



CARACTERIZACIÓN DE UNA ENDOQUITINASA DE *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* Y SU EFECTO SOBRE *Colletotrichum gloeopoides*, AGENTE CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS EN PLANTAS

Norma M. de la Fuente-Salcido¹, Luz Edith Casados-Vázquez^{2,3}, Ada P. García-Pérez¹, Uriel E. Barboza-Pérez³, Rubén Salcedo-Hernández^{2,3}, Blanca E. García-Almendárez, José Eleazar Barboza-Corona. Universidad de Guanajuato de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos. Irapuato, Guanajuato, MEX. 36500, josebar@ugto.mx

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, endochitinase ChiA Btt, *Colletotrichum gloeopoides*

Introducción. *Bacillus thuringiensis* (Bt) es el bioinsecticida más exitoso a nivel mundial gracias a la actividad insecticida de sus proteínas Cry, las cuales son tóxicas contra diversos órdenes de insectos. De manera particular, Bt subsp. *tenebrionis* (Btt) produce proteínas Cry3 las cuales son tóxicas a coleópteros plaga (1). Las quitinasas de Btt han sido empleadas como agentes sinérgicos de las proteínas Cry (2), para generar quitooligosacáridos con uso potencial en la industria alimentaria y farmacéutica (3) y en menor proporción para el control de hongos (4). Hasta el momento se han reportado cerca de 60 quitinasas en el banco de genes, sin embargo solamente ~30% han sido reportadas en artículos científicos y caracterizadas.

Con el propósito de conocer la diversidad de las quitinasas de *B. thuringiensis*, en este trabajo nuestro objetivo fue clonar, expresar, y purificar una endochitinasa de Btt y demostrar su utilidad para controlar hongos causante de la antracnosis.

Metodología. El gen que codifica la endochitinasa ChiA Btt fue amplificada y clonada a partir de Btt. Al marco de lectura del gen se le eliminó la secuencia que codifica al péptido señal (ChiA Δ sp Btt) y se fusionaron 6xHis en el N-terminal. La construcción fue introducida en *E. coli* y la proteína fue purificada en columnas con afinidad a Niquel. La masa molecular de ChiA Δ sp Btt se determinó en SDS-PAGE y zimogramas. Se calculó su V_{max}, Km, el efecto de cationes y la actividad a diferentes valores de pH y temperatura usando sustratos fluorescentes sintéticos. Finalmente, se evaluó su efecto inhibitorio contra *Colletotrichum gloeopoides*, agente causal de la antracnosis en plantas.

Resultados. Se demostró que ChiA Btt actúa como una endochitinasa y tiene una masa molecular de ~74 kDa. El análisis *in silico* muestra que es una proteína modular con tres dominios: el catalítico, tipo fibrobectina y sitio de unión a quitina, los cuales conservan los aminoácidos críticos para la función de cada dominio. La V_{max} y la Km fueron de 0.116 nmol/min y 0.847 μ M, respectivamente. Se determinó que la actividad óptima de la quitinasa es a pH 7 y 40°C. La enzima no requiere de cationes para su actividad, de hecho todos los cationes analizados disminuyeron la actividad, pero solo el Hg⁺² la elimina totalmente. ChiA Btt inhibe el crecimiento de *C. gloeopoides* *in vitro*, observándose

que reduce el crecimiento radial y aumenta la densidad de hifas (Fig.1).

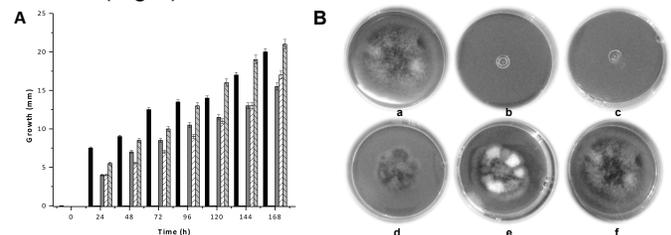


Fig.1. Efecto de ChiABtt en el crecimiento radial de *C. gloeopoides* medido durante 7 días. (A) La barra oscura es el control y las demás indican distintos tratamientos (la concentración disminuye de izquierda a derecha). (B) Observación macroscópica.

Conclusiones. Se reporta la primera endochitinasa de *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. ChiA Btt es una proteína con arquitectura modular similar a la reportada para otras quitinasas bacterianas. Su actividad es afectada por cationes y tiene una Km pequeña comparada con otras quitinasas bacterianas. Se demostró el efecto de una quitinasa de *B. thuringiensis* contra uno de los hongos etiológicos de la antracnosis en plantas, *C. gloeopoides*. ChiA Btt tiene potencial para controlar otros hongos fitopatógenos y puede ser útil como agente sinérgico de las proteínas Cry y para generar quitooligosacáridos.

Agradecimiento. A SEP-CONACyT (proyecto 156682) y SEP-Prodep (proyecto de la Red Biotecnología Alimentaria) por el apoyo financiero.

Bibliografía.

- Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications *Plant Biotechnol J.* 9(3): 283-300.
- Barboza-Corona JE, Delgado-Ángeles JL, Castañeda-Ramírez JC, Barboza-Pérez UE, Casados-Vázquez LE, Bideshi DK, Del Rincón-Castro MC. (2014). *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 as a factory to synthesize alkali-labile ChiA74 Δ sp chitinase inclusions, Cry crystals and spores for applied use. *Microbial Cell Factories.* 13:15.
- Castañeda-Ramírez C, De la Fuente-Salcido NM, Salcedo-Hernández R, León-Galván F, Bideshi DK, Barboza-Corona JE. (2013). High-level synthesis of endochitinase ChiA74 in *Escherichia coli* K12 and its promising potential for use in biotechnology *Folia Microbiol (Praha).* 58(6):455-462.
- Morales de la Vega L, Barboza-Corona JE, Aguilar-Uscanga MG, Ramírez-Lepe M. (2006). Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi *Can J Microbiol.* 52(7):651-657.