

CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS QUITINOLÍTICAS DE *Lecanicillium lecanii* EN CULTIVO SÓLIDO

Calderón-Garza Eva, Barranco-Flrido Esteban, Rina González, Patricia Martínez, Alejandro Azaola Mayorga-Reyes Lino. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P. 04960, D.F. México. lmayorga@correo.xoc.uam.mx

Palabras clave: *L. lecanii*, Actividad quitinolítica, ARN total.

Introducción. Los hongos entomopatógenos, durante el proceso infeccioso sintetizan proteasas y quitinasas que degradan la cutícula del insecto. La participación de las quitinasas en la patogenicidad de los hongos es relevante ya que podrían mejorar su virulencia. Por lo que el estudio de la expresión de los genes en cultivo sólido permitiría elucidar la patogénesis en su ambiente natural.

Este trabajo consistió en determinar las actividades quitinolíticas de *L. lecanii* en cultivo sólido utilizando sustratos complejos. Así como amplificar los genes que codifican dos quitinasas y optimizar el aislamiento y purificación del ARN total en el cultivo sólido.

Metodología. Se utilizó una cepa de *L. lecanii* ATCC 26854, crecida en agar dextrosa saboraud. El cultivo sólido consistió en un medio mineral y como fuente de carbono caparazón de camarón, cutícula de chapulín y glucosa (60 gL^{-1}) (1). La actividad quitinolítica se determinó con p-nitrofenol N.acetil- β -D-glucosamida (Sigma Chemical Co.). Se tomaron muestras en la fase exponencial y estacionaria para la extracción y purificación de ADN y ARN total de *L. lecanii* en cada uno de los sustratos para su aislamiento y purificación de acuerdo al proveedor (kit DNeasy Plant Minikit) (QIAGEN) y ARN total (Trizol^R) (Invitrogen).

Resultados y discusión. La actividad quitinolítica se determinó en el extracto obtenido del cultivo sólido. El hongo en glucosa presentó niveles mínimos de actividad, mientras que en caparazón de camarón fue 6 veces mayor que en cutícula de chapulín (Fig 1), ambos sustratos son inductores (2). Se amplificaron dos fragmentos de los genes *chit1* y *chit2* por PCR (Fig 2) y se optimizó la extracción y purificación del ARN total de *V. lecanii* (Fig 3). Se están realizando los ensayos para determinar la expresión de los genes quitinolíticos, utilizando sustratos complejos en cultivo sólido.

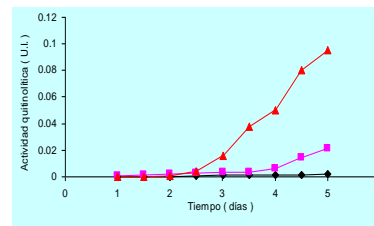


Fig. 1. Actividades quitinolíticas de *L. lecanii*. Glucosa ◆; Cutícula de chapulín ■; Caparazón de camarón ▲.

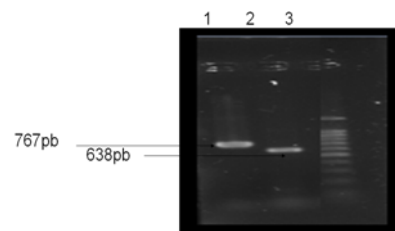


Fig 2. Productos amplificados de los genes de quitinasas de *L. lecanii*; 1) *chit-I*. 2) *chit-II*. 3) marcador de 100 pb.

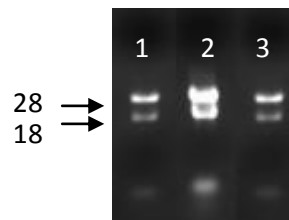


Fig.3 Extracción de ARN total de *L. lecanii* en fermentación sólida; 1) caparazón de camarón 2) cutícula de chapulín 3) glucosa.

Conclusiones. El caparazón de camarón es un mayor inductor de la actividad quitinolítica. Se estandarizó la extracción y purificación de ADN y ARN total de *V. lecanii* en cultivo sólido.

Bibliografía.

- Barranco, E, Alatorre, R, Gutierrez, M, Viniegra, G, Saucedo, G. (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme Microb. Technol.* 30:910-915.
- Krieger C, Schrank A, Henning VM (2003). Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.* 46:205-210.