentraciones cistatina. Se determinó el crecimiento midiendo la absorbancia a 592 nm, cada 6h durante 48 h. Como control se incluyó un cultivo de con el mismo hongo sin cistatina.

Cuadro 18.- Porcentaje de crecimiento de *R. solani* en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada. La absorbancia de los cultivos de *R. solani* en ausencia de cistatina, a los diferentes tiempos de incubación representó el 100% de crecimiento. Los valores registrados representan la media de tres repeticiones.

Promedios de lecturas (%)								
AhCPI	0 hrs	12 hrs	18 hrs	24 hrs	30 hrs	36 hrs	42 hrs	48 hrs
0 µg/ml	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
40 µg/ml	60.31	43.10	27.61	23.74	19.07	19.57	23.53	32.94
80 µg/ml	57.46	36.44	19.93	16.35	14.08	12.71	13.39	18.25
120 µg/ml	261.43	116.74	105.33	87.52	36.28	50.83	52.50	53.55
160 µg/ml	263.60	32.79	26.59	20.19	20.09	11.05	9.24	10.28
200 µg/ml	104.76	107.38	94.89	47.35	40.67	71.74	71.45	47.40
240 µg/ml	91.09	45.71	22.44	14.32	10.43	9.66	9.30	8.18
Desviaciones Estándar								
AhCPI	0 hrs	12 hrs	18 hrs	24 hrs	30 hrs	36 hrs	42 hrs	48 hrs
0 µg/ml	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
40 µg/ml	49.83	22.06	24.24	12.65	10.76	10.52	10.92	12.28
80 µg/ml	50.08	16.54	16.46	8.48	8.11	6.34	7.10	8.59
120 µg/ml	311.24	104.12	128.24	25.36	8.46	26.12	27.83	32.37
160 µg/ml	294.73	43.18	12.88	19.85	12.76	3.19	2.35	1.96
200 µg/ml	137.51	103.82	134.81	60.14	51.81	98.95	92.91	48.67
240 µg/ml	47.23	8.49	15.53	6.28	4.95	4.56	2.96	2.49

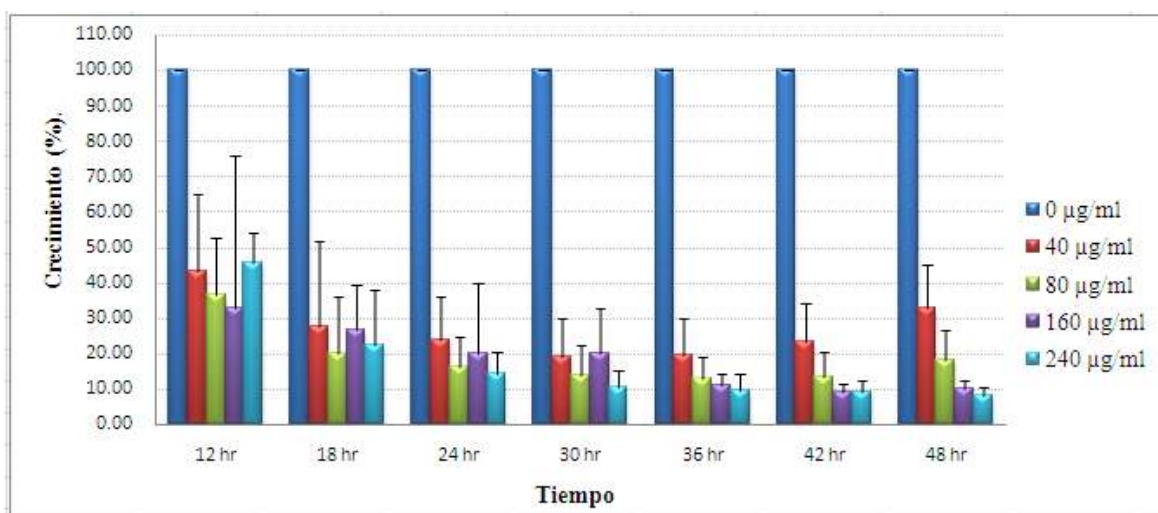


Figura 21.- Efecto de la cistatina recombinante purificada sobre el crecimiento de *R. solani*. A un cultivo de *R. solani* crecidos en medio liquido adicionado con diferentes concentraciones de purificada, se les monitorio el crecimiento midiendo la absorbancia a 592 nm cada 6 h durante 48 horas. Como control se utilizo un cultivo del mismo hongo sin cistatina.

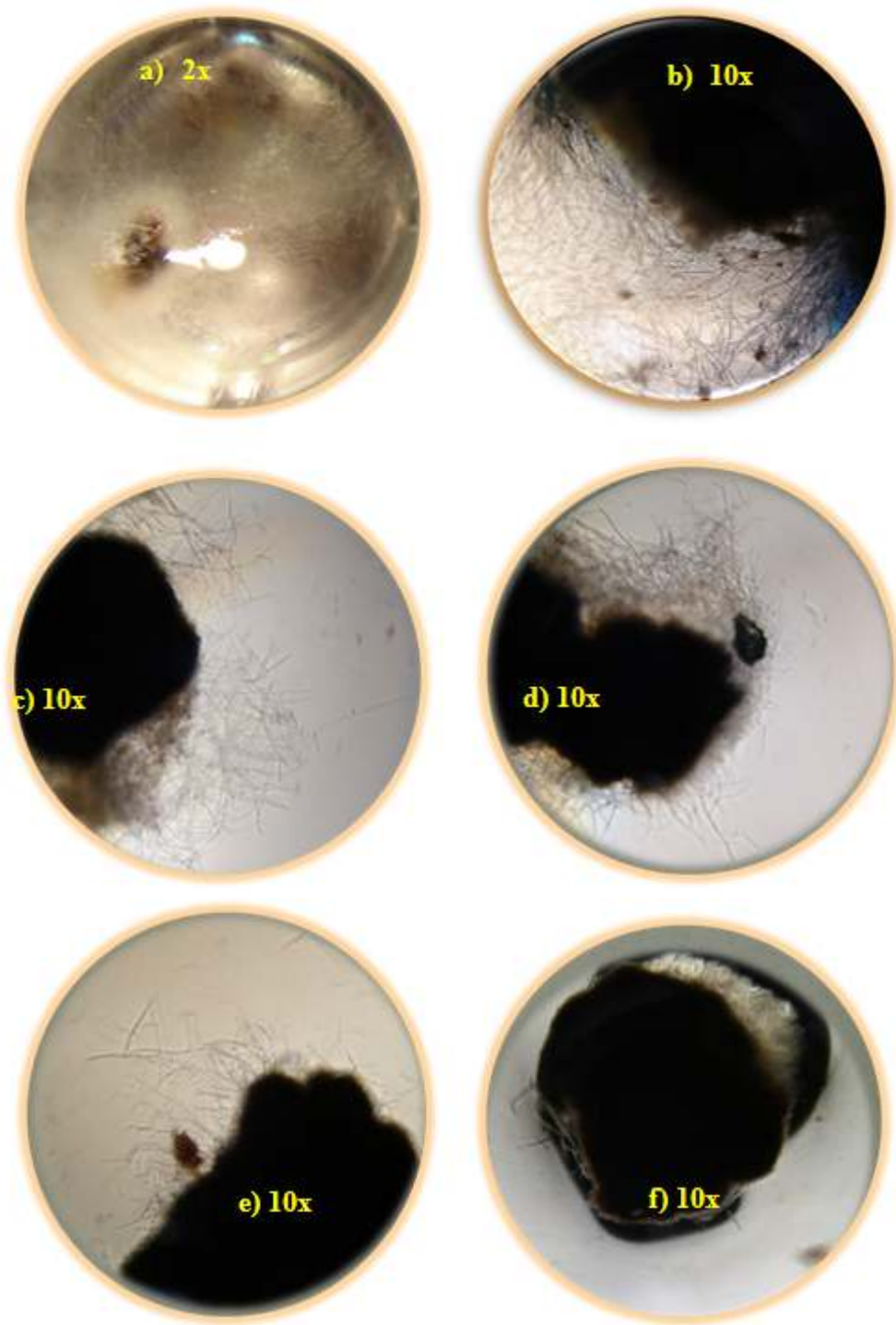


Figura 22.- Microfotografías de la morfología micelial y de los esclerocios de *R. solani* crecido en presencia de diferentes concentraciones de cistatina purificada. Fotos tomadas a las 48 h de incubación con (a-b) 0 $\mu\text{g/ml}$, c) 120, d) 160, e) 200 y f) 240 $\mu\text{g/ml}$ de cistatina recombinante *AhCPI*. Las imágenes se obtuvieron en microscopio de luz blanca, en cada caso se indica el aumento utilizado.

DISCUSIÓN

En trabajos anteriores se determinó la presencia de una cistatina en semillas de amaranto la cual posee la característica de inhibir cisteín proteinasas. De esta cistatina se aisló el cDNA y se clonó en el vector pQE-2, para su expresión en *Escherichia coli* para poder caracterizar la cistatina recombinante (Valdés *et al.*, 2007). Una vez establecidas las condiciones óptimas de expresión y purificación de esta cistatina, en el presente trabajo se planteó caracterizarla en función de su capacidad de inhibir la actividad de cisteín proteinasas; así como de evaluar su efecto contra hongos fitopatógenos.

Dentro de los primeros ensayos actividad proteolítica, se determino las concentraciones activas de cisteín proteinasas comerciales de origen vegetal existentes en el laboratorio a través de la titulación de su sitio activo con el inhibidor E-64. Esto es una práctica común que se realiza en el laboratorio debido a que las enzimas pueden perder actividad por diversos factores (tiempo de almacenaje, temperatura, etc.). Por medio de estas pruebas se determinaron las concentraciones reales de enzima utilizadas en los ensayos de cada cisteín proteinasas evaluada (papaína, ficína y bromelaína) de origen vegetal.

En base a los resultados obtenidos se pudo comprobar que la cistatina *AhCPI* recombinante de amaranto recuperada de cultivos de *E. coli.*, mantuvo su integridad funcional, ya que fue capaz de inhibir fuertemente a la papaína, en menor grado a la ficína, y no mostró ningún efecto contra la bromelaína. La inhibición de la actividad proteolítica de la papaína producida por cistatinas recombinantes, se ha documentado ampliamente en Taro (Yang *et al.*, 2005); cebada (Martínez *et al.*, 2003); pasto (Yoza *et al.*, 2002); ciruela (Wen *et al.*, 2004) y fresa (Martínez *et al.*, 2005). Sin embargo, poco se ha documentado el efecto contra cisteín proteasas del tipo ficína y bromelaína. En trabajos recientes se reportó una cistatina recombinante de cebada que fue capaz de inhibir ficína y bromelaína; (Martínez *et al.*, 2003). En n general se ha visto que las cistatinas inhiben fuertemente a la papaína, y muestran un menor efecto contra ficína y/o bromelaína, tal como se pudo corroborar en el presente trabajo.

En estudios preliminares se evaluó el efecto antifúngico de la cistatina recombinante *AhCPI*, presente en lisados celulares de *E. coli*, sobre el crecimiento en medio PDA de los hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium sp*, *Alternaria alternata*, *Glomerella cingulata*. En estos ensayos utilizando hasta 1 mg de proteína recombinante no se observó ningún efecto sobre el crecimiento micelial de los hongos. Por lo cual, se diseñó un bioensayo en medio líquido PDB en el que se controló la cantidad de inóculo del hongo a utilizar, probando solamente el efecto contra *F. oxysporum*, *S. cepivorum* y *R. solani*.

Los ensayos realizados en este sistema con el lisado celular fueron confusos, debido a que hubo concentraciones de lisado que produjeron una inhibición en la germinación y crecimiento micelial de las especies de hongos probadas. Sin embargo, con algunas concentraciones se observó cierta estimulación del crecimiento de estos hongos, lo cual quizá se debió a que los hongos fueron capaces de utilizar algunas de las proteínas presentes en el lisado *E. coli*. La efectividad del lisado para inhibir el crecimiento de los hongos fue diferente. Si bien en *F. oxysporum* no se observó efecto inhibitorio, en *S. cepivorum* se logró inhibir la germinación de esclerocios con concentraciones de 400 µg/ml de proteína; mientras que con concentraciones de 2000 µg/ml se logró un efecto similar en *R. solani*.

Una vez corroborado el efecto de lisado celular se evaluó el efecto de la cistatina recombinante purificada, sobre el crecimiento de estos hongos. A diferencia del lisado, la cistatina purificada inhibió la germinación de conidias y crecimiento de micelio de *F. oxysporum*. Una concentración de 8.57 µM de cistatina *AhCPI* purificada inhibió el 50% de crecimiento con respecto al control. Esto es más o menos similar con los resultados obtenidos por Martínez *et al.*, (2005) quienes señalan que con 2.28 µM de cistatina de fresa FaCPI-1 se logró inhibir el 50% de crecimiento de *F. oxysporum*. En el caso de la cistatina de taro se reportó que una concentración de 10µM inhibe débilmente el crecimiento de esta especie (Yang *et al* 2005).

Comparado con *F. oxysporum*, la cistatina recombinante de amaranto presentó un efecto tóxico más fuerte sobre el crecimiento del micelio y germinación de esclerocios de *S. cepivorum* y *R. solani*. En el caso de estas especies 40 (1.42 μM) y 80 (2.84 μM) $\mu\text{g/ml}$ de la cistatina de amaranto inhibieron casi totalmente su crecimiento, respectivamente. En cambio concentraciones similares de 80(3.6 μM) $\mu\text{g/ml}$ de la cistatina de taro inhibieron débilmente el crecimiento de micelio de *S. rolfsii* y *R. solani*. (Yang *et al* 2005).

Las observaciones microscópicas nos permiten corroborar las concentraciones de cistatina que causaron un efecto sobre los hongos evaluados, muestran un claro efecto en la inhibición en germinación de esporas (Fig. 17 d, f) y cuerpos fructíferos (Fig. 19e, 22f), alteraciones morfológicas en la longitud y ramificación de hifas (Fig. 17 c, d), (Fig. 19 c, d) y (Fig. 22 d, e).

Las cistatinas de cebada, fresa, taro, castaña y caña de azúcar muestran actividad antifúngica (Martínez *et al.*, 2003, 2005; Yang *et al.*, 2005; Soares-Costa *et al.*, 2002). Sin embargo se desconoce el mecanismo de acción contra hongos. Anteriormente se suponía que este efecto podía deberse a la inhibición de las enzimas proteolíticas, lo cual reducía la disponibilidad de nutrientes. Sin embargo en trabajos más recientes se ha comprobado que el efecto antifúngico no está mediado por la inhibición de enzimas ya algunos hongos carecen de cisteín proteinasas (Martínez *et al.*, 2003) o si las presentan no siempre son inhibidas por las cistatinas. En este sentido aún se requieren realizar estudios para determinar el mecanismo de acción de las cistatinas contra hongos. Y así reforzar el papel de estas proteínas en la defensa vegetal, y confirmar su potencial biotecnológico para la obtención de plantas resistentes a organismos fitopatógenos.

CONCLUSIONES

Durante el desarrollo del presente proyecto se logró:

- ✓ Se estandarizo las condiciones para determinar las concentraciones de enzimas activas en las preparaciones comerciales de papaína y ficína, existentes en el laboratorio, lo cual a futuro permitirá realizar los ensayos correspondientes para caracterizar cinéticamente a la cistatina recombinante.
- ✓ Se determino que la cistatina recombinante producida en *Escherichia coli.*, se obtiene activa, siendo capaz de inhibir fuertemente la actividad proteolítica de la papaína y en menor grado la de ficína.
- ✓ Se demostró que la cistatina recombinante presenta actividad antifúngica frente a los hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum* y *Rhizoctonia solani*.

LITERATURA CITADA

Agrios George N. (2002) Plant Pathology. Third Edition. Academic Press. San Diego, California. pp: 803.

- Aguilar Hernández Víctor Manuel. (2006)** Optimización de las condiciones de expresión de una cistatina de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) en *Escherichia coli*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Morelia. Morelia, Michoacán.
- Aguilar de la Sota Brenda Sofía. (2007)** Subclonación del gen de la cistatina de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) en el vector de expresión TAGZyme pQE-2, para su expresión en *Escherichia coli*. Instituto Tecnológico de Celaya., Celaya, Guanajuato.
- Alvarez-Alfageme F, Martínez M, Pascual-Ruiz S. (2006).** Effects of potato plants expressing a barley cystatin on the predatory bug *Podisus maculiventris* via herbivorous prey feeding on the plant. Transgenic Research (en prensa).
- Barrett Alan J. Asha A. Kembhavi, Molly A. Brown, Heidrun Kirschke, C. Graham Knight, Masaharu Tamai and Kazunori Hanada. (1982)** L-trans-Expoxysuccinyl-Leucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. Biochem. J. 201, 189-198.
- Belenghi B, Acconcia F, Trovato M. (2003).** AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana* , suppresses hypersensitive cell death. European Journal of Biochemistry, 270: 2593-2604.
- Beynon R. J. and J. S. Bond. (1984)** Proteolytic enzymes: a practical approach. Oxford University Pres. Reimpred (with corrections), England.
- Blanco Labra Alejandro y César Aguirre Mancilla. (2002)** Proteínas involucradas en los mecanismos de las plantas. Acta Universitaria, septiembre-diciembre, Vol. 12, No. 003. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México.
- Bouchard E, Cloutier C, Michaud D. (2003).** Oryzacystatin I expressed in transgenic potato induces digestive compensation in an insect natural predator via its herbivorous prey feeding on the plant. Molecular Ecology, 12: 2439-2446.
- Bouchard E, Michaud D, Cloutier C. (2003).** Molecular interaction between an insect predator and its herbivore prey on transgenic potato expressing a cysteine proteinase inhibitor from rice. Molecular Ecology, 12: 2429-2437.

- Bradford Marion M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. Vol. 72: 248-254.
- Delledonne M, Allegro G, Belenghi B. (2001).** Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance. *Molecular Breeding*, 7: 35-42.
- Díaz Isabel y Manuel Martínez.** Fitocistatinas: Función Biológica y Aplicaciones Biotecnológicas. *Biojournal. Net*. No.5., Página web: www.biojournal.net/pdf/27.pdf.
- FAN Shu-Guo and Guo-Jiang WU. (2005).** Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, Vol. 46: 173-292.
- Förster Helga, Loukas Kanetis, and James E. Adaskaveg.** Spiral Gradient Dilution, a Rapid Method for Determining Growth Responses and 50% Effective Concentration Values in Fungus-Fungicide Interactions. *The American Phytopathological Society*. Vol. 94, No. 2,(2004). 163-170.
- Garcia Carreño Fernando Luis. (1996)** Proteinase inhibitors. *Trends in Food Science and Technology*. Vol. 7: 197-204.
- Gholizadeh A, Santa IM, Kohnchrouz B. (2005).** Cystatin may confer viral resistance in plants by inhibition of a virus-induced cell death phenomenon in which cysteine proteases are active: cloning and molecular characterization of a cDNA encoding cysteine proteinase inhibitor (celostatin) from *Celosia cristata* (crested cock's comb). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42: 197-204.
- Gutierrez-Campos, R., Torres-Costa, J.A., Saucedo-Arias, L.J., and Gómez-Lim, MA. (1999).** The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature Biotechnology*. 17: 1223-1226.

- Irie K, Hosoyama H, Takecuchi T. (1996).** Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteinases. *Plant Molecular Biology*, 30: 149-157.
- Joshi Bimba N. Mohini N. Sainani, Kulbhushan B. Bastawade. (1998).** Cysteine Protease inhibitor from Pearl Millet: A new class of antifungal protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 246, 382-387.
- Kotyza, J., and Krepela, E. (2000).** Proteases and antiproteases in health and disease-a review “cysteine protease and their natural inhibitors”. *Journal of Medical Review* 34:1623-1645.
- Lawrence, P., and Koundal, K.R. (2002).** Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *European Journal of Biochemistry* 269: 782-790.
- Martínez Manuel, Zamira Abraham, Mariana Gambardella, Mercedes Echaide, Pilar Carbonero and Isabel Díaz. (2005).** The strawberry gene *Cyfl* encodes a phytocystatin with antifungal properties. *Journal of Experimental Botany*. pp 1-9.
- Martínez M., E. López-Solanilla, P. Rodríguez-Palenzuela, P. Carbonero, and I. Díaz. (2003).** Inhibition of Plant-Pathogenic Fungi by the Barley Cystatin Hv-CPI (Gene *Icy*) is not Associated with its Cysteine-Proteinase inhibition properties. *The American Phytopathological Society*. Vol. 16, No. 10, pp. 876-883.
- Martínez Ocegüera José María, Rafael Gutiérrez Campos, Ernesto García Pineda.** Transformación de plantas de tomate verde (*Physalis ixocarpa* Brot. var. Rendidora) con el gen OC-I (Orizacistatina I). *Revista Mexicana de Fitopatología*, enero-junio, 2006/Vol. 24, No. 1., pp. 13-19.
- Pernas Mónica, Emilia López-Solanilla, Rosa Sánchez-Monge, Gabriel Salcedo, and Pablo Rodríguez-Palenzuela. (1999).** Antifungal Activity of a plant Cystatin. *The American Phytopathological Society*. Vol. 12, No. 7, pp. 624-627.

- Pernas Mónica, Rosa Sánchez Monge, Gabriel Salcedo. (2000).** Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. Federation of European Biochemical Societies (FEBS). 467, 206-210.
- Romero Cova Sebastián. (1993).** Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Primera reimpresión en español. Texcoco, Edo. Méx. México.
- Samac DA, Smigocki AC. 2003.** Expression of oryzacystatin I and II in alfalfa increases resistance to the root-lesion nematode. Nematology, 93: 799-804.
- Serveau, C., Juliano, L., Bernard, P., Moreau, T., Mayer, R., and Gauthier, F. (1994).** New substrates of papain, based on the conserved sequence of natural inhibitors of the cystatin family. Biochimie 76: 153-158.
- Soares-Costa A., L. M. Beltramini, O. H. Thiemann, and F. Henrique-Silva. (2002).** A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. BBRC 296, 1194-1199.
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M. (1999).** The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. The Plant Cell, 11: 431-443.
- Song I, Taylor M, Baker K. (1995).** Inhibition of cysteine proteinases by *Carica papaya* cystatin produced in *Escherichia coli*. Gene, 162: 221-224.
- Urwin PE, Green J, Atkinson HJ. (2003).** Expression of a plant cystatin confers partial resistance to *Globodera*, full resistance is achieved by pyramiding a cystatin with natural resistance. Molecular Breeding, 12: 263-269.
- Valueva T. A., and V. V. Mosolov. (2004).** Role of Inhibitors Enzymes in Plant Defense against Phytopathogenic Microorganisms. Biochemistry (Moscow), Vol. 69, No. 11, pp. 1305-1309.
- Valdés Rodríguez Silvia, Armando Guerrero Rangel, Claudia Melgoza Villagómez, Alicia Chagolla López, Francisco Delgado Vargas, Norma Martínez Gallardo, Carla Sánchez Hernández y John Délano Frier. (2007).** Cloning of a cDNA

encoding a cystatin from grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) showing a tissue-specific expression that is modified by germination and abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 190-798.

Vivanco Jorge M., Eric Cosio, Victor M. Loyala-Vargas y Héctor E. Flores. Mecanismos químicos de defensa de las plantas. Investigación y Ciencia, Prensa Científica. Febrero, 2005.

Wen Rui, Shuo Cheng Zhang, Dominique Michaud, Hélène Sanfaçon. (2004). Inhibitory effects of cystatins on proteolytic activities of the Plum pox potyvirus cysteine proteinases. *Virus Research* 105, 175-182.

Yoza Koh-Ichi, Sumiko Nakamura, Miki Yaguchi, Kazutomo Haraguchi and Ken-Ichi Ohtsubo. (2002). Molecular Cloning and Functional Expresión of cDNA Encoding a Cysteine Proteinase Inhibitor, Cystatin, from Job's Tears. (*Coix lacrymajobi* L. var. *Ma-yuen* Stapf). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (10), 2287-2291.

Yang A.H. and K. W. Yeh. (2005). Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosium no. 1). *Planta*. 221: 493-501.

ANEXOS

ACTIVIDAD INHIBITORIA DE CISTATINA *AhCPI* PURIFICADA SOBRE CISTEIN-PROTEASAS.

Cuadro 19.- Promedios de lecturas de actividad proteolítica residual de papaína. Ante concentraciones de cistatina *AhCPI* purificada.

<i>AhCPI</i> µg/µl	R1	R2	R3	\bar{X} *Abs.	SD
0.00	0.0284	0.03	0.029	0.0291	0.0008
1.45	0.0286	0.0281	0.0283	0.0283	0.0003
2.90	0.0177	0.0178	0.018	0.0178	0.0002
4.35	0.0124	0.0123	0.0126	0.0124	0.0002
5.80	0.0079	0.0073	0.0068	0.0073	0.0006
7.25	0.0036	0.0039	0.003	0.0035	0.0005
8.70	0.0026	0.0026	0.0016	0.0023	0.0006
10.15	0.0014	0.0009	0.0007	0.0010	0.0004
11.60	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0004
13.05	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0002
14.50	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0001

*Absorbancia a una longitud de onda de 410 nm.. R= Repeticiones de lecturas de absorbancias.

Cuadro 20.- Promedios de lecturas de actividad (%) de papaína. Actividad proteolítica ante la cistatina *AhCPI* purificada (Cuadro 19).

% de Actividad				
R1	R2	R3	\bar{X} %A	DE
100.00	100.00	100.00	100	0.0000
100.70	93.67	97.59	97	3.5264
62.32	59.33	62.07	61	1.6579
43.66	41.00	43.45	43	1.4791
27.82	24.33	23.45	25	2.3095
12.68	13.00	10.34	12	1.4485
9.15	8.67	5.52	8	1.9744
4.93	3.00	2.41	3	1.3163
0.0	0.0	0.0	0.0	1.2718
0.0	0.0	0.0	0.0	0.8357
0.0	0.0	0.0	0.0	6.4511

R= Repetición, %A= Porcentaje de actividad, DE= Desviación estándar

Cuadro 21.- Promedios de lecturas de inhibición de papaína (%). Inhibición de actividad proteolítica por la cistatina *AhCPI* purificada (Cuadro 19).

% de Inhibición

R1	R2	R3	\bar{X} %I.	DE
0.0	0.0	0.0	0	0.0000
0.0	6.33	2.41	3	3.5264
37.68	40.67	37.93	39	1.6579
56.34	59.00	56.55	57	1.4791
72.18	75.67	76.55	75	2.3095
87.32	87.00	89.66	88	1.4485
90.85	91.33	94.48	92	1.9744
95.07	97.00	97.59	97	1.3163
104.23	106.67	104.83	105	1.2718
106.34	104.67	105.52	106	0.8357
111.62	110.67	100.00	107	6.4511

R= Repetición, %I= Porcentaje de inhibición, DE= Desviación estándar

Cuadro 22.- Promedios de lecturas de actividad proteolítica residual de ficina. Ante concentraciones de cistatina *AhCPI* purificada.

<i>AhCPI</i> $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	R1	R2	R3	\bar{X} *Abs.	DE
0	0.0261	0.0269	0.027	0.0267	0.0005
2.9	0.0259	0.0262	0.0267	0.0263	0.0004
5.8	0.0244	0.0248	0.0245	0.0246	0.0002
8.7	0.022	0.0228	0.0211	0.0220	0.0009
11.6	0.0199	0.0198	0.0186	0.0194	0.0007
14.5	0.0168	0.0165	0.0171	0.0168	0.0003
17.4	0.0147	0.0149	0.0141	0.0146	0.0004
20.3	0.0123	0.0122	0.013	0.0125	0.0004
23.2	0.0104	0.0106	0.0102	0.0104	0.0002
26.1	0.0078	0.009	0.009	0.0086	0.0007
29	0.0076	0.0067	0.0076	0.0073	0.0005

*Absorbancia a una longitud de onda de 410 nm.. R= Repeticiones de lecturas de absorbancias.

Cuadro 23.- Promedios de lecturas de actividad (%) de ficina. Actividad proteolítica ante la cistatina *AhCPI* purificada (Cuadro 22).

% de Actividad

R1	R2	R3	\bar{X}	SD
98	101	101	100	1.8475
97	98	100	98	1.5137
91	93	92	92	0.7797
82	85	79	82	3.1854
75	74	70	73	2.7094
63	62	64	63	1.1236
55	56	53	55	1.5593
46	46	49	47	1.6325
39	40	38	39	0.7491
29	34	34	32	2.5948
28	25	28	27	1.9461

R= Repetición, %A= Porcentaje de actividad, DE= Desviación estándar

Cuadro 24.- Promedios de lecturas de inhibición (%) de ficina. Inhibición de actividad proteolítica por la cistatina *AhCPI* purificada (Cuadro 22).

% de Inhibición				
R1	R2	R3	\bar{X} %I	DE
2.25	-0.75	-1.12	0	1.8475
3.00	1.87	0.00	2	1.5137
8.61	7.12	8.24	8	0.7797
17.60	14.61	20.97	18	3.1854
25.47	25.84	30.34	27	2.7094
37.08	38.20	35.96	37	1.1236
44.94	44.19	47.19	45	1.5593
53.93	54.31	51.31	53	1.6325
61.05	60.30	61.80	61	0.7491
70.79	66.29	66.29	68	2.5948
71.54	74.91	71.54	73	1.9461

R= Repetición, %I= Porcentaje de inhibición, DE= Desviación estándar

Cuadro 25.- Promedios de lecturas de actividad proteolítica residual de bromelaina. Ante concentraciones de cistatina *AhCPI* purificada.

<i>AhCPI</i> µg/µl	R1	R2	R3	\bar{X} *Abs.	SD
0	0.0317	0.03112	0.0321	0.0316	0.0005
2.04	0.0322	0.0317	0.0315	0.0318	0.0004
4.08	0.0311	0.0313	0.0338	0.0321	0.0015
6.12	0.0329	0.0332	0.0326	0.0329	0.0003
8.16	0.0332	0.0359	0.0327	0.0339	0.0017
10.2	0.0349	0.0379	0.033	0.0353	0.0025
12.24	0.038	0.0377	0.0357	0.0371	0.0013
14.28	0.0347	0.0352	0.0334	0.0344	0.0009
16.32	0.0355	0.0356	0.0338	0.0350	0.0010
18.36	0.0338	0.0337	0.0	0.0338	0.0001
20.4	0.0353	0.0351	0.0	0.0352	0.0001
22.44	0.0376	0.0347	0.0	0.0362	0.0021

*Absorbancia a una longitud de onda de 410 nm.. R= Repeticiones de lecturas de absorbancias.

Cuadro 26.- Promedios de lecturas de actividad (%) de ficina. Actividad proteolítica ante la cistatina *AhCPI* purificada (Cuadro 25).

% de Actividad				
R1	R2	R3	\bar{X} %A	DE
119	117	120	119	1.8455
121	119	118	119	1.3504
116	117	127	120	5.6346
123	124	122	123	1.1236
124	134	122	127	6.4473
131	142	124	132	9.2528
142	141	134	139	4.6829
130	132	125	129	3.4800
133	133	127	131	3.7888
127	126	0	84	72.9799
132	131	0	88	76.1160
141	130	0	90	78.3578

R= Repetición, %A= Porcentaje de actividad, DE= Desviación estándar

Cuadro 27.- Promedios de lecturas de inhibición (%) de ficina. Inhibición de actividad proteolítica por la cistatina *AhCPI* purificada (Cuadro 22).

% de Inhibición	
-----------------	--

R1	R2	R3	\bar{X} %I	SD
-18.73	-16.55	-20.22	-19	1.8455
-20.60	-18.73	-17.98	-19	1.3504
-16.48	-17.23	-26.59	-20	5.6346
-23.22	-24.34	-22.10	-23	1.1236
-24.34	-34.46	-22.47	-27	6.4473
-30.71	-41.95	-23.60	-32	9.2528
-42.32	-41.20	-33.71	-39	4.6829
-29.96	-31.84	-25.09	-29	3.4800
-32.96	-33.33	-26.59	-31	3.7888
-26.59	-26.22	100.00	16	72.9799
-32.21	-31.46	100.00	12	76.1160
-40.82	-29.96	100.00	10	78.3578

R= Repetición, %A= Porcentaje de actividad, DE= Desviación estándar

TITULACIÓN DE SITIO ACTIVO DE CISTEIN-PROTEASA EN BASE AL INHIBIDOR E-64.

Cuadro 28.- Lecturas de absorbancias de actividad proteolítica de papaína ante E-64. Lecturas a una λ de 410 nm.

[E-64 μ M]	R1	R2	R3	\bar{X} Abs.	DS
0	0.3088	0.3172	0.3002	0.3087	0.0085
0.04	0.2488	0.245	0.2551	0.2496	0.0051
0.08	0.2058	0.2064	0.2051	0.2058	0.0007
0.12	0.1627	0.1772	0.1636	0.1678	0.0081
0.16	0.1424	0.1313	0.1298	0.1345	0.0069
0.2	0.0718	0.077	0.0725	0.0738	0.0028
0.24	0.0119	0.0048	0.006	0.0076	0.0038
0.28	0.0357	0.0203	0.0057	0.0206	0.0150
0.32	0.0061	0.0095	0.0088	0.0081	0.0018
0.36	0.0578	0.0088	0.0112	0.0259	0.0276
0.4	0.0082	0.0016	0.0016	0.0038	0.0038

R= Repetición, Abs= Absorbancias, DE= Desviación estándar

Cuadro 29.- Unidades de Actividad de papaína ante E-64. Actividad proteolítica en base a concentraciones μ M de E-64 (Cuadro 28).

Unidades de Actividad				
R1	R2	R3	\bar{X} UA	SD

30.88	31.72	30.02	31	0.8500
24.88	24.50	25.51	25	0.5101
20.58	20.64	20.51	21	0.0651
16.27	17.72	16.36	17	0.8124
14.24	13.13	12.98	13	0.6883
7.18	7.70	7.25	7	0.2822
1.19	0.48	0.60	1	0.3800
3.57	2.03	0.57	2	1.5002
0.61	0.95	0.88	1	0.1795
5.78	0.88	1.12	3	2.7623
0.82	0.16	0.16	0	0.3811

R= Repetición, Abs= Absorbancias, DE= Desviación estándar

Cuadro 30.- Lecturas de absorbancias de actividad proteolítica de ficína ante E-64. Lecturas a una λ de 410 nm.

[E-64 μ M]	R1	R2	R3	\bar{X} Abs.	SD
0	0.3057	0.3139	0.2906	0.3034	0.0118
0.02	0.258	0.2722	0.2739	0.2680	0.0087
0.04	0.2512	0.2508	0.2539	0.2520	0.0017
0.06	0.1946	0.2086	0.2097	0.2043	0.0084
0.08	0.1561	0.157	0.159	0.1574	0.0015
0.1	0.1191	0.1142	0.1133	0.1155	0.0031
0.12	0.0798	0.074	0.0732	0.0757	0.0036
0.14	0.051	0.0438	0.0445	0.0464	0.0040
0.16	0.0219	0.0175	0.0142	0.0179	0.0039
0.18	0.0091	0.0059	0.0063	0.0071	0.0017
0.2	0.0055	0.0056	0.0064	0.0058	0.0005

R= Repetición, Abs= Absorbancias, DE= Desviación estándar

Cuadro 31.- Unidades de Actividad de ficína ante E-64. Actividad proteolítica en base a concentraciones μ M de E-64 (Cuadro 30).

Unidades de Actividad				
R1	R2	R3	\bar{X}	SD

30.57	31.39	29.06	30	1.1819
25.80	27.22	27.39	27	0.8731
25.12	25.08	25.39	25	0.1686
19.46	20.86	20.97	20	0.8418
15.61	15.70	15.90	16	0.1484
11.91	11.42	11.33	12	0.3121
7.98	7.40	7.32	8	0.3602
5.10	4.38	4.45	5	0.3970
2.19	1.75	1.42	2	0.3863
0.91	0.59	0.63	1	0.1744
0.55	0.56	0.64	1	0.0493

R= Repetición, Abs= Absorbancias, DE= Desviación estándar

ENSAYOS DE INHIBICIÓN SOBRE PLACAS DE ELISA UTILIZANDO LA CISTATINA *AhCPI* PURIFICADA

Cuadro 33.- Lecturas de Absorbancia a λ 592 nm y de crecimiento (%) de *Fusarium oxysporum*. En presencia de diferentes concentraciones de cistatina recombinante *AhCPI* purificada.

Lecturas de absorbancia a las 0 hr						Lecturas % de crecimiento a las 0 hr				
<i>AhCPI</i>	R1	R2	R3	Promedio	SD	R1	R2	R3	Promedio	SD %
0 μg/ml	0.105	0.111	0.112	0.1093	0.00379	100.00	100.00	100.00	100	1E-14
120 μg/ml	0.114	0.126	0.114	0.1180	0.00693	108.57	113.51	101.79	108	6E+00
240 μg/ml	0.117	0.116	0.116	0.1163	0.00058	111.43	104.50	103.57	107	4E+00
400 μg/ml	0.113	0.121	0.123	0.1190	0.00529	107.62	109.01	109.82	109	1E+00
600 μg/ml	0.118	0.122	0.12	0.1200	0.00200	112.38	109.91	107.14	110	3E+00
800 μg/ml	0.117	0.114	0.102	0.1110	0.00794	111.43	102.70	91.07	102	1E+01
Lecturas a las 6 hr										
<i>AhCPI</i>										
0 μg/ml	0.0910	0.1050	0.1190	0.1050	0.01400	100.00	100.00	100.00	100	1E-14
120 μg/ml	0.0990	0.1220	0.1110	0.1107	0.01150	108.79	116.19	93.28	106	1E+01
240 μg/ml	0.1030	0.1110	0.1090	0.1077	0.00416	113.19	105.71	91.60	103	1E+01
400 μg/ml	0.1010	0.1160	0.1170	0.1113	0.00896	110.99	110.48	98.32	107	7E+00
600 μg/ml	0.1060	0.1120	0.1060	0.1080	0.00346	116.48	106.67	89.08	104	1E+01
800 μg/ml	0.0960	0.1040	0.1030	0.1010	0.00436	105.49	99.05	86.55	97	1E+01
Lecturas a las 12 hr										
<i>AhCPI</i>										
0 μg/ml	0.14	0.171	0.203	0.1713	0.03150	100.00	100.00	100.00	100	0E+00
120 μg/ml	0.126	0.206	0.151	0.1610	0.04093	90.00	120.47	74.38	95	2E+01
240 μg/ml	0.13	0.145	0.13	0.1350	0.00866	92.86	84.80	64.04	81	1E+01
400 μg/ml	0.121	0.144	0.127	0.1307	0.01193	86.43	84.21	62.56	78	1E+01
600 μg/ml	0.115	0.133	0.119	0.1223	0.00945	82.14	77.78	58.62	73	1E+01
800 μg/ml	0.096	0.104	0.1	0.1000	0.00400	68.57	60.82	49.26	60	1E+01
Lecturas a las 24 hr										
<i>AhCPI</i>										
0 μg/ml	0.429	0.477	0.497	0.4677	0.03495	100.00	100.00	100.00	100	0E+00
120 μg/ml	0.256	0.423	0.294	0.3243	0.08753	59.67	88.68	59.15	69	2E+01
240 μg/ml	0.157	0.136	0.133	0.1420	0.01308	36.60	28.51	26.76	31	5E+00
400 μg/ml	0.093	0.102	0.097	0.0973	0.00451	21.68	21.38	19.52	21	1E+00
600 μg/ml	0.094	0.097	0.093	0.0947	0.00208	21.91	20.34	18.71	20	2E+00
800 μg/ml	0.096	0.097	0.097	0.0967	0.00058	22.38	20.34	19.52	21	1E+00

<i>AhCPI</i>	Lecturas de absorbancia a las 30 hr					Lecturas de % crecimiento a las 30 hr				
0 µg/ml	0.525	0.605	0.624	0.5847	0.05254	100.00	100.00	100.00	100	0E+00
120 µg/ml	0.357	0.521	0.402	0.4267	0.08474	68.00	86.12	64.42	73	1E+01
240 µg/ml	0.25	0.206	0.197	0.2177	0.02836	47.62	34.05	31.57	38	9E+00
400 µg/ml	0.095	0.113	0.109	0.1057	0.00945	18.10	18.68	17.47	18	6E-01
600 µg/ml	0.095	0.111	0.104	0.1033	0.00802	18.10	18.35	16.67	18	9E-01
800 µg/ml	0.098	0.104	0.099	0.1003	0.00321	18.67	17.19	15.87	17	1E+00
Lecturas a las 36 hr										
<i>AhCPI</i>										
0 µg/ml	0.586	0.695	0.696	0.6590	0.06322	100.00	100.00	100.00	100	0E+00
120 µg/ml	0.468	0.636	0.541	0.5483	0.08424	79.86	91.51	77.73	83	7E+00
240 µg/ml	0.379	0.313	0.286	0.3260	0.04784	64.68	45.04	41.09	50	1E+01
400 µg/ml	0.11	0.129	0.125	0.1213	0.01002	18.77	18.56	17.96	18	4E-01
600 µg/ml	0.114	0.13	0.123	0.1223	0.00802	19.45	18.71	17.67	19	9E-01
800 µg/ml	0.097	0.112	0.101	0.1033	0.00777	16.55	16.12	14.51	16	1E+00
Lecturas a las 42 hr										
<i>AhCPI</i>										
0 µg/ml	0.665	0.705	0.735	0.7017	0.03512 100.00	100.00	100.00	100	0E+00	
120 µg/ml	0.499	0.692	0.626	0.6057	0.09809	75.04	98.16	85.17	86	1E+01
240 µg/ml	0.476	0.445	0.399	0.4400	0.03874	71.58	63.12	54.29	63	9E+00
400 µg/ml	0.105	0.136	0.13	0.1237	0.01644	15.79	19.29	17.69	18	2E+00
600 µg/ml	0.113	0.136	0.121	0.1233	0.01168	16.99	19.29	16.46	18	2E+00
800 µg/ml	0.099	0.102	0.102	0.1010	0.00173	14.89	14.47	13.88	14	5E-01
Lecturas a las 48 hr										
<i>AhCPI</i>										
0 µg/ml	0.603	0.748	0.751	0.7007	0.08460	100.00	100.00	100.00	100	1E-14
120 µg/ml	0.51	0.713	0.642	0.6217	0.10302	84.58	95.32	85.49	88	6E+00
240 µg/ml	0.561	0.562	0.516	0.5463	0.02627	93.03	75.13	68.71	79	1E+01
400 µg/ml	0.093	0.114	0.115	0.1073	0.01242	15.42	15.24	15.31	15	9E-02
600 µg/ml	0.098	0.113	0.095	0.1020	0.00964	16.25	15.11	12.65	15	2E+00
800 µg/ml	0.101	0.104	0.102	0.1023	0.00153	16.75	13.90	13.58	15	2E+00

Cuadro 34.- Lecturas de Absorbancia a λ 592 nm y de crecimiento (%) de *Sclerotium cepivorum*. En presencia de diferentes concentraciones de cistatina recombinante *AhCPI* purificada.

<i>AhCPI</i>	Lecturas de absorbancia a las 0 hr					Lecturas de % de crecimiento a las 0 hr				
	R1	R2	R3	Promedio	SD	R1	R2	R3	Promedio	SD %
0 μg/ml	0.138	0.117	0.178	0.1443	0.03099	100.00	100.00	100.00	100	1E-14
40 μg/ml	0.159		0.206	0.1825	0.03323	115.22	0.00	115.73	77	7E+01
80 μg/ml	0.214	0.171	0.155	0.1800	0.03051	155.07	146.15	87.08	129	4E+01
120 μg/ml	0.169	0.27	0.264	0.2343	0.05666	122.46	230.77	148.31	167	6E+01
160 μg/ml	0.245	0.209		0.2270	0.02546	177.54	178.63	0.00	119	1E+02
200 μg/ml	0.132	0.153	0.13	0.1383	0.01274	95.65	130.77	73.03	100	3E+01
<i>AhCPI</i>	Lecturas a las 12 hr									
0 μg/ml	0.106	0.098	0.153	0.1190	0.02972	100.00	100.00	100.00	100	0E+00
40 μg/ml	0.237		0.209	0.2230	0.01980	223.58	0.00	136.60	120	1E+02
80 μg/ml	0.206	0.261	0.12	0.1957	0.07107	194.34	266.33	78.43	180	9E+01
120 μg/ml	0.143	0.14	0.139	0.1407	0.00208	134.91	142.86	90.85	123	3E+01
160 μg/ml	0.195	0.129		0.1620	0.04667	183.96	131.63	0.00	105	9E+01
200 μg/ml	0.098	0.097	0.121	0.1053	0.01358	92.45	98.98	79.08	90	1E+01
<i>AhCPI</i>	Lecturas a las 18 hr									
0 μg/ml	0.102	0.09	0.145	0.1123	0.02892	100.00	100.00	100.00	100	0.0E+00
40 μg/ml	0.13	0.252	0.234	0.2053	0.06586	127.45	280.00	161.38	190	8.0E+01
80 μg/ml	0.141	0.17	0.1	0.1370	0.03517	138.24	188.89	68.97	132	6.0E+01
120 μg/ml	0.149	0.169	0.109	0.1423	0.03055	146.08	187.78	75.17	136	5.7E+01
160 μg/ml	0.124	0.113	0.193	0.1433	0.04336	121.57	125.56	133.10	127	5.9E+00
200 μg/ml	0.103	0.106	0.11	0.1063	0.00351	100.98	117.78	75.86	98	2.1E+01
<i>AhCPI</i>	Lecturas a las 24 hr									
0 μg/ml	0.091	0.089	0.152	0.1107	0.03581	100.00	100.00	100.00	100	1E-14
40 μg/ml	0.226	0.231	0.2	0.2190	0.01664	248.35	259.55	131.58	213	7E+01
80 μg/ml	0.132	0.187	0.108	0.1423	0.04050	145.05	210.11	71.05	142	7E+01
120 μg/ml	0.121	0.189	0.11	0.1400	0.04279	132.97	212.36	72.37	139	7E+01
160 μg/ml	0.187	0.18	0.208	0.1917	0.01457	205.49	202.25	136.84	182	4E+01
200 μg/ml	0.105	0.108	0.14	0.1177	0.01940	115.38	121.35	92.11	110	2E+01

<i>AhCPI</i>	Lecturas de absorbancia a las 30 hr					Lecturas de % de crecimiento a las 30 hr				
0 µg/ml	0.095	0.099	0.15	0.1147	0.03066	100.00	100.00	100.00	100	0E+00
40 µg/ml	0.129	0.22	0.143	0.1640	0.04900	135.79	222.22	95.33	151	6E+01
80 µg/ml	0.121	0.171	0.11	0.1340	0.03251	127.37	172.73	73.33	124	5E+01
120 µg/ml	0.131	0.217	0.139	0.1623	0.04751	137.89	219.19	92.67	150	6E+01
160 µg/ml	0.264	0.159	0.237	0.2200	0.05453	277.89	160.61	158.00	199	7E+01
200 µg/ml	0.11	0.1	0.153	0.1210	0.02816	115.79	101.01	102.00	106	8E+00
<i>AhCPI</i>	Lecturas a las 36 hr									
0 µg/ml	0.12	0.108	0.149	0.1257	0.02108	100.00	100.00	100.00	100	1E-14
40 µg/ml	0.176	0.211	0.16	0.1823	0.02608	146.67	195.37	107.38	150	4E+01
80 µg/ml	0.139	0.169	0.105	0.1377	0.03202	115.83	156.48	70.47	114	4E+01
120 µg/ml	0.197	0.131	0.192	0.1733	0.03675	164.17	121.30	128.86	138	2E+01
160 µg/ml	0.283	0.164	0.206	0.2177	0.06035	235.83	151.85	138.26	175	5E+01
200 µg/ml	0.128	0.116	0.114	0.1193	0.00757	106.67	107.41	76.51	97	2E+01
<i>AhCPI</i>	Lecturas a las 42 hr									
0 µg/ml	0.195	0.18	0.157	0.1773	0.01914	100.00	100.00	100.00	100	0E+00
40 µg/ml	0.302	0.202	0.146	0.2167	0.07903	154.87	112.22	92.99	120	3E+01
80 µg/ml	0.185	0.189	0.098	0.1573	0.05142	94.87	105.00	62.42	87	2E+01
120 µg/ml	0.157	0.15	0.122	0.1430	0.01852	80.51	83.33	77.71	81	3E+00
160 µg/ml	0.262	0.153	0.302	0.2390	0.07712	134.36	85.00	192.36	137	5E+01
200 µg/ml	0.142	0.138	0.123	0.1343	0.01002	72.82	76.67	78.34	76	3E+00
<i>AhCPI</i>	Lecturas a las 48 hr									
0 µg/ml	0.252	0.571	0.403	0.4087	0.15958	100.00	100.00	100.00	100	0E+00
40 µg/ml	0.171	0.164	0.147	0.1607	0.01234	67.86	28.72	36.48	44	2E+01
80 µg/ml	0.115	0.112	0.112	0.1130	0.00173	45.63	19.61	27.79	31	1E+01
120 µg/ml	0.12	0.154	0.114	0.1293	0.02157	47.62	26.97	28.29	34	1E+01
160 µg/ml	0.188	0.141	0.242	0.1903	0.05054	74.60	24.69	60.05	53	3E+01
200 µg/ml	0.297	0.114	0.124	0.1783	0.10289	117.86	19.96	30.77	56	5E+01
<i>AhCPI</i>	Lecturas a las 54 hr									
0 µg/ml	0.351	0.611	1.149	0.7037	0.40699	100.00	100.00	100.00	100	1E-14
40 µg/ml	0.176	0.161	0.153	0.1633	0.01168	50.14	26.35	13.32	30	2E+01
80 µg/ml	0.167	0.13	0.099	0.1320	0.03404	47.58	21.28	8.62	26	2E+01
120 µg/ml	0.19	0.151	0.114	0.1517	0.03800	54.13	24.71	9.92	30	2E+01
160 µg/ml	0.228	0.13	0.204	0.1873	0.05108	64.96	21.28	17.75	35	3E+01
200 µg/ml	0.316	0.112	0.128	0.1853	0.11344	90.03	18.33	11.14	40	4E+01

Cuadro 35.- Lecturas de Absorbancia a λ 592 nm y de crecimiento (%) de *Rhizoctonia solani*. En presencia de diferentes concentraciones de cistatina recombinante *AhCPI* purificada.

	Lecturas de absorbancia a las 0 hr					Lecturas de % de crecimiento las 0 hr				
<i>AhCPI</i>	R1	R2	R3	Promedio	SD	R1	R2	R3	Promedio	SD %
0 μg/ml	-	0.291	0.617	0.4540	0.23052	100	100	100	67	6E+01
40 μg/ml	0.101	0.143	0.105	0.1163	0.02318	114.77	49.14	17.02	60	5E+01
80 μg/ml	0.1	0.12	0.108	0.1093	0.01007	113.64	41.24	17.50	57	5E+01
120 μg/ml	0.546	-	0.591	0.5685	0.03182	620.45	0.00	95.79	239	3E+02
160 μg/ml	0.526	-	0.641	0.5835	0.08132	597.73	0.00	103.89	234	3E+02
200 μg/ml	-	0.758	0.332	0.5450	0.30123	0.00	260.48	53.81	105	1E+02
240 μg/ml	0.098	0.108	0.77	0.3253	0.38513	111.36	37.11	124.80	91	5E+01
<i>AhCPI</i>	Lecturas a las 12 hr									
0 μg/ml	0.18	0.55	0.233	0.3210	0.20008	100.00	100.00	100.00	100	0E+00
40 μg/ml	0.099	0.097	0.132	0.1093	0.01966	55.00	17.64	56.65	43	2E+01
80 μg/ml	0.089	0.098	0.098	0.0950	0.00520	49.44	17.82	42.06	36	2E+01
120 μg/ml	0.36	-	0.35	0.3550	0.00707	200.00	0.00	150.21	117	1E+02
160 μg/ml	0.03	-	0.1904	0.1102	0.11342	16.67	0.00	81.72	33	4E+01
200 μg/ml	0.373	0.632	-	0.5025	0.18314	207.22	114.91	0.00	107	1E+02
240 μg/ml	0.099	0.211	0.102	0.1373	0.06381	55.00	38.36	43.78	46	8E+00
<i>AhCPI</i>	Lecturas a las 18 hr									
0 μg/ml	0.251	0.765	1.185	0.7337	0.46779	100.00	100.00	100.00	100	0.0E+00
40 μg/ml	0.139	0.128	0.127	0.1313	0.00666	55.38	16.73	10.72	28	2.4E+01
80 μg/ml	0.097	0.103	0.091	0.0970	0.00600	38.65	13.46	7.68	20	1.6E+01
120 μg/ml	0.635	0.167	0.488	0.4300	0.23933	252.99	21.83	41.18	105	1.3E+02
160 μg/ml	0.095	0.096	0.348	0.1797	0.14578	37.85	12.55	29.37	27	1.3E+01
200 μg/ml	0.628	0.201	0.097	0.3087	0.28140	250.20	26.27	8.19	95	1.3E+02
240 μg/ml	0.098	0.153	0.098	0.1163	0.03175	39.04	20.00	8.27	22	1.6E+01
<i>AhCPI</i>	Lecturas a las 24 hr									
0 μg/ml	0.459	1.02	1.431	0.9700	0.48793	100.00	100.00	100.00	100	1E-14
40 μg/ml	0.176	0.164	0.163	0.1677	0.00723	38.34	16.08	16.80	24	1E+01
80 μg/ml	0.12	0.116	0.112	0.1160	0.00400	26.14	11.37	11.55	16	8E+00
120 μg/ml	0.535	0.711	0.74	0.6620	0.11094	116.56	69.71	76.29	88	3E+01
160 μg/ml	-	0.213	0.385	0.2990	0.12162	0.00	20.88	39.69	20	2E+01
200 μg/ml	0.536	0.142	0.11	0.2627	0.23725	116.78	13.92	11.34	47	6E+01
240 μg/ml	0.099	0.112	0.101	0.1040	0.00700	21.57	10.98	10.41	14	6E+00

<i>AhCPI</i>	Lecturas de absorbancia a las 30 hr					Lecturas de % a las 30 hr				
0 µg/ml	0.617	1.214	1.525	1.1187	0.46145	100.00	100.00	100.00	100	0E+00
40 µg/ml	0.194	0.168	0.182	0.1813	0.01301	31.44	13.84	11.93	19	1E+01
80 µg/ml	0.144	0.129	0.126	0.1330	0.00964	23.34	10.63	8.26	14	8E+00
120 µg/ml	0.269	0.464	0.412	0.3817	0.10098	43.60	38.22	27.02	36	8E+00
160 µg/ml	0.105	0.111	0.52	0.2453	0.23789	17.02	9.14	34.10	20	1E+01
200 µg/ml	0.62	0.137	0.156	0.3043	0.27354	100.49	11.29	10.23	41	5E+01
240 µg/ml	0.099	0.104	0.102	0.1017	0.00252	16.05	8.57	6.69	10	5E+00
<i>AhCPI</i>	Lecturas a las 36 hr									
0 µg/ml	0.744	1.289	1.667	1.2333	0.46401	100.00	100.00	100.00	100	0E+00
40 µg/ml	0.235	0.195	0.2	0.2100	0.02179	31.59	15.13	12.00	20	1E+01
80 µg/ml	0.148	0.133	0.132	0.1377	0.00896	19.89	10.32	7.92	13	6E+00
120 µg/ml	0.596	0.547	0.499	0.5473	0.04850	80.11	42.44	29.93	51	3E+01
160 µg/ml	0.095	0.095	0.217	0.1357	0.07044	12.77	7.37	13.02	11	3E+00
200 µg/ml	1.382	0.274	0.137	0.5977	0.68270	185.75	21.26	8.22	72	1E+02
240 µg/ml	0.11	0.105	0.101	0.1053	0.00451	14.78	8.15	6.06	10	5E+00
<i>AhCPI</i>	Lecturas a las 42 hr									
0 µg/ml	0.826	1.358	1.679	1.2877	0.43083	100.00	100.00	100.00	100	0E+00
40 µg/ml	0.296	0.268	0.252	0.2720	0.02227	35.84	19.73	15.01	24	1E+01
80 µg/ml	0.177	0.146	0.134	0.1523	0.02219	21.43	10.75	7.98	13	7E+00
120 µg/ml	0.692	0.587	0.512	0.5970	0.09042	83.78	43.23	30.49	52	3E+01
160 µg/ml	0.096	0.094	0.154	0.1147	0.03408	11.62	6.92	9.17	9	2E+00
200 µg/ml	1.476	0.277	0.256	0.6697	0.69838	178.69	20.40	15.25	71	9E+01
240 µg/ml	0.105	0.105	0.125	0.1117	0.01155	12.71	7.73	7.44	9	3E+00
<i>AhCPI</i>	Lecturas a las 48 hr									
0 µg/ml	0.954	1.485	1.721	1.3867	0.39284	100.00	100.00	100.00	100	1E-14
40 µg/ml	0.445	0.434	0.395	0.4247	0.02627	46.65	29.23	22.95	33	1E+01
80 µg/ml	0.267	0.223	0.202	0.2307	0.03317	27.99	15.02	11.74	18	9E+00
120 µg/ml	0.864	0.587	0.526	0.6590	0.18014	90.57	39.53	30.56	54	3E+01
160 µg/ml	0.109	0.119	0.196	0.1413	0.04761	11.43	8.01	11.39	10	2E+00
200 µg/ml	0.985	0.209	0.428	0.5407	0.40008	103.25	14.07	24.87	47	5E+01
240 µg/ml	0.105	0.108	0.108	0.1070	0.00173	11.01	7.27	6.28	8	2E+00

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Buffer de activación de actividad inhibitoria (Papaína pH 6.8)
Fosfatos de Sodio 50 mM.
EDTA 10 mM.
DTT 2.5 mM.

Buffer de activación de titulación de sitio activo (Papaína pH 6.8).
Fosfatos de Sodio 0.1 M.
EDTA 4 mM.
DTT 8 mM.

Buffer de activación de actividad inhibitoria (Ficina pH 6.5)
Fosfatos de Sodio 50 mM.
EDTA 10 mM.
DTE 2.5 mM.

Buffer de activación de titulación de sitio activo (Ficina pH 7).
Fosfatos de Sodio 0.1 M.
EDTA 4 mM.
DTE 8 mM.

Buffer de activación de actividad inhibitoria (Bromelaína pH 6.5)
Fosfatos de Sodio 100 mM.
KCl 0.3 M
EDTA 0.1 mM.
DTE 3 mM.

Los buffers de titulación de sitio activo y de actividad inhibitoria se les adicionan el DTT o DTE hasta el momento en que vallan a ser usados. Nunca antes, solo preparar lo correspondiente al ensayo.

Solución cisteín proteasa para actividad inhibitoria	
Papaína	0.1 mg / ml H ₂ O.
Ficina	1.5 mg/ ml H ₂ O.
Bromelaína	3.5 mg/ ml H ₂ O.

Solución cisteín proteasa para titulación de sitio activo	
Papaína	20 μM.
Ficina	4.75 mg/ ml.
Bromelaína	

Sustratos para actividad inhibitoria	
Papaína	BAPA 10 mM/ml DMSO
Ficina	BAPA 10 mM/ ml DMSO
Bromelaína	BAPA 10 mM/ml DMSO
DMSO (Para disolver BAPA)	

Sustratos para titulación de sitio Activo.	
Papaína	BAPA 0.1 M/ ml DMSO
Ficina	BAPA 0.1 M/ml DMSO
Bromelaína	
DMSO (Para disolver BAPA)	

Inhibidor para titulación de sitio activo

Cistatina E-64 20 μ M (diluir 1:1 agua/etanol).
Permanece viable por un mes a - 20°C.

Preparación de Medio de cultivo V8 para 1 L.	
Agar bacteriológico	15 g
Carbonato de Calcio	3 g
Jugo V8 (clarificado)	160 ml (centrifugado 10 min/ 3000rpm).
H₂O	840 ml

Preparación de medio PDA	
Papa	200 g
D-Glucosa	10 g
Agar bacteriológico	18
H₂O	Aforar a 1 Lt

Medio de cultivo comerciales para 1 L.

PDA DIFCO	39 g
PDB DIFCO	24 g
PDB 1/3 DIFCO	8 g