

## CARACTERIZACIÓN DE UN BANCO SUSTRACTIVO DE *Aspergillus niger* EN PRESENCIA DE CATEQUINA

Violeta Herrera<sup>1</sup>, Ramón G. Guevara<sup>1</sup>, Lorenzo Guevara<sup>1</sup>, Francisco Villaseñor<sup>1</sup>, Octavio Loera<sup>2</sup>, Claudia I. Muñoz Sánchez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Celaya, C.P. 38010, Celaya, Gto. UAM Tel. 01 (461) 6117575. Fax 01 (461) 6117979. civonne@itc.mx

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. 09340 México DF. Tel. 01(55) 58046408

*Taninos condensados, degradación, Aspergillus niger.*

**Introducción.** Los taninos son compuestos polifenólicos solubles en agua con un peso molecular variable. Se clasifican en hidrolizables y condensables (1). Son metabolitos secundarios que protegen a las plantas contra insectos y patógenos (2). Hay una gran diversidad de organismos capaces de degradar estos compuestos, por ejemplo, miembros del género *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp (3). Los taninos son utilizados ampliamente en la industria curtidora generando efluentes contaminados.

El objetivo del presente es la generación de conocimiento sobre los genes de *A. niger* involucrados en la biodegradación de taninos condensables.

**Metodología.** La estrategia fue la siguiente: inducción del micelio de *A. niger* en tres diferentes medios, todos ellos contienen medio mínimo, catequina 5mM, glicerol 1% y una mezcla de catequina y glicerol como fuentes de carbono. Posteriormente se realizó extracción de ARN (método RNeasy Quiagen), síntesis de ADNc (método SMART Clontech) y la hibridación sustractiva por supresión (Clontech) para el aislamiento de genes expresados diferencialmente por lo presencia de la catequina. Posteriormente se hizo un análisis tipo Southern para confirmar la expresión diferencial de los fragmentos de genes y se secuenciaron algunas de estas clonas. Se seleccionó una de estas clonas y se marcó para realizar un análisis Northern.

**Resultados y discusión.** Por medio de la SSH se obtuvo la amplificación de dos bandas, una de 300 pb y otra de 400 pb aproximadamente las cuales fueron ligadas en el vector PCR 4.0 TOPO y se transformó bacterias competentes de *Escherichia coli*. Con las clonas obtenidas se realizó un Análisis tipo Southern hibridando por una parte con el ADNc del micelio inducido en catequina y glicerol (problema) y por la otra con el ADNc del micelio inducido en glicerol (control), mostrando los siguientes resultados:

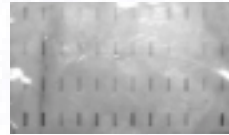


Fig. 1. Sonda problema.



Fig. 2. Sonda control.

Se secuenciaron algunas clonas dando los siguientes resultados:

- Glutación S-transferasa
- Prot. ABC transportadora
- Catalasa

Con la clona que contiene el fragmento similar al gen de glutación transferasa se realizó una cinética de expresión utilizando análisis Northern, dando el siguiente resultado.

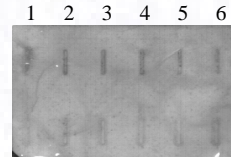


Fig. 3. Análisis Northern.

**Conclusiones.** Se cuenta con un banco sustractivo de 100 clonas de *A. niger* conteniendo fragmentos de genes inducidos con catequina. Glutación transferasa, una enzima inducible en presencia de flavonoides como la catequina, no presentó cambios en su nivel de expresión durante las primeras 6 h mostrando una disminución a partir de las 8 h de acuerdo a la hibridación tipo Northern.

**Agradecimiento.** Gracias a CONACYT y CONCyTEG por el apoyo económico otorgado.

### Bibliografía.

1. Haslam, E. (1989). *Plants Poliphenol. Cambridge University Press, Cambridge.*
2. Morris P., Robbins M. (1999). *Manipulating the chemical composition of plants. www.iger.bbsrc.ac.uk.*
3. Nishira, H., Mugibayashi, N. (1956). *Sci. Rep. Hyogo Univ. Agr. Ser. Agri. Chem. Ed. 2, 87.*