

## IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN DEL GEN DE FITASA DE *Aspergillus niger* y *Volutella* sp

Andrés Escalante Tió<sup>1</sup>, Bartolomé Humberto Chi Manzanero<sup>2</sup>, José María Tun Suárez<sup>1</sup>, Luis Carlos Rodríguez Zapata<sup>2</sup>, Carlos Francisco de Jesús Fuentes Cerda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2, km 16.3 carretera antigua a Motul, Conkal, Yucatán. CP 97345. Tel. y Fax: (01) (999) 9-12-41-30, (01) (999) 9-12-41-35. [www.itaconkal.edu.mx](http://www.itaconkal.edu.mx); [cfuentes59@msn.com](mailto:cfuentes59@msn.com)

<sup>2</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 48 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México. C.P. 97240. Tel. y Fax: 01 (999) 98130914, 01 (999) 9813921, 01 (999) 9813966. [www.cicy.mx](http://www.cicy.mx)

*Palabras clave:* Ácido fítico, fósforo, hongos.

**Introducción.** La mayor parte del fósforo (P) aplicado como fertilizante se fija en el suelo como ácido fítico y pierde su disponibilidad (Dalal, 1977). Las plantas y los animales son poco eficientes para adquirir P a partir del fitato (Hayes *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2000). Se han expresado enzimas de *Aspergillus* en algunas plantas que les ha permitido crecer con fitato como fuente exclusiva de P (Brinch-Pedersen *et al.*, 2000).

El objetivo del presente trabajo fue identificar, aislar y clonar el gen que codifica para fitasa en *Aspergillus niger* y *Volutella* sp, para transformar plantas de interés hortícola.

**Metodología.** Se seleccionaron cepas de *Aspergillus* y *Volutella* capaces de crecer en medios sin P. Se obtuvo el ADNc de las cepas mediante RT-PCR, con iniciadores de secuencias consenso de fitasas fúngicas. Los productos se separaron en geles de agarosa y purificaron, se insertaron en el vector P-GemT-Easy (Promega) para transformar *E. coli*. El producto fue secuenciado y se comparó con otras fitasas y fosfatasa. Se hicieron hibridaciones Southern para verificar el número de copias del gen, y Northern para confirmar la transcripción de aquél.

**Resultados y discusión.** En ambas especies se obtuvo un único fragmento como producto de la PCR, con un tamaño aproximado de 1400 pb (Figura 1).

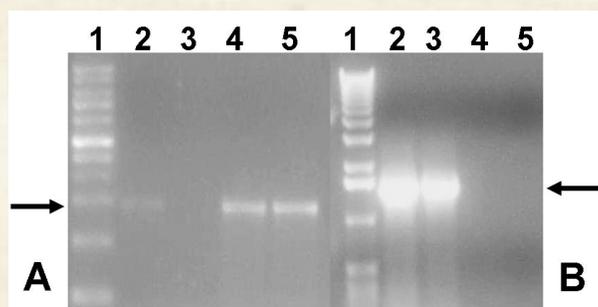


Figura 1. Producto de PCR. A) *A. niger*: carril 1, marcador de 1kb; carriles 2 y 3, medio con P; carriles 4 y 5, medio sin P. B) *Volutella*: carril 1, marcador de 1kb; carril 2, medio con P; carril 3, medio sin P; carriles 4 y 5, controles.

Para ambas especies, el producto amplificado con los iniciadores 5' ATG GGC GTC TCT GCT GTT CTA y 5' CTA AGC AAA ACA CTC CGC CCA, del gen de fitasa de *A. niger*. Las cepas de *E. coli* que clonaron satisfactoriamente el plásmido con el inserto, fueron DH10 $\beta$  y JM109 (Figura 2).

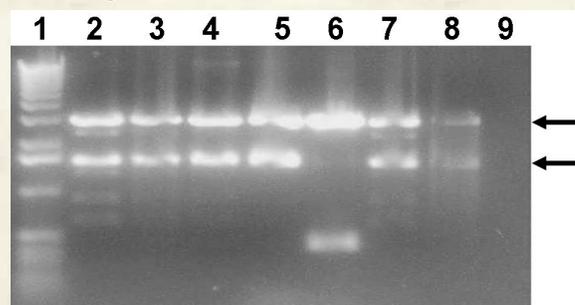


Figura 2. Digestión de plásmidos de células transformadas de *E. coli* con el gen de fitasa. Carril 1, marcador de 1 kb; carriles 2-5, cepa DH10- $\beta$ ; carril 6, cepa DH5- $\alpha$ ; carriles 7 y 8, cepa JM-109; carril 9, cepa no transformada. La flecha superior señala el vector y la inferior el inserto.

**Conclusiones.** Se obtuvo un protocolo adecuado para aislar y clonar el gen de la fitasa de *A. niger* y *Volutella*. Actualmente se está comparando su similitud.

**Agradecimientos.** Al CoSNET (Convenio 735.04-P) y al CONACyT (Beca de Maestría No. 179860).

### Bibliografía.

- Brinch-Pedersen, H.; Olesen, A.; Rasmussen, S.K.; Holm, P.B. (2000). Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus* phytase. *Mol. Breeding*. 6: 195-206.
- Dalal, R.C. (1977). Soil organic phosphorus. *Adv. Agron.* 29: 83-117.
- Hayes, J.E.; Simpson, R.J.; Richardson, A.E. (2000). The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant Soil*. 220: 165-174.
- Richardson, A.E.; Hadobas, P.A.; Hayes, J.E. (2000). Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant Cell Environ.* 23: 397-405.