



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



IDENTIFICACIÓN DE GENES DE QUITINA DESACETILASAS EN *Colletotrichum acutatum* Y *Colletotrichum gloeosporioides*.

Facundo Muñiz^a, Patricia Larralde^b, José Narvaez^b, Keiko Shirai^{a*}

^a Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa; Depto. de Biotecnología, Lab. de Biopolímeros México D.F. C.P. 09340. ^b Centro de Biotecnología Genómica; Lab. Biotecnología Industrial, Cd. Reynosa, C.P. 88710

* smk@xanum.uam.mx

Palabras clave: quitina desacetilasas, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*.

Introducción. Las quitina desacetilasas (CDAs) son las enzimas que catalizan la desacetilación de la quitina, convirtiéndola en quitosano (1). El uso de CDAs ofrece la posibilidad de obtener oligómeros y polímeros de quitosano a diseño bien definidos a diferencia de los métodos químicos actuales. A pesar de la purificación de numerosas CDAs (1) ninguna ha sido aplicada a nivel industrial, debido a la baja desacetilación sobre quitinas de alto peso molecular. Por lo que investigar nuevas CDAs con alta actividad contra el polisacárido sigue siendo un reto. El objetivo de este trabajo fue identificar los genes CDAs de hongos fitopatógenos *Colletotrichum*.

Metodología. Se diseñaron cebadores con base a secuencias previamente reportadas de genes CDA de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Magnaporthe grisea* como sigue: CDAcoleF1 5'TCT....3', CDAcoleF2 5'TCT....3' y CDArev1 'TCT....3'. Las condiciones de amplificación fueron estándar con una temperatura de alineamiento de 56°C. Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1.8%. Los amplicones separados fueron recuperados y secuenciados directamente. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias previamente reportadas en las bases de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Resultados. En la Fig. 1 se muestran los productos de PCR con los diferentes juegos de cebadores utilizados. *C. acutatum* muestra bandas únicas de 500pb utilizando los 2 juegos de cebadores, bandas más nítidas se observan al utilizar el juego de cebadores CDAcoleF2/ CDArev1. *C. gloeosporioides* muestra numerosas bandas que se visualizan con mayor resolución al utilizar los cebadores CDAcoleF1/CDArev1.

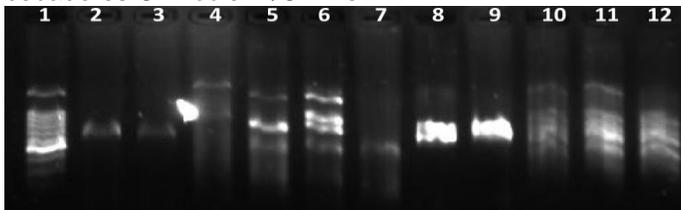


Fig. 1. Productos de amplificación PCR. 1) Marcador 100pb; 2 y 3) *C. acutatum* CDAcoleF2/ CDArev1; 4, 5 y 6) *C. gloeosporioides* CDAcoleF2/ CDArev1; 8 y 9) *C. acutatum* CDAcoleF1/ CDArev1; 10, 11 y 12) *C. gloeosporioides* CDAcoleF1/ CDArev1.

En la Fig. 2 se muestran bandas suficientemente nítidas y homogéneas, para llevar a cabo PCR de secuenciación y posteriormente la secuenciación de los productos.

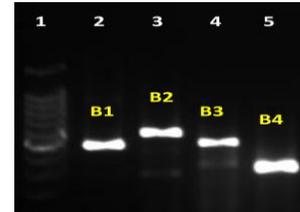


Fig 2. Verificación de los productos de amplificación de las bandas purificadas. 1) Marcador 100pb; 2) *C. acutatum* utilizando CDAcoleF2/ CDArev1; 3, 4 y 5) *C. gloeosporioides* utilizando CDAcoleF2/ CDArev1. La Tabla 1 muestra el análisis de las secuencias obtenidas comparadas con las reportadas en NCBI. La banda 1, perteneciente a *C. acutatum* mostró mayor similitud a una secuencia parcial del gen CDA de *C. lindemuthianum* (1) y menor similitud a CDAs de *Magnaporthe* spp. La banda 2 de *C. gloeosporioides* mostró mayor similitud a la secuencia de CDA de *M. grisea* (2) y menor con *M. oryzae* y a un gen de una carbohidrato esterasa de *F. solanii*, algunos autores han reportado homología de las CDA con acetil xilano esterasas (3). La banda 3 de *C. gloeosporioides* mostró similitud a un gen de la proteína del peroxisoma de *C. lagenarium* la cual parece ser necesaria para la penetración mediada por apresorios (4).

Tabla1. Análisis y comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos del NCBI.

Banda	Long. de la secuencia (pb)	Descripción de la secuencia homóloga	Máx. identidad	Genebank ID
B1	534	<i>C. lindemuthianum</i> gen parcial CDA	84%	AY633657.1
B2	594	<i>M. grisea</i> gen completo CDA	75%	AB535713.1
B3	427	<i>C. lagenarium</i> gen de proteína del peroxisoma PEX6	83%	AF343063.1

Conclusiones. Se identificó la secuencia parcial de genes hipotéticos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* que mostraron homología a genes CDAs previamente reportados.

Agradecimiento. Los autores de este estudio agradecen a CONACyT No. 105628 por el financiamiento otorgado y a Santander-ECOES por la beca a FM para realizar estancia en CBG-IPN.

Bibliografía.

- Shrestha B, Blondeau K, Stevens W, Hegarat F. (2004). *Protein Expr. Purif.* 38 (2): 196-204
- Murata S, Ohno Y, Nakajima Y y Kamakura T. (2009). Unpublished. GenBank AB535713.1
- Laurie J, Clarke J, Ciruela A, Faulds C. (1997). *FEMS Microbiol. Lett.* 148, 261-264.
- Kimura A, Takano Y, Furusawa I y Okuno T. (2001). *The plant cell.* 13: 1945-1957.