

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**



**Casa abierta al tiempo**

**Producción e identificación molecular de quitina desacetilasas en hongos  
fitopatógenos.**

**T E S I S**

para obtener el grado de

Maestro en Biotecnología

**P R E S E N T A**

Facundo Rafael Muñiz Paredes

Directora

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Julio 2012

**“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”**

**Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de SEP-CONACYT No. 105628.**

México D.F. a 25 de Julio del 2012.

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis  
Producción e identificación molecular de quitina desacetilasas en hongos fitopatógenos.  
que presentó

I.B.I. Facundo Rafael Muñiz Paredes.

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Asesora: Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino



Jurado:

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Secretario: Dr. Alberto López Luna

Vocal: Dra. Neith Aracely Pacheco López

Vocal: Dra. Claudia Patricia Larralde Corona



## RESUMEN

Las quitina desacetilasas (CDA) juegan un papel importante en el desarrollo de la pared celular y las interacciones planta-patógeno. Su acción es hidrolizar los enlaces N-acetamida de la quitina y producir su derivado desacetilado (quitosano). A pesar de los reportes de purificación de CDAs de hongos como *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea* y *Colletotrichum lindemuthianum*, no existe información sobre la producción de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Fusarium solani*. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de CDAs de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *F. solani* en cultivo líquido (CL) y cultivo sólido (CS). Por otra parte, tuvimos el interés de identificar molecularmente los genes CDA. Las cinéticas de actividad CDA en CL y CS (usando espuma de poliuretano (PUF) como soporte inerte) fueron llevadas a cabo utilizando un medio a base de ácido glutámico y glucosa. Las actividades CDA de los extractos crudos enzimáticos de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *F. solani* fueron determinadas espectrofotométricamente. Se realizó microscopia electrónica de barrido (SEM) con el fin de observar estructuras infectivas. La identificación molecular de los genes fue realizada por PCR usando oligonucleótidos diseñados en regiones consenso encontradas en genes CDA de *C. lindemuthianum* y *Magnaporthe grisea* reportados en Genbank. *C. gloeosporioides* mostró actividad CDA en ambos tipos de cultivos, pero la actividad CDA fue mayor en CL que en CS. *C. acutatum* y *F. solani* solo presentaron actividad cuando fueron cultivados en CS, pero estas actividades fueron menores a aquellas obtenidas con *C. gloeosporioides* en CL. La producción de CDAs con *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* en CS no fue significativamente diferente ( $\alpha \leq 0.05$ ). La caracterización microscópica mostró macroesporas de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *F. solani* con longitud y morfología típica. *C. gloeosporioides* y *F. solani* solo mostraron desarrollo de apresorios en CS; mientras que *C. acutatum* desarrolló apresorios tanto en CS como CL, se sabe que a la formación de apresorios es seguida la producción de CDAs en algunos hongos y son estructuras infectivas, lo cual podría explicar la falta de actividad CDA en *F. solani*; y en *C. acutatum* la falta de actividad CDA podría tratarse de un efecto de represión catabólica que se manifiesta de manera evidente en CL. Tanto *C. acutatum* como *C. gloeosporioides* fueron seleccionados para la identificación molecular de los genes CDA, la secuenciación de la banda B1 de *C. acutatum* mostró una máxima identidad del 84% y del 98% a un gen CDA de *C. lindemuthianum* usando las herramientas BLAST y TBLASTX, respectivamente,

mientras que la banda B2 de *C. gloeosporioides* mostro un 75% de máxima identidad a un gen CDA de *M. grisea* (BLAST) y un 71% de máxima identidad a una polisacárido desacetilasa de *C. graminícola* (BLASTX).

#### ABSTRACT

Chitin deacetylases (CDA) play an important role in the development of cell wall and plant-pathogen interactions. Its action is to hydrolyze the N-acetamide bonds in chitin to produce a deacetylated derivative (chitosan). Despite of reports on the purification of CDA from fungi *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea* and *Colletotrichum lindemuthianum*, there is no information so far about the production from *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* and *Fusarium solani*. Therefore, the aim of this work was to screen CDA production of *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* and *F. solani* in submerged (SmC) and solid state (SSC) cultures. On the other hand, we were interested on the molecular identification of CDA genes. Kinetics of CDA activity in SmC and SSC (using polyurethane foam (PUF) as an inert carrier) were carried out using glutamic acid and glucose base media. CDA was determined by spectrophotometry from crude enzyme of *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* and *F. solani*. Scanning electron microscopy (SEM) was done in order to observe infective structures. Molecular identification was done by PCR using primers designed from consensus regions found on *C. lindemuthianum* and *Magnaporthe griseae* reported CDA genes in the Genbank. *C. gloeosporioides* showed CDA activity in both cultures, but CDA activity was higher in SmC than that in SSC. *C. acutatum* and *F. solani* only presented CDA activities when cultured in SSC, but it was lower than that produced with *C. gloeosporioides*. CDA production with *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* in SSC were not significantly different ( $\alpha \leq 0.05$ ). Microscopical characterization showed the production of macrospores of *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* and *F. solani* with their typical morphology and length. *C. gloeosporioides* and *F. solani* showed appresoria only when cultured in SSC, while *C. acutatum* showed appresoria in both cultures, and these have been described as infective structures found in the beginning of CDA production. The development of appresoria requires spores and young hyphae in contact within hard surfaces; this might explain the lack of CDA activity when *F. solani* was cultivated in SmC, in *C. acutatum* the lack of activity could be due to a catabolite repression that is evident in SmC. Both *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* were selected for the CDA gene identification, sequencing of band B1 displayed 84%

and 98% of maximum identity to a CDA gene of *C. lindemuthianum* using BLAST and TBLASTX tool, respectively, while band B2 showed 75% of maximum identity to a CDA gene of *M. grisea* (BLAST) and 71% of maximum identity to a polysaccharide deacetylase of *C. graminicola* (BLASTX).

## Contenido

1. Introducción.....	12
1.1 Quitina y quitosano.....	12
1.2 Quitina desacetilasas (CDAs).....	14
1.2.1 Papel biológico de las CDAs.....	15
1.2.1.1 Síntesis de la pared de quitosano.....	15
1.2.1.2 Formación de la pared de la ascospora.....	15
1.2.1.3 Participación en la interacción planta patógeno.....	15
1.3 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>Fusarium solani</i> y <i>Aspergillus niger</i> .....	18
1.4 Cultivo Sólido y líquido.....	19
2. Antecedentes.....	22
3. Justificación.....	24
4. Hipótesis.....	24
5. Objetivos.....	24
5.1 Objetivo General.....	24
5.2 Objetivos Particulares.....	25
6. Metodología.....	25
6.1 Determinación de la producción de CDAs en cultivo sólido y líquido.....	25
6.1.1 Microorganismos.....	25
6.1.2 Cultivo líquido.....	25
6.1.3 Cultivo sólido.....	25
6.1.4 Determinación de proteína.....	26
6.1.5 Determinación de la actividad enzimática.....	26
6.1.6 Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	26
6.2 Identificación de genes de CDA.....	27
6.2.1 Diseño de Oligonucleótidos.....	27
6.2.2 Extracción de ADN genómico por la técnica fenol-cloroformo.....	28
6.2.3 Verificación cualitativa de la extracción de ADN.....	29

6.2.4	<b>Amplificación de los genes por PCR.</b>	29
6.2.5	<b>Purificación, amplificación y tratamiento de las bandas purificadas.</b>	34
6.2.6	<b>Secuenciación.</b>	34
7.	<b>Resultados y Discusión.</b>	36
7.1	<b>Determinación de la producción de CDAs en cultivo sólido y líquido.</b>	36
7.1.1	<b>Microscopía electrónica de barrido.</b>	45
7.2	<b>Identificación de genes de CDA.</b>	51
7.2.1	<b>Verificación cualitativa de la extracción de ADN.</b>	51
7.2.2	<b>Amplificación de los genes por PCR.</b>	51
7.2.3	<b>Purificación, amplificación y tratamiento de las bandas purificadas.</b>	55
7.2.4	<b>Secuencia de las bandas purificadas.</b>	58
8.	<b>Conclusiones.</b>	67
9.	<b>Referencias.</b>	68
10.	<b>ANEXOS</b>	79
10.1	<b>Curvas Patrón.</b>	79
10.1.1	<b>Curva de Proteína (Seroalbúmina bovina) determinada con microensayo de Bradford.</b>	79
10.1.2	<b>Curva de glucosamina (Kauss y Bauch; 1988).</b>	80
10.2	<b>Análisis estadístico.</b>	81
10.2.1	<b>Actividad CDA (U/gsi).</b>	81
10.2.2	<b>Actividad CDA (U/ml).</b>	83
10.2.3	<b>Actividad CDA (U/mg de proteína).</b>	85

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MODELO DE ESTRUCTURAS DE INFECCIÓN Y PERFIL ENZIMÁTICO DE <i>UROMYCES VICIAE-FABAE</i> (MENDGEN Y COL., 1996) .....	17
FIGURA 2. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE GENES DE <i>C. LINDEMUTHIANUM</i> Y <i>M. GRISAE</i> , MOSTRANDO LAS REGIONES DE SIMILITUD EN LA CUAL FUERON DISEÑADOS LOS OLIGONUCLEÓTIDOS, DENTRO DE LA REGIÓN CONSENSO HABÍAN 544 PB. ....	28
FIGURA 3. CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN: A) CS Y B) CL DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS. ....	37
FIGURA 4. CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA EN: A) CS Y B) CL DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS. ..	38
FIGURA 5. CINÉTICA DE ACTIVIDAD CDA EXPRESADA COMO U/GSI EN: A) CS Y B) CL DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS. VALORES CON LA MISMA LETRA NO PRESENTAN DIFERENCIA SIGNIFICATIVA A $\leq 0.05$ . ....	41
FIGURA 6. CINÉTICA DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA CDA EN: A) CS Y B) CL DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS. VALORES CON LA MISMA LETRA NO PRESENTAN DIFERENCIA SIGNIFICATIVA A $\leq 0.05$ .....	44
FIGURA 7. MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE BARRIDO DE <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> EN CL (A, C, E Y G) Y CS (B, D, F, Y H) A LAS 48 HORAS. LOS APRESORIOS SON SEÑALADOS CON FLECHAS AMARILLAS Y LA MATRIZ EXTRACELULAR CON FLECHAS VERDES. ....	46
FIGURA 9 MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE BARRIDO DE <i>C. ACUTATUM</i> EN CL (A, C, E Y G) Y CS (B, D, F, Y H) A LAS 24 HORAS: LAS ESPORAS SON SEÑALADAS CON FLECHAS ROJAS, LOS APRESORIOS SON SEÑALADOS CON FLECHAS AMARILLAS Y LA MATRIZ EXTRACELULAR CON FLECHAS VERDES. ....	48
FIGURA 10 MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE BARRIDO DE <i>F. SOLANI</i> EN CL (A, C, E Y G) Y CS (B, D, F, Y H) A LAS 24 HORAS. LOS APRESORIOS SON SEÑALADOS CON FLECHAS AMARILLAS Y LA MATRIZ EXTRACELULAR CON FLECHAS VERDES. ....	50
FIGURA 12. VERIFICACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ADNG DE <i>C. ACUTATUM</i> , <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> Y <i>F. SOLANI</i> 1) ADNG DE <i>C. ACUTATUM</i> ; 2) ADNG DE <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> ; 3) ADNG DE <i>F. SOLANI</i> . ....	51
FIGURA 13. AMPLIFICACIÓN CONDICIONES 1 (TABLA 3): 1) MARCADOR 100PB; 2) <i>C. ACUTATUM</i> F-CDA/R-CDA; 3) <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> F-CDA/R-CDA; 4) CONTROL (+) F-CDA/R-CDA; 5) CONTROL (-) F-CDA/R-CDA; 6) <i>C. ACUTATUM</i> F-DEG/R-CDA; 7) <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> F-DEG/R-CDA; 8) CONTROL (+) F-DEG/R-CDA; 9) CONTROL (-) F-DEG/R-CDA; 10) MARCADOR 100PB; 11) <i>C. ACUTATUM</i> ITS; 12) <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> ITS; 13) CONTROL (+) ITS; 14) CONTROL (-) ITS; 15) <i>C. ACUTATUM</i> 26S; 16) <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> 26S; 17) CONTROL (+) 26S; 18) CONTROL (-) 26S. ....	52
FIGURA 14. AMPLIFICACIÓN UTILIZANDO CONDICIONES 2 (TABLA 4) PARA <i>C. ACUTATUM</i> Y <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> : 1) MARCADOR 100PB; 2) <i>C. ACUTATUM</i> F-CDA/ R-CDA; 3) <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> F-CDA/R-CDA; 4) CONTROL (+) F-CDA/R-CDA; 5) CONTROL (-) F-CDA/R-CDA; 6) <i>C. ACUTATUM</i> F-DEG/R-CDA; 7) <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> F-DEG/R-CDA; 8) CONTROL (+) F-DEG/R-CDA; 9) CONTROL (-) F-DEG/R-CDA. ....	53
FIGURA 15. AMPLIFICACIÓN UTILIZANDO CONDICIONES 3 (TABLA 5) PARA <i>C. ACUTATUM</i> Y <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> : 1) MARCADOR 100PB; 2) <i>C. ACUTATUM</i> F-CDA/R-CDA; 3) <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> F-CDA/R-CDA; 4) CONTROL (+)F-CDA/R-CDA; 5) <i>C. ACUTATUM</i> F-DEG/R-CDA; 6) <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> F-DEG/R-CDA; 7) CONTROL (+)F-DEG/R-CDA; 8) CONTROL (-)F-DEG/R-CDA.....	53
FIGURA 16 AMPLIFICACIÓN UTILIZANDO LAS CONDICIONES 4 (TABLA 6) CON 100 NG/ $\mu$ L DE ADNG DE <i>F. SOLANI</i> Y DIFERENTES $T_A$ : 1) MARCADOR KB; 2) 57.2°C; 3) 59.6°C; 4) 61.1°C; 5) 63.2°C; 6) 65.6°C; 7) 66.6°C. ....	54
FIGURA 17 AMPLIFICACIÓN UTILIZANDO LAS CONDICIONES 4 (TABLA 6) VARIANDO LA CONCENTRACIÓN DE ADNG DE <i>F. SOLANI</i> Y CON LAS 3 MEJORES $T_A$ : 1) MARCADOR 1KB; 2) 150 NG/ $\mu$ L / 59.6°C; 3) 150 NG/ $\mu$ L / 61.1°C; 4) 150 NG/ $\mu$ L / 63.2°C; 5) 200 NG/ $\mu$ L / 59.6°C; 6) 200 NG/ $\mu$ L / 61.1°C; 7) 200 NG/ $\mu$ L / 63.2°C. ....	55

FIGURA 18. CONTENIDO TOTAL DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DE <i>C. ACUTATUM</i> Y <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> UTILIZANDO LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN 3: 1) MARCADOR 100PB, 2) <i>C. ACUTATUM</i> F-DEG/R-CDA; 3) Y 4) <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> F-DEG/R-CDA. ....	56
FIGURA 19. VERIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DE LAS BANDAS PURIFICADAS DE <i>C. ACUTATUM</i> Y <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> . 1) MARCADOR 100PB; 2) <i>C. ACUTATUM</i> UTILIZANDO OLIGONUCLEÓTIDOS F-DEG/R-CDA; 3), 4), Y 5) <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i> UTILIZANDO OLIGONUCLEÓTIDOS F-DEG/R-CDA. ....	56
FIGURA 20 CONTENIDO TOTAL DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE <i>F. SOLANI</i> UTILIZANDO LAS CONDICIONES 4 (TABLA 6) CON 200 NG/ $\mu$ L Y T <sub>A</sub> DE 63.2°C. SE SEÑALAN CON FLECHAS AMARILLAS BANDAS DE MENOR TAMAÑO E INTENSIDAD QUE NO SE UTILIZARON PARA SECUENCIACIÓN. ....	57
FIGURA 21 VERIFICACIÓN DE LA PURIFICACIÓN DE LA BANDA DE <i>F. SOLANI</i> ; LA MUESTRA FUE CONCENTRADA A APROXIMADAMENTE 20 $\mu$ L DE VOLUMEN FINAL: 1) MARCADOR 1KB; 2) BANDA B5 PURIFICADA Y CONCENTRADA. ....	58
FIGURA 22 CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD. ....	79
FIGURA 23 CURVA PATRÓN DE GLUCOSAMINA PARA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CDA POR EL MÉTODO DE KAUSS Y BAUCH (1988). ....	80

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1 APLICACIONES DE LOS POLÍMEROS Y OLIGÓMEROS DE QUITOSANO. ....	13
TABLA 2. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS. ....	28
TABLA 3. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN 1 PARA <i>C. ACUTATUM</i> Y <i>C. GLOESPORIOIDES</i> , COMPONENTES DE LA REACCIÓN. ....	30
TABLA 4 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN 2 PARA <i>C. ACUTATUM</i> Y <i>C. GLOESPORIOIDES</i> , COMPONENTES DE LA REACCIÓN. ....	31
TABLA 5 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN 3 PARA <i>C. ACUTATUM</i> Y <i>C. GLOESPORIOIDES</i> , COMPONENTES DE LA REACCIÓN. ....	32
TABLA 6 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN 4 PARA <i>F. SOLANI</i> , COMPONENTES DE LA REACCIÓN. ....	33
TABLA 7. COMPONENTES DE LA REACCIÓN DE PCR DE SECUENCIACIÓN.....	35
TABLA 9. COMPARACIÓN DE LOS MÁXIMOS PICOS DE ACTIVIDAD CDA EXPRESADOS EN U/ML DE CL Y CS. ....	42
TABLA 11. COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS CON LA BASE DE DATOS DEL NCBI UTILIZANDO LA HERRAMIENTA BLAST. ....	61
TABLA 12. COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS CON LA BASE DE DATOS DEL NCBI UTILIZANDO LA HERRAMIENTA BLASTX.....	64
TABLA 13. COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS CON LA BASE DE DATOS DEL NCBI UTILIZANDO LA HERRAMIENTA TBLASTX. ....	66
TABLA 14 DESCRIPTIVOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ACTIVIDAD CDA EXPRESADA COMO U/GSI.....	81
TABLA 15 ANOVA DE ACTIVIDAD CDA EXPRESADO COMO U/GSI. ....	81
TABLA 16 PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY PARA ACTIVIDAD CDA EXPRESADA COMO U/GSI. ....	82
TABLA 17 DESCRIPTIVOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ACTIVIDAD CDA EXPRESADA COMO U/ML.....	83
TABLA 18 ANOVA DE ACTIVIDAD CDA EXPRESADA COMO U/ML. ....	83
TABLA 19 PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY PARA ACTIVIDAD CDA EXPRESADA COMO U/ML. ....	83
TABLA 20 DESCRIPTIVOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA CDA (U/MG DE PROTEÍNA). ....	85
TABLA 21 ANOVA DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA CDA (U/MG DE PROTEÍNA).....	85
TABLA 22 PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY PARA ACTIVIDAD ESPECÍFICA CDA (U/MG DE PROTEÍNA) .....	86

## 1. Introducción.

### 1.1 Quitina y quitosano.

La quitina es un biopolímero formado por residuos de *N*-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces  $\beta(1-4)$ . Es encontrado comúnmente en exoesqueletos y cutículas de muchos invertebrados y en las paredes celulares de la mayoría de los hongos, es considerada como el segundo biopolímero más abundante, además de ser de fácil obtención y renovable. Una de las principales desventajas de la quitina es su alta cristalinidad, lo cual la hace un material extremadamente insoluble en soluciones acuosas y solventes orgánicos, limitando esto sus aplicaciones (Tsigos y col., 2000).

La quitina es producida a partir de desechos de cangrejo y camarón por un proceso termoquímico, en el cual se desproteinizan los desechos bajo condiciones alcalinas y posteriormente son desmineralizados para remover el  $\text{CaCO}_3$ , bajo condiciones acidas; se han reportado métodos biológicos para la obtención de quitina (Cira y col. 2002). Algunos trabajos han estudiado la producción de quitina a partir de hongos, este método presenta la ventaja de no requerir desmineralización (White y col. 1979).

El quitosano (la forma desacetilada de la quitina) es un biopolímero, que puede encontrarse naturalmente en las paredes celulares de algunos hongos, particularmente en el grupo de los Zigomicetos (Chatterjee y col. 2008) o es obtenido por la *N*-desacetilación de la quitina, es soluble en soluciones acuosas y mucho más manejable con un gran número de aplicaciones reportadas (

Tabla 1).

Tabla 1 Aplicaciones de los polímeros y oligómeros de quitosano.

Aplicación	Ejemplo	Referencia.
Tratamiento de aguas	Atrapamiento de cromo en esferas de quitosano	Liu y col., 2010
	Remoción de metales pesados como cadmio, cobre, y plomo de aguas clarificadas	Rangel y col., 2009
Agricultura y alimentos	Biopelícula retensora de la humedad en frutos.	Martínez y col., 2009
	Uso de recubrientes con quitosano para la protección de aminoácidos	Chiang y col., 2009
	Activador del sistema inmune vegetal.	Yin y col., 2010
Antimicrobiano	Actividad antibacterial contra <i>E. coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	Chung y Chen, 2008.
	Actividad sinérgica de quitosanos y EDTA en la inhibición de bacterias Gram positivas y negativas y <i>C. albicans</i>	El-Sharif y Hussain, 2011
	Disminuyendo la esporulación y biomasa de <i>P. chrysogenum</i> y <i>E. coli</i> respectivamente al ser entrecruzados con textiles de celulosa.	Alonso y col., 2009
Biomédicas o Farmacéuticas	Microesferas de alginato-quitosano como vector en la administración oral de insulina	Zhang y col., 2011
	Los compositos de quitosano aumentan favorablemente las respuestas bioquímicas en la recuperación de tejido óseo.	Muzzarelli, 2011
	Adhesivo de quitosano con vancomicina para la cicatrización de heridas y prevención de infecciones post-quirúrgicas.	Foster y col., 2010

En la N-desacetilación de la quitina se utiliza un método termoquímico en el cual la quitina es tratada con soluciones calientes de álcali, con este método se obtienen quitosanos con un grado de desacetilación del 85 al 93% (Chang y col., 1997). Este método tiene la desventaja de dar origen a productos de variado grado de acetilación y bajo peso molecular, además de que desechan al ambiente soluciones concentradas de álcali.

Se ha estudiado la obtención de quitosano a partir de hongos, presentando las ventajas de obtener quitosanos libres de proteínas alergénicas y poder controlar el peso molecular y grado de acetilación variando las condiciones de fermentación (Nwe y Stevens, 2002; Chatterjee y col. 2008).

Las aplicaciones de la quitina y el quitosano están determinados principalmente por su peso molecular, grado de acetilación y pureza, es por esto que el control de estas características durante su obtención es importante.

Con el fin de superar las desventajas de los métodos termoquímicos se ha propuesto el uso de un método enzimático, utilizando las enzimas quitina desacetilasas las cuales fueron identificadas por primera vez en el hongo *Mucor rouxii* (Araki e Ito, 1975). La alta cristalinidad de la quitina y por lo tanto baja solubilidad en soluciones acuosas, no permiten el acceso de la enzima, por lo que el método enzimático se ha visto limitado, debido a su baja eficiencia de desacetilación. Sin embargo el tratamiento de quitinas a formas más solubles plantean una alternativa a estos problemas (Ramírez-Coutiño y col., 2006).

### **1.2 Quitina desacetilasas (CDAs).**

Las CDAs (EC 3.5.1.41) hidrolizan el grupo acetamido en las unidades *N*-acetilglucosamina de la quitina o el quitosano, generando unidades de glucosamina y ácido acético; son consideradas miembros de la familia de las carbohidrato esterasas (Zhao y col., 2010). Los miembros de esta familia comparten una región conservada denominada NodB, debido a su alta homología con las proteínas NodB de las bacterias del genero *Rhizobium*, género que interactúa de forma simbiótica con plantas leguminosas, lo que da origen a la formación de nódulos en la raíz, en los cuales las bacterias fijan nitrógeno (John y col, 1993). Las proteínas NodB tienen actividad desacetilasa sobre quitooligosacaridos.

Las CDAs han sido purificadas y caracterizadas en numerosos hongos, siendo las mejor estudiadas las de *Mucor rouxii* (Araki e Ito, 1975; Kafetzopoulos y col., 1993) y *Colletotrichum lindemuthianum* (Tsigos y Bouriotis, 1995; Tokuyasu y col., 1996). Las CDAs también han sido identificadas en bacterias del familia *Vibrionaceae* y en algunos insectos (Toprak y col., 2008; Arakane y col., 2009).

### **1.2.1 Papel biológico de las CDAs.**

Las enzimas se han encontrado de forma intracelular y extracelular, dependiendo su ubicación se le ha atribuido un papel biológico. Han sido propuestos tres principales papeles biológicos para las enzimas CDAs en hongos.

#### **1.2.1.1 Síntesis de la pared de quitosano.**

La biosíntesis de la pared celular de quitosano en *Mucor rouxii* es llevada a cabo por la acción coordinada de la quitina sintasa y la CDA, mientras que la quitina sintasa polimeriza residuos de *N*-acetil-D-glucosamina a partir del sustrato activado, uridina 5-difosfo-*N*-acetil-D-glucosamina, la CDA hidroliza el enlace *N*-acetamido de las cadenas nacientes de quitina, actuando de manera más eficiente en la quitina naciente que en una quitina microfibrilar formada previamente (Davis y Bartnicki, 1984). Este papel biológico es evidente por la localización de CDAs de *Absidia coerulea* (Gao y col., 1995) que se encuentra en la región periplásmica, donde ha sido reportada la presencia de la quitina sintasa (McMurrough y col., 1971).

#### **1.2.1.2 Formación de la pared de la ascospora.**

En *Saccharomyces cerevisiae*, se identificaron dos genes que son necesarios durante el periodo de esporulación de la levadura, la formación de la ascospora requiere la actividad coordinada de dos enzimas CDA. Se produjeron mutantes con los genes dañados de estas enzimas que presentaron la misma capacidad de esporulación y una morfología idéntica a las esporas silvestres, sin embargo eran relativamente sensibles a las enzimas hidrolíticas  $\beta$ -glucuronidasa y  $\beta$ -glucuronido sulfatasa las cuales son utilizadas para el rompimiento de la pared celular de levaduras, dietiléter y se observó que las esporas mutantes tenían una viabilidad dos órdenes de magnitud menor cuando eran expuestas a 55°C durante 40 minutos comparadas con las esporas silvestres; estos resultados indican que la acción de las CDAs en la formación de la pared celular en *S. cerevisiae* les confiere resistencia a condiciones de estrés (Christodoulidou y col., 1996).

#### **1.2.1.3 Participación en la interacción planta patógeno.**

Los oligómeros de quitina de 4 a 6 unidades pueden activar los mecanismos de defensa por lignificación de las plantas, mientras que los oligómeros de quitosano no activan una

respuesta de lignificación significativa por parte de la planta (Barber y col., 1989), de igual forma en hojas de trigo (*Triticum aestivum*) oligómeros de quitina con un grado de polimerización  $\geq 7$  aumentaron la actividad peroxidasa, mientras que oligómeros de quitosano no fueron activadores de la peroxidasa, las enzimas peroxidasa y fenilalanina amonio-liasas están relacionadas con la lignificación inducida, el cual es un proceso que permite el engrosamiento de la pared celular de las plantas y dificulta la penetración de los hongos y/o otros patógenos (Moerschbacher y col., 1988; Vander y col., 1998). Sin embargo algunos estudios señalan que también quitosanos, sobre todo de alto peso molecular, tienen respuestas de defensa por parte de las plantas, quitosanos de un peso molecular de  $10^6$  Da inducen la formación de callosa en *Catgarantus roseus*, la callosa permite el engrosamiento y reforzamiento de la pared celular de las células vegetales (Kauss y col., 1989), de forma similar los polímeros de quitosano si fueron activadores de la peroxidasa, así como la fenilalanina amonio-liasas, siendo mayor la activación con polímeros de grado de acetilación medio (35-60%). De acuerdo con Tsigos y Bouriotis (1995), las endoquitinasas de plantas que se pueden producir constitutivamente y/o aquellas del hongo podrían liberar oligómeros de quitina de la pared celular de *C. lindemuthianum*; estos oligómeros podrían actuar como activadores de la síntesis de callosa, lignina y otras sustancias de defensa, dado que la CDA de *C. lindemuthianum* es extracelular podría convertir los oligómeros a su forma desacetilada, disminuyendo así la activación de la defensa vegetal, además la desacetilación de la quitina de la pared celular podría proporcionarle al hongo resistencia a la degradación por las quitinasas vegetales ya que el quitosano no es un buen sustrato para las quitinasas.

El Gueddari y col. (2002) mostraron en los hongos *Puccinia graminis*, *Uromyces fabae* y *Colletotrichum graminicola*, mediante estudios de fluorescencia con lectinas específicas para quitina y anticuerpos específicos a quitosano, la presencia de quitina en túbulos germinales y apresorios de los hongos (estructuras que solo se encuentran en superficies de la cutícula de la planta) y de quitosano en estructuras especializadas formadas sólo después de invadir al huésped, los mismos autores señalan que la diferenciación de las estructuras infectivas debe ser inducida por la percepción de señales provenientes de la planta.

Las estructuras infectivas de los hongos fitopatógenos se consideran como hifas modificadas, especializadas en la invasión de los tejidos vegetales, en *Colletotrichum* spp. y *Magnaporthe grisea* producen túbulos germinales que tienen la función de percibir la superficie, secretar enzimas degradadoras de la pared celular vegetal y de ejercer presión

sobre el sustrato donde crece (Kwon y col. 1991), posteriormente estos túbulos germinales se desarrollan en apresorios bien diferenciados. Las señales químicas como iones potasio y calcio, azúcares simples, gradientes de pH y de temperatura inducen la formación de apresorios (Hoch y Staples, 1991). Las principales señales que provienen del huésped son la hidrofobicidad, dureza, componentes de la superficie vegetal y las propiedades topográficas. El etileno es una señal para la germinación y diferenciación de *Colletotrichum gloeosporioides* en tomate (Flaishman y Kolattukudy, 1994) y algunas ceras epiculares de alcoholes alifáticos de 24-32 carbonos también han sido reportadas como señales químicas que inducen la formación de apresorios, se evaluaron otras ceras de frutos que no son hospederos naturales de *C. gloeosporioides* y se encontró que estas ceras no inducían la formación de apresorios (Podila y col., 1993). Las superficies duras como el vidrio o el plástico también propician la formación de apresorios en *C. graminicola* (El Gueddari y col. 2002). En *C. lagenarium* (Siegrist y Kauss, 1990) y *Uromyces viciae-fabae* (Deising y Siegrist, 1995) ha sido reportado el incremento de actividad CDA a partir del desarrollo de apresorios (Figura 1), los autores también proponen que la actividad de la enzima podría modificar la superficie de la hifa de penetración y protegerla de la degradación de endoquitinasas vegetales y que los productos de degradación de la quitina podrían reducir las reacciones de defensa de las plantas.

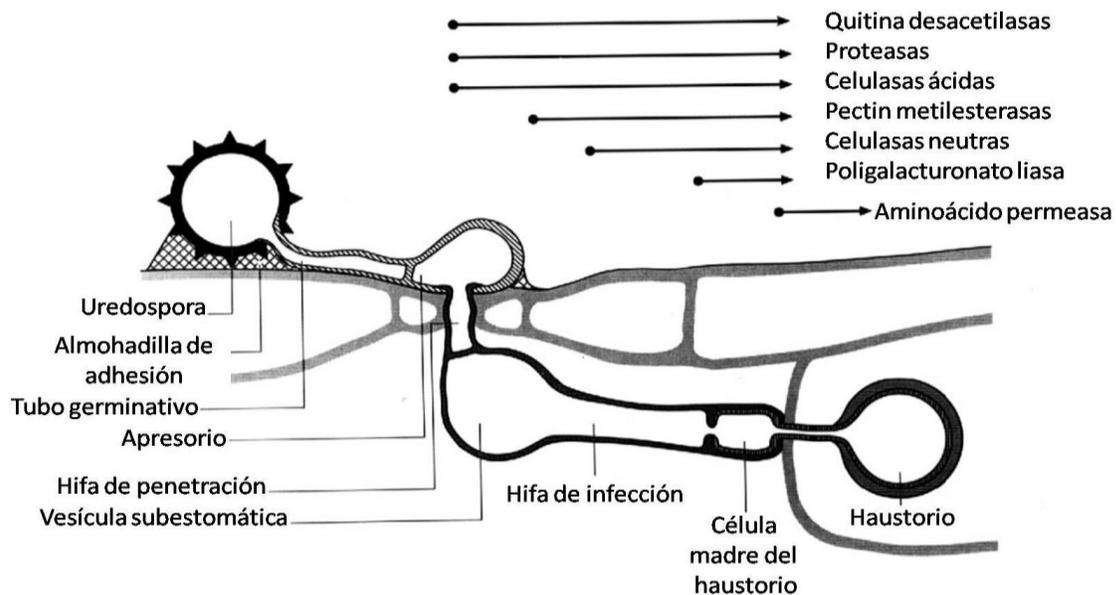


Figura 1. Modelo de estructuras de infección y perfil enzimático de *Uromyces viciae-fabae* (Mendgen y col., 1996)

### **1.3 *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium solani* y *Aspergillus niger*.**

El género *Colletotrichum* pertenece a los hongos ascomicetos, conteniendo especies que son muy patogénicas a las plantas, causando significantes daños económicos a los cultivos tropicales, subtropicales y regiones templadas (Wharton y Diéguez, 2004). El género es conocido como causante de la enfermedad conocida como antracnosis, la cual se considera un problema serio en las regiones cítricas. Actualmente, la identificación de las especies del género se basa principalmente en la morfología, el rango de hospedantes y el modo de parasitismo. La mayoría de los reportes recientes indican que la especialización del hospedante es un criterio taxonómico (Wharton y Diéguez, 2004). El ciclo de vida de las especies de *Colletotrichum* comprende un estado asexual anomorfo como *Colletotrichum* y uno sexual teleomorfo como *Glomerella*. Tres formas de *Colletotrichum* son reconocidas en los cítricos, la forma gris y de crecimiento rápido, la forma de crecimiento lento color naranja, que es el agente causal de la caída del fruto pequeño y la forma que provoca la antracnosis de limón Mexicano (Brown y col., 1996). *Colletotrichum gloeosporioides* causa antracnosis en frutos de cítricos y es un saprobio común en plantaciones de cítricos, mientras que *Colletotrichum acutatum* infecta pétalos de flores y causa la caída del fruto pequeño (Timmer y col., 1998), y posee los dos tipos de estrategias de infección descritas para el género *Colletotrichum*, intracelular hemibiotrófica y subcuticular – intramural necrotrofica, puede incluso establecer un periodo de latencia con la finalidad de hacer frente a los mecanismos de defensa del hospedante, *Colletotrichum acutatum* generalmente inverna como micelio y/o apresorios en distintas partes del hospedante (Wharton y Diéguez, 2004).

El género *Fusarium* comprende un grupo amplio y heterogéneo de hongos importantes para la industria de alimentos, farmacéutica, agrícola y en medicina. *Fusarium solani* o su estado sexual telomorfo *Nectria haematococca* es un hongo fitopatogénico y es un agente causal importante de numerosas enfermedades de cultivos, como la putrefacción de raíces y frutos de *Cucurbita* spp (calabaza), putrefacción de raíces y tallos de chicharos, el síndrome de muerte repentina en soya. En un medio de agar papa dextrosa, *F. solani* produce un micelio abundante, blanco y cremoso, mientras que las macroconidias tienen de tres a cuatro septas, son ligeramente curvadas, alargadas y gruesas (Aoki y col., 2003).

Algunas especies del genero *Aspergillus* son reconocidas como los hongos más ampliamente distribuidos en alimentos, suelos y otros materiales, además algunas especies producen micotoxinas como *Asperillus flavatus* que produce la aflatoxina B<sub>1</sub>, reconocida como la sustancia natural más carcinogénica. *Aspergillus niger* es un hongo filamentoso de interés industrial debido a sus variada producción de enzimas y metabolitos secundarios. También es conocido como un agente fitopatógeno causante de decoloración, deterioro de semillas y pudrición de semillas y frutos de interés industrial como cebollas (Ozer, 2011) y plantas de soya (Malenčić y col., 2012)

#### **1.4 Cultivo Sólido y líquido.**

La mayoría de las enzimas producidas a escala industrial son producidas en cultivo líquido (CL) debido a las ventajas que proporciona este tipo de cultivo como el control de temperatura, pH, O<sub>2</sub> y concentración y disponibilidad de sustratos; sin embargo existe un interés creciente sobre la producción de enzimas y metabolitos en cultivo sólido (CS), sobre todo de hongos, algunas de las ventajas citadas en la bibliografía sobre este tipo de cultivo son mayores productividades, concentración final de productos y estabilidad, menor represión catabólica y menor demanda de esterilidad debido a la baja actividad de agua (Hölker y col., 2004).

El agua libre no parece ser el medio natural para el desarrollo de microorganismos, la evolución de los hongos superiores tomo lugar en sustratos sólidos y solo algunas especies se adaptaron para vivir en el agua; por lo que el cultivo de microorganismos en medio líquido podría ser considerado como una violación al hábitat natural. El CS se define como el cultivo de microorganismos en soportes sólidos húmedos, ya sean en soportes inertes como el poliuretano y la agrolita (De Santiago, 2011), o sustratos insolubles que pueden ser utilizados como fuentes de carbono y nitrógeno (Suresh y col., 2011), el cultivo se lleva a cabo cerca o en ausencia de agua libre.

Las principales ventajas del CS son consecuencia de la diferente fisiología mostrada por los hongos y otros microorganismos cuando crecen en sustratos y soportes sólidos, en relación a cuando lo hacen en CL (Barrios-González, 2012). No se conocen por completo las causas moleculares y fisiológicas de estos diferentes comportamientos, pero existen trabajos que

han contribuido al entendimiento de estas diferencias. A continuación se discuten algunas de las razones por las que se obtienen mayor productividad de enzimas fúngicas en CS:

- a) Mayor productividad debido a mayor producción de biomasa: la producción de muchas enzimas está relacionada con la etapa de crecimiento de los microorganismos, esta mayor producción de biomasa puede explicarse por la eficiencia biosintética alcanzada debido a los altos niveles de oxigenación que permite el CS, a diferencia del CL donde se sabe que la solubilidad del oxígeno es baja en medios líquidos y si se quiere superar este inconveniente es necesario la administración de oxígeno puro y agitación lo cual incrementa considerablemente los costos de la producción de enzimas (Viniestra-González y col., 2003).
- b) Mayor productividad debido a menor proteólisis: en la producción de enzimas las proteasas son consideradas indeseables debido a que rompen las proteínas de interés, algunos trabajos han mostrado una menor cantidad de proteasas en CS, por lo que la proteína de interés puede mantenerse estable por mayor tiempo (Díaz-Godínez y col., 2001).
- c) Menores niveles de represión catabólica: en la producción de algunas enzimas, algunos sustratos que son frecuentemente utilizados por ser baratos o de fácil asimilación tienen la desventaja de reprimir catabólicamente el metabolito o enzima de interés, en la producción de exopectinasas el CL se ve reprimido a concentraciones de sacarosa de 50 g/L sin embargo a esta concentración el CS no se ve afectado (Díaz-Godínez y col., 2001)
- d) Morfología: Muchos hongos filamentosos producen generalmente agregados semiesféricos conocidos como pellets cuando son cultivados en CL, mientras que cuando se utiliza soportes como la espuma de poliuretano (PUF) se forman agregados de micelio en la matriz del soporte, se ha calculado que la superficie de biomasa en el CS está en contacto con la interface aire-líquida en una área hasta 400 veces mayor frente al CL. Estos cambios morfológicos tienen un efecto sobre el intercambio gaseoso y de sustratos en el microorganismo, que contribuyen a la explicación sobre la mayor producción de biomasa.

Además de la mayor productividad de enzimas y catabolitos secundarios, se sabe que ciertas enzimas como la glucoamilasa B de *Aspergillus oryzae* (Ishida y col., 2000), las esporas de *Coniothyrium minutans* utilizadas en el biocontrol de hongos fitopatógenos (de

Vrije y col. 2001) y algunos antibióticos como acremonidinas y pirrocidinas (Bigelis y col., 2006) se producen exclusivamente cuando los microorganismos son cultivados en CS.

Wang y col. (2010) realizaron una comparativa de perfiles de expresión en CS y CL de *Aspergillus oryzae* encontrando 4628 genes expresándose de manera diferente entre ambos tipos de cultivo, específicamente 2355 genes estaban sobrerregulados y 2273 subregulados; algunos de los genes sobrerregulados estaban involucrados funciones como en las rutas ribosomales, replicación del ADN, fosforilación oxidativa y con el ciclo de ácidos tricarboxílicos, los autores deducen que *A. oryzae* altera de manera drástica su perfil de expresión en respuesta al tipo de cultivo y que las capacidades de traducción y modificaciones postraduccionales de proteínas y producción de energía es mucho mayor en CS.

## 2. Antecedentes.

Kafetzopoulos y col. (1993) aislaron el primer ADNc de la CDA de *Mucor rouxii* para ello diseñaron oligonucleótidos utilizando la secuencia final de aminoácidos de la enzima previamente purificada y secuenciada; el gen fue caracterizado, secuenciado y se obtuvo la secuencia de aminoácidos deducidos. Se encontraron notables similitudes en la secuencia proteica con las proteínas NodB en las regiones centrales de la proteína deducida.

Christodoulidou y col. (1996) identificaron y clonaron dos genes CDA de *Saccharomyces cerevisiae* y determinaron que la expresión de estos genes era necesaria para la biosíntesis de quitosano en las paredes de las ascosporas y está restringida a distintos periodos durante la esporulación. La expresión desregulada de los genes CDA (transformando la levadura con copias del gen puestas corriente abajo del promotor GAL1) no mostró ningún efecto sobre la viabilidad de las células. Mediante mutaciones dirigidas determinaron que solo las dos CDAs identificadas son las responsables de toda la actividad desacetilasa en la levadura y que ambos genes contribuyen de manera igualitaria. En un trabajo posterior, los autores determinaron las propiedades bioquímicas de las CDA identificadas (Christodoulidou y col., 1999).

Tokuyasu y col. (1999) secuenciaron el gen CDA de *C. lindemuthianum* y realizaron la expresión heteróloga del gen en *E. coli*; para la clonación del gen diseñaron oligonucleótidos basados en la secuencia de aminoácidos terminales de la proteína que previamente habían purificado y caracterizado; la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de ADN obtenida reveló una identidad y similaridad del 25.8 y 46.4% respectivamente a la CDA de *M. rouxii*; las diferencias encontradas en las secuencias podrían ser responsables de las propiedades únicas de cada una de las enzimas. Al momento de clonar el gen agregaron una etiqueta que codificaba para 6 residuos de histidina para facilitar la purificación de la enzima recombinante. La proteína recombinante pudo ser obtenida después de incubar células de *E. coli* por un día y con una recuperación de 36.5 U/l de medio siendo mayor la actividad y menor el tiempo de cultivo, comparado con los 18 días que requerían cultivar a *C. lindemuthianum* y obteniendo un rendimiento final de 1.53 U/l. Shrestha y col., (2004) secuenciaron otro gen de *C. lindemuthianum* y lo expresaron en *Pichia pastoris*; el diseño de oligonucleótidos se realizó con base a la secuencia del ADNc reportado por Tokuyasu y col. (1999) el fragmento de ADN amplificado mostró una identidad del 98% al reportado por

Tokuyasu (1999), hasta quince diferencias en los codones fueron observadas, 7 de los codones codificaban al mismo aminoácido y solo 8 confirieron cambios de aminoácidos, se descartó que la diferencia en los codones se debieran a errores por PCR, dichos cambios podrían tener un efecto en la eficiencia de secreción de la enzima; sin embargo las actividades específicas fueron comparables en los supernadantes, de la misma forma que los autores anteriores agregaron una etiqueta de seis residuos de histidina para facilitar la purificación de la enzima. Gauthier y col. (2008) realizaron la expresión heteróloga en *Pichia pastoris* de tres genes para CDA de *R. circicans* siendo solo una de las enzimas activas.

Se ha estudiado la producción de CDAs de *C. lindemuthianum* en CS utilizando dos tipos de soportes: desechos de camarón y salvado de trigo adicionado con quitosano (Suresh y col. 2011), se reportaron 392 U/gsi a las 192 horas y 460 U/gsi a las 96 horas respectivamente. Se observó que el rendimiento de la enzima decaía cuando se pasaba el tiempo óptimo de incubación del hongo probablemente debido a la acción de proteasas, y que era de 6 a 25 veces mayor a otros reportes donde se ha realizado la purificación de la enzima (Tsigos y Bouriotis, 1995) sin embargo los medios utilizados no son los mismos. Los autores mencionan que la diferencia en los tiempos de máxima actividad entre ambos tipos de sustrato se debe a la naturaleza física y la capacidad de retener agua; en el caso del desecho de camarón el tiempo más largo de cultivo se podría deber a la naturaleza compleja y nutricionalmente inerte del mismo (altas concentraciones de minerales de dificultan la asimilación de nutrientes) y por otro lado el menor tiempo de incubación en el salvado de trigo se podría deber a la adición de quitosano. También se reportó que la morfología de crecimiento tanto macroscópica y microscópica fue diferente en los dos soportes utilizados.

De Santiago (2011) realizó la selección de hongos fitopatógenos productores de CDA en CL, seleccionando a *C. gloeosporioides* M7T5, determino la producción de esta enzima en CS evaluando el efecto de la relación C/N determinando que la mejor relación era de 13.8. Estudio además el efecto de la adición de quitosano, glucosamina, N-acetilglucosamina, y tres fitohormonas como inductores de la actividad CDA, y determino que las fitohormonas ácido giberélico y abscísico mostraron la mayor inducción. Además se realizaron zimogramas de los extractos enzimáticos obtenidos utilizando las dos fitohormonas seleccionadas y observó dos bandas con actividad CDA.

### **3. Justificación.**

El quitosano y sus oligómeros tiene numerosas aplicaciones a nivel industrial, sin embargo se han visto limitados debido a las desventajas que presenta su obtención por los métodos químicos actuales, donde la principal problemática son el bajo peso molecular y variado grado de acetilación.

Los métodos enzimáticos, utilizando las CDAs presentan las ventajas de obtener quitosanos de peso molecular mayor y oligómeros de grado de acetilación bien definido. Existen numerosos reportes acerca de la producción de estas enzimas en cultivo líquido, sin embargo su producción en cultivo sólido es escasa, un estudio más detallado sobre la producción de estas enzimas en cultivo sólido y líquido podría mejorar los rendimientos de la enzima el cual podría contribuir a futuros trabajos en los que se busque realizar la purificación de la enzima. Además es importante mencionar que hasta el momento ninguna CDA ha obtenido resultados notables en la desacetilación de quitinas de alto peso molecular, por lo que la búsqueda de nuevas enzimas con alta actividad desacetilasa en sustratos de alto peso molecular sigue siendo un reto importante.

Así mismo la identificación y estudio de los genes CDA puede contribuir a la mejora de los rendimientos de la enzima en futuros trabajos donde la clonación y transformación homóloga y/o heteróloga de microorganismos aumenten los rendimientos obtenidos y facilite procesos posteriores de purificación.

### **4. Hipótesis.**

Las técnicas de cultivo en medio sólido y líquido tendrán un efecto sobre la producción de CDAs en hongos fitopatógenos. Será posible la identificación de genes CDA a partir del diseño de oligonucleótidos de secuencias de otros genes CDAs reportados previamente.

### **5. Objetivos.**

#### **5.1 Objetivo General.**

Estudiar el efecto del tipo de cultivo sobre la producción de CDAs en hongos fitopatógenos.

## **5.2 Objetivos Particulares.**

- Determinar la producción de CDA en cultivo líquido y sólido.
- Seleccionar las cepas con mayor producción de CDA.
- Identificar los genes de CDA en las cepas seleccionadas.

## **6. Metodología.**

### **6.1 Determinación de la producción de CDAs en cultivo sólido y líquido.**

#### **6.1.1 Microorganismos.**

Las cepas que se emplearon fueron, *Colletotrichum gloeosporioides* (MTT5), *Colletotrichum acutatum* (CBG-6), *Fusarium solani* (CBG) y *Asperillus niger* (NRRL3-USDA). Los hongos seleccionados fueron mantenidos y propagados en agar papa-dextrosa. Las suspensiones de esporas fueron obtenidas por agitación con una solución estéril de Tween 80 al 1%.

#### **6.1.2 Cultivo líquido.**

Se realizó en matraces que contenían 50 ml de un medio que contenía 15 g de glucosa, 6.6 g de ácido glutámico, 1g de  $K_2HPO_4$ , 0.5 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.8 mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 mg de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.3 mg de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.4 mg de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 1 mg de tiamina y 1mg de ácido nicotínico por litro de agua desionizada (Tsigos y Bouriotis, 1995). El medio fue inoculado a  $1 \times 10^6$  esp/ml, e incubado a 28°C con una agitación de 110 rpm. Se tomaron muestras por duplicado a las 24, 48, 72 y 96 horas. Los extractos enzimáticos se obtuvieron por filtración y la biomasa fue determinada por diferencia de peso seco del papel filtro.

#### **6.1.3 Cultivo sólido.**

Se realizó en columnas de vidrio a las que se añadieron 0.3 g de cubos de espuma de poliuretano (PUF) de un tamaño de 0.125 cm<sup>3</sup> a los que previamente se les agregó 4.5 ml del medio descrito anteriormente (Tsigos y Bouriotis, 1995) mismo que fue inoculado en una relación de  $1.8 \times 10^8$  esp/g de PUF ( $1.2 \times 10^7$  esp/ml) y con una espátula estéril se agitaron los cubos y el medio con el fin de impregnar homogéneamente los cubos; a las columnas se les hizo pasar un flujo de aire húmedo. Se tomaron muestras por duplicado a las 24, 48, 72 y 96 horas. Los extractos fueron obtenidos por compresión del PUF y con el fin de obtener la

mayor cantidad de extracto enzimático los cubos fueron lavados con 4.5 ml de agua estéril y se volvieron a comprimir. La biomasa fue determinada por la diferencia de peso seco en los cubos de PUF.

#### **6.1.4 Determinación de proteína.**

La proteína fue determinada por el método de Bradford en microplacas a partir de los extractos enzimáticos realizando las diluciones pertinentes cuando la absorbancia era mayor a 1.

#### **6.1.5 Determinación de la actividad enzimática.**

La actividad enzimática fue determinada de acuerdo al método colorimétrico de Kausz y Bausch (1988), utilizando etilen glicol quitina (EGC) como sustrato (Araki e Ito, 1975). La mezcla de reacción consistió en 100  $\mu$ l de EGC (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 100  $\mu$ l de buffer de tetraborato de sodio (50mM, pH 8.5) y 50  $\mu$ l del extracto enzimático; la mezcla fue incubada por 30 minutos a 37 °C. La reacción fue detenida agregando 250  $\mu$ l de KHSO<sub>4</sub> (5% p/v). El blanco fue preparado adicionando agua en lugar de la enzima, se prepararon testigos que fueron incubados del mismo modo sin el extracto enzimático y primero se agregó el 250  $\mu$ l de KHSO<sub>4</sub> (5% p/v) y posteriormente el extracto enzimático. El desarrollo del color fue igual para muestras, blancos y testigos, se agregaron 250  $\mu$ l de NaNO<sub>2</sub> (5% p/v) y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, después se agregaron 250  $\mu$ l de sulfamato de amonio (12.5% p/v) y se incubaron las muestras 5 minutos a temperatura ambiente, se agregó 250  $\mu$ l de 3-metil-2-benzothiazolin hidrazona (0.5% p/v) y las muestras fueron calentadas en agua hirviendo por 3 minutos, posteriormente se enfriaron en agua helada y se agregaron 250  $\mu$ l de FeCl<sub>3</sub> (0.5% p/v) las muestras fueron incubadas por 2 horas para desarrollar color, y se midió la absorbancia a 650 nm. La absorbancia del testigo fue restada a la de la muestra y este valor se consideró como la absorbancia real. Se definió la unidad de enzima como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de acetato de la EGC por minuto (Nahar y col. 2004). Se realizó una curva patrón utilizando glucosamina como estándar.

#### **6.1.6 Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

Se realizaron observaciones en el microscopio electrónico de barrido con el fin de observar las características morfológicas y presencia de estructuras infectivas de los hongos

productores de CDAs en CS y CL al tiempo de mayor producción de la enzima. Las muestras crecidas en el cubo de PUF del CS y las células libres del CL fueron fijadas en solución de glutaraldehído al 5% en amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7.4 durante 24 horas, posteriormente se les agregó tetraóxido de osmio en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4, se incubaron por 2 horas a 4°C y se deshidrataron en series de etanol a concentraciones de 30 a 100% con incubaciones de 20 minutos a 4°C y trabando siempre en campana de extracción. Las muestras se secaron a punto crítico, se cubrieron con oro y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5900.

## **6.2 Identificación de genes de CDA.**

### **6.2.1 Diseño de Oligonucleótidos.**

Se obtuvieron secuencias de genes de quitina desacetilasas previamente reportadas de la base de datos del NCBI de los hongos:

1. *Colletotrichum lindemuthianum* (GI: 49790329; gen parcial).
2. *Aspergillus niger* (GI: 145246535; proteína hipotética).
3. *Magnaporthe grisea* (GI: 270055147; gen completo).
4. *Aspergillus fumigatus* (GI: 70993969; gen parcial de una polisacárido desacetilasa).
5. *Tuber melanosporum* (GI: 70993969; gen completo proteína hipotética).
6. *Neurospora crassa* (GI: 164422948; proteína hipotética, gen parcial).
7. *Aspergillus clavatus* (GI: 121707545; gen parcial de una polisacárido desacetilasa).
8. *Mucor rouxii* (GI: 397154).

Las secuencias fueron analizadas y alineadas en el programa BioEdit; donde se utilizó como base la secuencia de *C. lindemuthianum* y se buscaron regiones consenso con otras secuencias y que dentro de esta hubiera por lo menos 200 pb, resultando la secuencia de *M. grisea* la que mostro mayor similitud en regiones ubicadas en los extremos del gen (Figura 2).

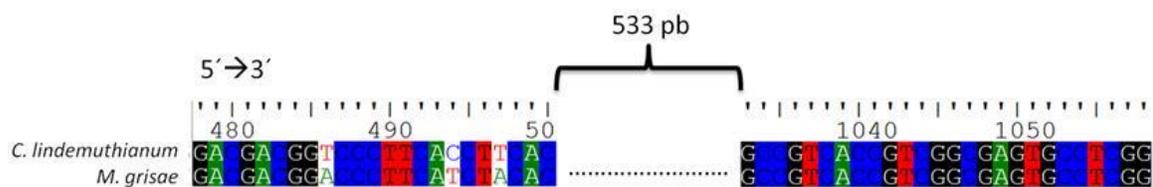


Figura 2. Alineamiento de las secuencias de genes de *C. lindemuthianum* y *M. grisae*, mostrando las regiones de similitud en la cual fueron diseñados los oligonucleótidos, dentro de la región consenso habían 544 pb.

Se diseñaron dos oligonucleótidos Forward, el primero idéntico a la secuencia de *C. lindemuthianum* (F-CDA) y el segundo degenerado puntualmente en las regiones donde se perdía la similitud entre *C. lindemuthianum* y *M. grisae* (F-Deg). Se diseñó un solo oligonucleótido Reverse (R-CDA) (Tabla 2).

Tabla 2. Diseño de oligonucleótidos.

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'
F-CDA	GACGACGGTCCCTTCACCTTCAC
F-Deg	GACGACGWCCCTTCAYCTWCAC
R-CDA	CCGAGGCACTCGCCGACGGTGACGGC

### 6.2.2 Extracción de ADN genómico por la técnica fenol-cloroformo.

El hongo *C. gloeosporioides* fue seleccionado para la identificación molecular de CDAs, sin embargo debido a que *C. acutatum* pertenece al mismo género y que la producción de CDAs en CS de ambos hongos no difería significativamente se trabajó en la identificación molecular de CDAs con este hongo; por otra parte, los resultados obtenidos al analizar las secuencias obtenidas con la herramienta BLAST (Tabla 9), nos hicieron replantear la posibilidad de encontrar genes CDA en *F. solani*, por lo que se tomó la decisión posterior de

utilizar los oligonucleótidos diseñados para la posible identificación de estos genes en *F. solani*.

El ADN genómico (ADNg) de los hongos *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* M7T5 y *F. solani* fue obtenido por la metodología de fenol-cloroformo (Brown, 1993; Ramírez, 2008;): en tubos ependorf de 1.5 ml se depositaron 40-50 mg de la muestra de hongos (aprox. la marca de 0.1 ml), que fue obtenido por raspado de micelio de las placas de Petri con PDA en el que se incubaron los hongos, los microtubos se mantuvieron a -70°C por 30 min. Posteriormente se adicionaron 500 µl de buffer de extracción (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA y 0.5% SDS) las muestras fueron maceradas con pistilo estéril por 2 min., e incubadas a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se agregaron 500 µl de una solución de fenol-cloroformo (relación 1:1) y se mezcló en vortex durante 2-5 min. Las muestras fueron centrifugadas a 13,000 revoluciones por 30 min. La fase acuosa fue transferida a un microtubo nuevo de 1.5 ml y se adicionaron 400 µl de cloroformo y se homogenizó en vortex por 1 min., posteriormente se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue transferido a un microtubo nuevo de 1.5 ml, se le adicionaron 4 µl de RNasa (20 mg/ml) y se incubó en por 30 min a 37°C. Se adicionaron 500 µl de isopropanol frío, se mezcló por inversión suave 10 veces, se incubó a -20°C por 15 min. Las muestras fueron centrifugadas por 5 min. a 13,000 rpm a temperatura ambiente y el sobrenadante fue desechado. Se añadieron 500 µl de etanol al 70% y se mezcló por inversión ligera, las muestras fueron centrifugadas nuevamente por 5 min. a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla manteniendo el microtubo invertido a temperatura ambiente. La pastilla seca fue resuspendida en 100 µl de H<sub>2</sub>O mQ estéril y mantenida hasta su uso a -20 °C.

### **6.2.3 Verificación cualitativa de la extracción de ADN.**

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% con TBE (Tris Borato EDTA) 1X, se cargaron 3 µl de buffer de carga (colorante + Sybr Gold) y 5 µl de ADNg de cada una de las muestras. Las muestras se corrieron de 45-50 min. a 90-100 Volts. Los geles fueron observados en un fotodocumentador con lámpara de luz UV.

### **6.2.4 Amplificación de los genes por PCR.**

Para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* se realizaron diferentes estrategias de amplificación para los genes blanco utilizando diferentes condiciones con el fin de obtener una mayor especificidad en los productos de amplificación:

La primer amplificación (Condiciones de amplificación 1) se realizó a los ADNg de los hongos *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* utilizando los oligonucleótidos diseñados (F-CDA/R-CDA, F-Deg/R-CDA) y utilizando los oligonucleótidos ITS (Internal Transcriber Spacer; F-ITS<sub>1</sub>/R-ITS<sub>4</sub>) que son oligonucleótidos universales para todos los hongos; y los oligonucleótidos 26S (subunidad ribosómica de los eucariotas). Además se utilizaron dos controles, el control positivo fue ADNg de *Aspergillus spp.* y el control negativo no se utilizó ADN, en ambos controles se usaron todos los juegos de oligonucleótidos descritos anteriormente, las condiciones de amplificación fueron las siguientes (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones de amplificación 1 para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, componentes de la reacción.

Reactivos	[inicial] de reactivo	1x	[final]	Unidad
Buffer 10X	10	2.50	1.00	X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	50	0.75	1.50	mM
PF 5 μM	5	1.00	0.20	μM
PR 5 μM	5	1.00	0.20	μM
dNTP's 10 mM	10	0.20	0.08	mM
Taq 5 U/μl	5	0.20	0.04	U/μl
H <sub>2</sub> O mQ		17.85		
BSA	0.5	0.50	0.01	mg/ml
ADNg	50	1.00	2.00	ng/μl
Volumen final		25.00	25.00	μl
Condiciones de PCR: 95 °C por 5 min, > 95°C – 30 seg > 58-65 °C - 1.5 min > 72 °C - 1 min por 35 ciclos, > 72 °C por 7 minutos				

La segunda y tercera amplificación (Condiciones de amplificación 2 y 3; Tabla 4 y Tabla 5, respectivamente) se realizó utilizando las muestras de ADNg de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, y Controles (+) y (-), sin embargo solo fueron utilizados los oligonucleótidos F-CDA/R-CDA, F-Deg/R-CDA.

Tabla 4 Condiciones de amplificación 2 para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, componentes de la reacción.

Reactivos	[inicial ] de reactivo	1x	[final]	Unidad
Buffer 10X	10	2.50	1.00	X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	50	0.75	1.50	mM
PF 5 μM	5	1.00	0.20	μM
PR 5 μM	5	1.00	0.20	μM
dNTP's 10 mM	10	0.20	0.08	mM
Taq 5 U/μl	5	0.20	0.04	U/μl
H <sub>2</sub> Omq		18.35		
ADNg	50	1.00	2.00	ng/μl
Volumen final		25.00	25.00	UI
Condiciones de PCR: 95 °C por 5 min,> 95°C – 30 seg > 58-65 °C - 1.5 min> 72 °C - 1 min por 35 ciclos>, 72 °C por 7 minutos				

Tabla 5 Condiciones de amplificación 3 para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, componentes de la reacción.

Reactivos	[inicial ] de reactivos	1x	[final]	Unidad
Buffer 10X	10	2.50	1.00	X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	50	3.00	6.00	mM
PF 5 μM	5	1.00	0.20	μM
PR 5 μM	5	1.00	0.20	μM
dNTP's 10 mM	10	0.25	0.10	mM
Taq 5 U/μl	5	0.20	0.04	U/μl
H <sub>2</sub> O mQ		15.55		
BSA	0.5	0.50	0.01	mg/ml
ADNg	50	1.00	2.00	ng/μl
Volumen final		25.00	25.00	μl
Condiciones de PCR: 95 °C por 5 min,> 95°C – 30 seg > 58-65 °C - 1.5 min> 72 °C - 1 min por 35 ciclos>, 72 °C por 7 minutos				

Para *F. solani* inicialmente se probó 1 concentración de ADNg (100 ng/μl) y 6 temperaturas de alineamiento ( $T_a$ ) (57.2, 59.6, 61.1, 63.2, 65.6 y 66.6°C), posteriormente con el fin de mejorar la calidad de amplificación se decidió probar otras 2 concentraciones de ADNg en la mezcla de reacción del PCR, (150 y 200 ng/μl) y las 3  $T_a$  que resultaron con bandas más intensas de la (59.6, 61.1, 63.2°C); para las amplificaciones de *F. solani* solo se utilizaron el juego de oligonucleótidos F-Deg/R-CDA. Las condiciones del PCR fueron las siguientes (Tabla 6):

Tabla 6 Condiciones de amplificación 4 para *F. solani*, componentes de la reacción.

Reactivos	[inicial ] de reactivos	1x	[final]	Unidad
Buffer 5X	5	5	1.00	X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	25	4	4	mM
PF 10 μM	10	0.5	0.20	μM
PR 10 μM	10	0.5	0.20	μM
dNTP's 10 mM	10	0.5	0.2	mM
Taq 5 U/μl	5	0.125	0.025	U/μl
H <sub>2</sub> O mQ		13.875		μl
ADNg	100, 150, 200	0.5	2,3,4	ng/μl
Volumen final		25.00	25.00	μl
Condiciones de PCR: 95°C por 2 min,> 95°C – 1 min > Ta - 1 min> 72°C – 1.5 min por 35 ciclos>, 72°C por 5 minutos <b>Nota: Solo se utilizó el juego de oligonucleótidos                      F-Deg/R-CDA</b>				

Para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* los productos de las amplificación fueron corridos en un gel de agarosa al 1.5% con TBE 1X, se cargaron 3 μl de buffer de carga (colorante + Sybr Gold) y 5 μl del producto de amplificación de cada una de las muestras, por 45 minutos a 90 volts.

Para *F. solani* los productos de amplificación fueron corridos en geles de agarosa al 0.8% con TBE 1X, se cargaron 3 μl de buffer de carga (azul de bromofenol/xilencianol) y 5 μl del producto de amplificación, por 45 minutos a 90 volts, posteriormente el gel fue sumergido en una solución de bromuro de etidio (0.5 μg/ μl) de 20 a 30 minutos.

### **6.2.5 Purificación, amplificación y tratamiento de las bandas purificadas.**

El contenido total de los productos de amplificación de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* utilizando las condiciones de amplificación 3 y con los oligonucleótidos F-Deg/R-CDA fueron cargados y corridos en carriles amplios de un gel de agarosa al 1.8% durante 50 minutos a 80 volts. Las bandas fueron cortadas con una espátula y transferidas a diferentes microtúbulos previamente pesados. Se realizó la purificación de las bandas utilizando el Kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

El contenido total de los productos de amplificación de *F. solani* utilizando las condiciones 4 con 200 ng/ µl de ADNg y 63.2 °C fueron corridas en un gel de agarosa al 1.8% durante 1.5 horas a 60 volts. La banda seleccionada fue cortada con una espátula y transferidas a un microtúbulo previamente pesado. De igual forma que con los productos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* se realizó la purificación de las bandas de acuerdo al protocolo del Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

Las bandas purificadas de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* fueron amplificadas de acuerdo a las condiciones de la Tabla 5, con el fin de observar la pureza en las bandas que fueron purificadas. Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1.5% con el fin de verificar la pureza del producto y posteriormente los productos de PCR fueron purificados por el método ExoSAP-IT con el fin de eliminar nucleótidos restantes que puedan interferir en la PCR de secuenciación, la metodología fue la siguiente: En un tubo nuevo de 0.2 ml se depositaron 5 µl del producto de PCR, se agregó 2 µl de ExoSAP-IT, se incubaron las muestras a 37°C por 15 min. y posteriormente a 80°C por 15 min.

La banda purificada de *F. solani* fue concentrada a 20 µl y solo fue verificada en un gel de agarosa al 0.8% corrido por 45 minutos a 90 volts, utilizando 3 µl del concentrado y 3 µl del buffer de carga.

### **6.2.6 Secuenciación.**

Las muestras libres de nucleótidos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, fueron preparadas para la PCR de secuenciación utilizando el Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Tabla 7); y las siguientes condiciones: un ciclo a 96°C por 5 min, 25 ciclos de los cuales 5

min fueron a 55°C, 11 min a 62°C. Mientras que la banda de *F. solani* fue enviada a secuenciar al Laboratorio Divisional de Biología molecular de la UAM-Iztapalapa.

Tabla 7. Componentes de la reacción de PCR de secuenciación

Reactivos	Volumen adicionado (µl)
Buffer Big Dye v3.1, 5X	4
Agua milliQ esteril	10
Iniciador F-Deg o R-CDA ( <b>solo uno</b> ) 5µM	1
Big Dye v3 ready mix	4
ADN purificado	1 a 3
Volumen final	20

Después de realizar la reacción de PCR de secuenciación, las muestra fueron tratadas con el kit BigDye® XTerminator™ el cual remueve restos de terminadores BigDye permitiendo una mejor secuenciación. Las muestras se secuenciaron en un Secuenciador ABI DNE 3130 N/S=19336-003.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando las herramientas BLAST, BLASTX y TBLASTX del NCBI, con el fin de encontrar similitud a otras secuencias de genes o proteínas reportadas previamente.

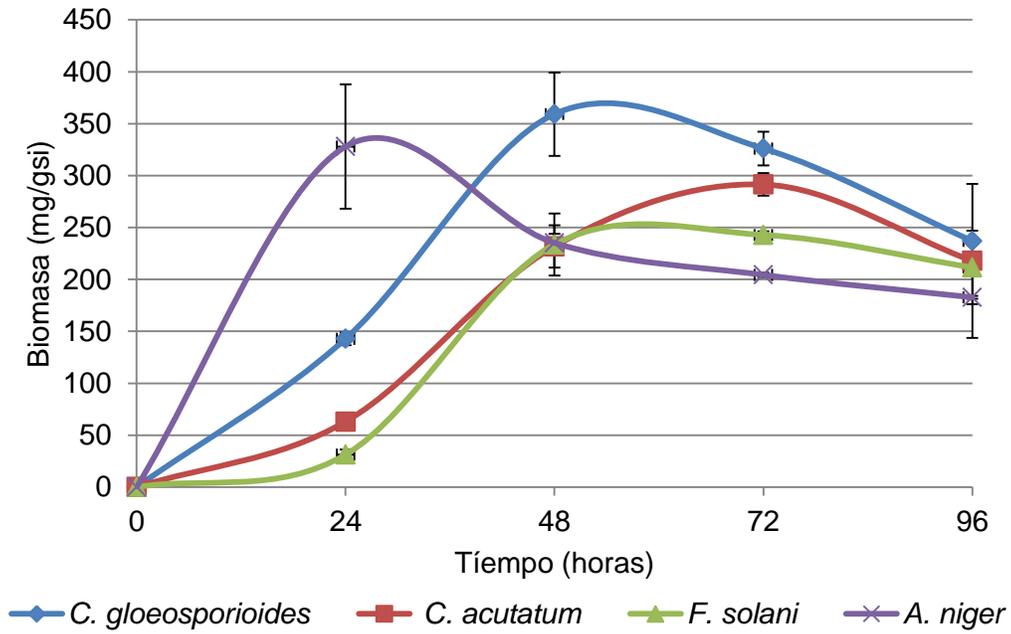
## 7. Resultados y Discusión.

### 7.1 Determinación de la producción de CDAs en cultivo sólido y líquido.

Para el CL se obtuvieron menores producciones de biomasa, que podría explicarse por un mayor tiempo de fase adaptativa y que probablemente después de la 96 horas esta siga incrementándose hasta alcanzar niveles similares a los del CS; en el CS se observan fases adaptativas cortas, alcanzando todos los hongos la máxima producción a las 48 horas; después de alcanzarse el tiempo máximo de crecimiento se observa una caída en la biomasa en los cultivos sólidos (Figura 3). Téllez y col., (2008) observaron una fase adaptativa larga en el CL de *Pleurotus ostreatus* para la producción de lacasas, sin embargo obtienen una mayor producción de biomasa en CL; en general en la bibliografía mayores rendimientos en biomasa son obtenidos en el CS debido a que los microorganismos al ser cultivados sobre un soporte sólido, crecen de forma similar a su ambiente natural, además de que existe una mayor transferencia de oxígeno en el CS; existen reportes que señalan de 3 a 5 veces mayor producción de biomasa en CS (Romero y col., 2000). En CS la producción de biomasa fue de 1.3 a 15.2 veces mayor en CS.

Los CS mostraron la mayor producción de proteína alcanzando todos los hongos el máximo de producción, a excepción de *C. acutatum*, a las 48 horas y manteniéndose constantes hasta las 96 horas, *C. acutatum* mostró la mayor producción de proteína en CS a las 96 horas sin embargo no es posible asegurar que a este tiempo se obtuvo el máximo de proteína pues debido a la duración de la cinética no se aprecia si esta permaneció constante o siguió incrementando, sin embargo las cinéticas de biomasa muestran una caída gradual a partir de las 72 horas por lo que esta podría no incrementar más. Los cultivos CL mostraron menor proteína siendo alcanzado el máximo dentro de las 48 horas y manteniéndose prácticamente constantes (Figura 4).

# A



# B

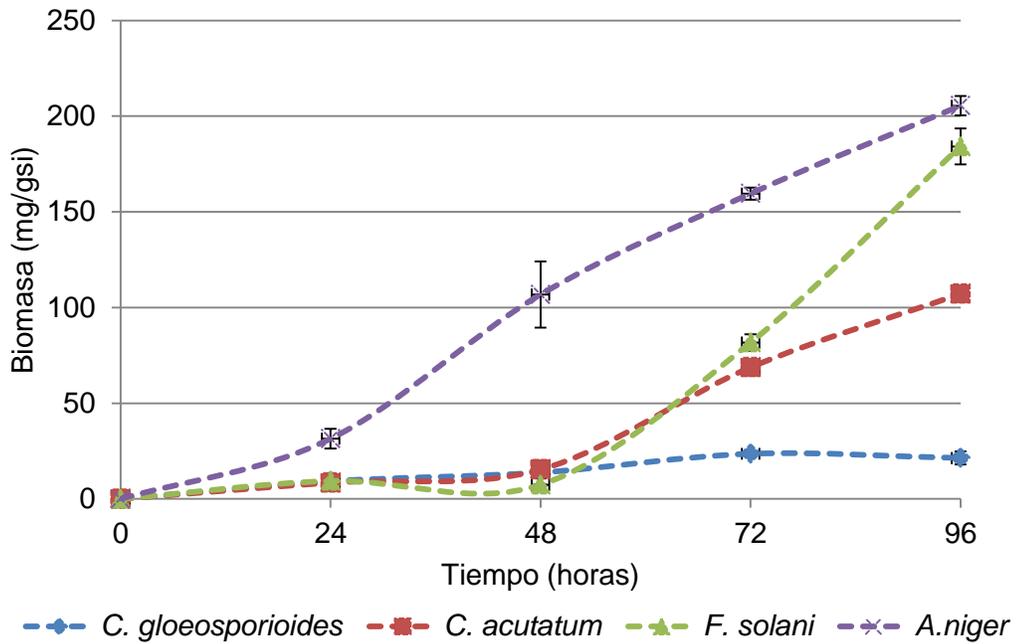


Figura 3. Cinéticas de producción de biomasa en: A) CS y B) CL de los hongos fitopatógenos.

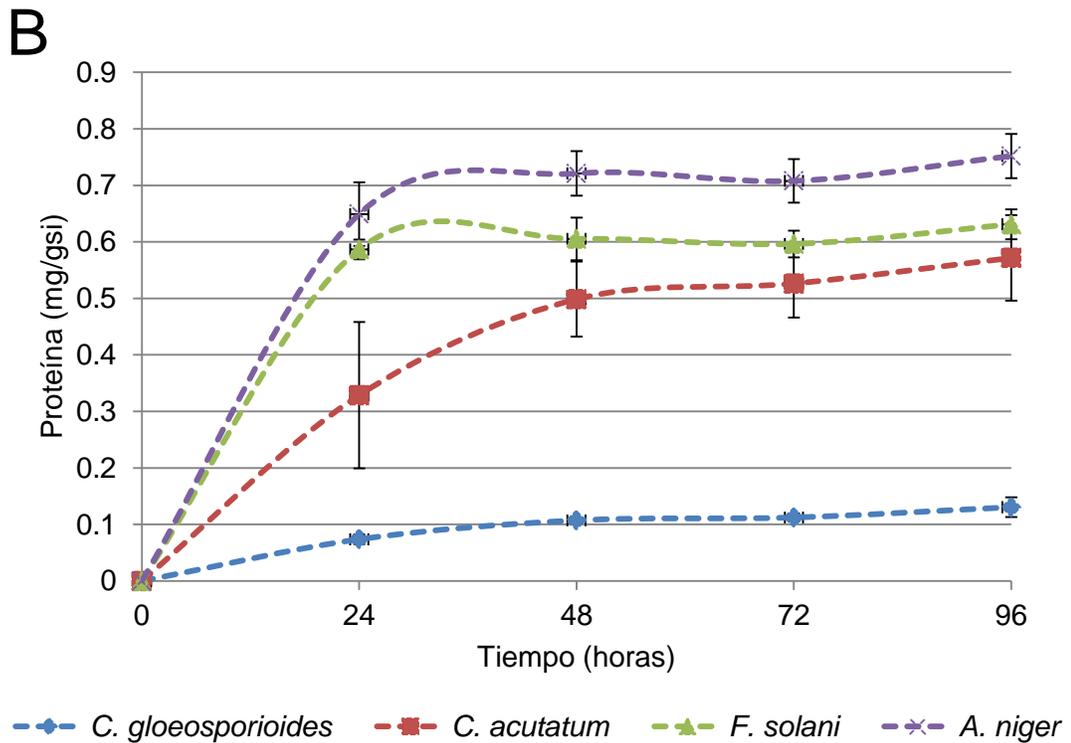
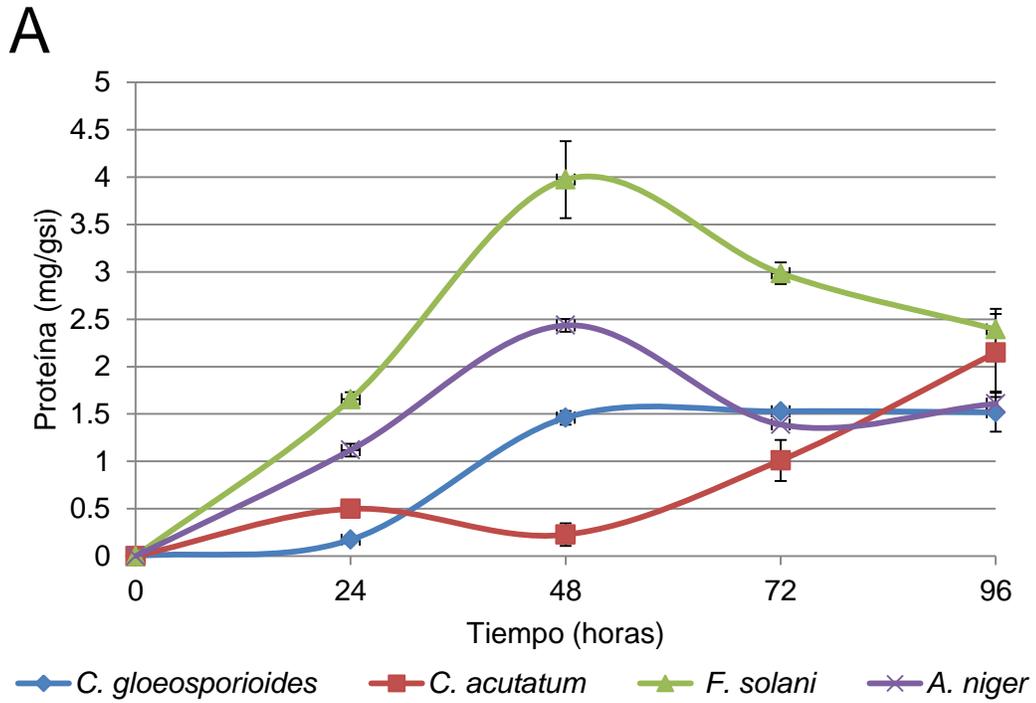


Figura 4. Cinéticas de producción de proteína en: A) CS y B) CL de los hongos fitopatógenos.

En la Figura 5 se muestran las cinéticas de actividad CDA expresada en U/gSI con el fin de poder comparar ambos tipos de cultivos. *C. gloeosporioides* mostró el pico de actividad a las 48 horas en CL y CS, con medias estimadas en 1.47 y 0.546 U/gSI respectivamente; posteriormente se observa una caída gradual en la actividad enzimática, mientras que *C. acutatum* y *F. solani* solo mostraron actividad en CS mostrando su máxima actividad a las 24 horas y con medias estimadas en 0.81 y 0.32 U/gSI respectivamente. Meens y col. (2001), realizaron la selección de hongos marinos productores de CDAs, la identificación de estos hongos fue realizada por estudios morfológicos y fisiológicos, entre las cepas identificadas probaron un *Fusarium sp* el cual no presentó actividad CDA al crecer en extracto de malta en un cultivo que no está completamente descrito pero con características de CL pues no reportan el uso de un soporte.

Debido a que los máximos de actividad no coinciden en el mismo tiempo se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los picos de máxima actividad independientemente del tiempo en que se presentan, en la Figura 5 se muestra que existen tres grupos; *C. gloeosporioides* en CL tuvo significativamente la mayor producción de actividad CDA, mientras que los cultivos sólidos de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* no mostraron diferencia significativa entre sí, tampoco hubo diferencia significativa entre los cultivos sólidos de *C. gloeosporioides* y *F. solani*; sin embargo la actividad CDA de *C. acutatum* fue significativamente mayor que *F. solani*.

Este comportamiento atípico, en la mayor producción enzimática en CL frente a CS ha sido observado por Díaz y col. (2001) en la producción de exopectinasas de *A. niger*, la producción de estas enzimas fue mayor en CL cuando se utilizó un medio que solo contenía pectina y que fue probado en dos diferentes niveles de actividad de agua, sin embargo al adicionar al medio sacarosa un efecto de represión catabólica fuerte fue observado en el CL y por lo tanto la producción de exopectinasas fue menor, a diferencia del CS donde se obtuvieron hasta 20 veces más actividad exopectinasa, una de las ventajas del CS frente al CL es la represión catabólica menor; otro trabajo que señala una menor producción enzimática en CS es el de Téllez y col. (2008) en la producción de lacasas de *P. ostreatus*, los autores atribuyeron esta menor producción en CS a una producción nula de proteasas en CL mientras que en CS estas enzimas fueron producidas y podrían estar hidrolizando las lacasas. En CL las lacasas podrían mantenerse estables por mayor tiempo, además diferentes isoenzimas son producidas en diferentes tiempos y estos patrones podrían

depender de la presencia de oxígeno en el medio lo que podría explicar que la mayor producción en CL se deba al estrés debido a la baja concentración de oxígeno en CL. Sin embargo, en este trabajo no fue determinada la actividad proteasa en los extractos por lo que es difícil concluir de manera similar. De Santiago (2011) reportó la producción de CDAs de *C. gloeosporioides* M7T5 en CS utilizando agrolita como soporte inerte de 0.296 U/gSI y en 0.398 U/gSI en el CL del mismo, sin encontrar diferencias significativas entre ambos tipos de cultivo. Suresh y col. (2011) reportaron la producción de CDAs de *C. lindemuthianum* en CS utilizando como soporte y fuente de nutrientes desecho de camarón y salvado de trigo adicionado con quitosano; no hubo una comparación entre CS y CL, sin embargo los autores reportaron 460 U/gSI para el salvado de trigo adicionado con quitosano y 392 U/gSI utilizando el desecho de camarón. Los valores altos obtenidos en ese trabajo podrían ser explicados por el uso de soportes que podrían favorecer la producción de las enzimas, el desecho de camarón que contiene quitina, se ha descrito que *Metarhizium anisopliae* para el metabolismo de quitina requiere de la acción de CDAs (Murad y col., 2008); y el salvado de trigo adicionado con quitosano, este último ha mostrado ser inductor de CDAs en *Rhizopus stolonifer* (El Ghaouth y col., 1992) y en *C. gloeosporioides* (De Santiago, 2011).

Con el fin de poder comparar los resultados obtenidos con los de la bibliografía, en la Tabla 8 se muestran los picos de actividad expresados como U/ml. Nahar y col. (2004) reportaron la producción de CDAs de 6 cepas de *Metarhizium anisopliae* obteniendo actividades volumétricas entre 0.01 y 0.03 U/ml al utilizar un medio que contenía quitina; intervalo dentro del cual se encuentra la producción de CDAs de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* independiente del tipo de cultivo. Tokuyasu y col. (1996) reportan la producción en *C. lindemuthianum* de 299 U totales en un filtrado obtenido de un volumen de 7.9 l; lo que correspondería a 0.037 U/ml, dicho valor es similar al obtenido en CL de *C. gloeosporioides*.

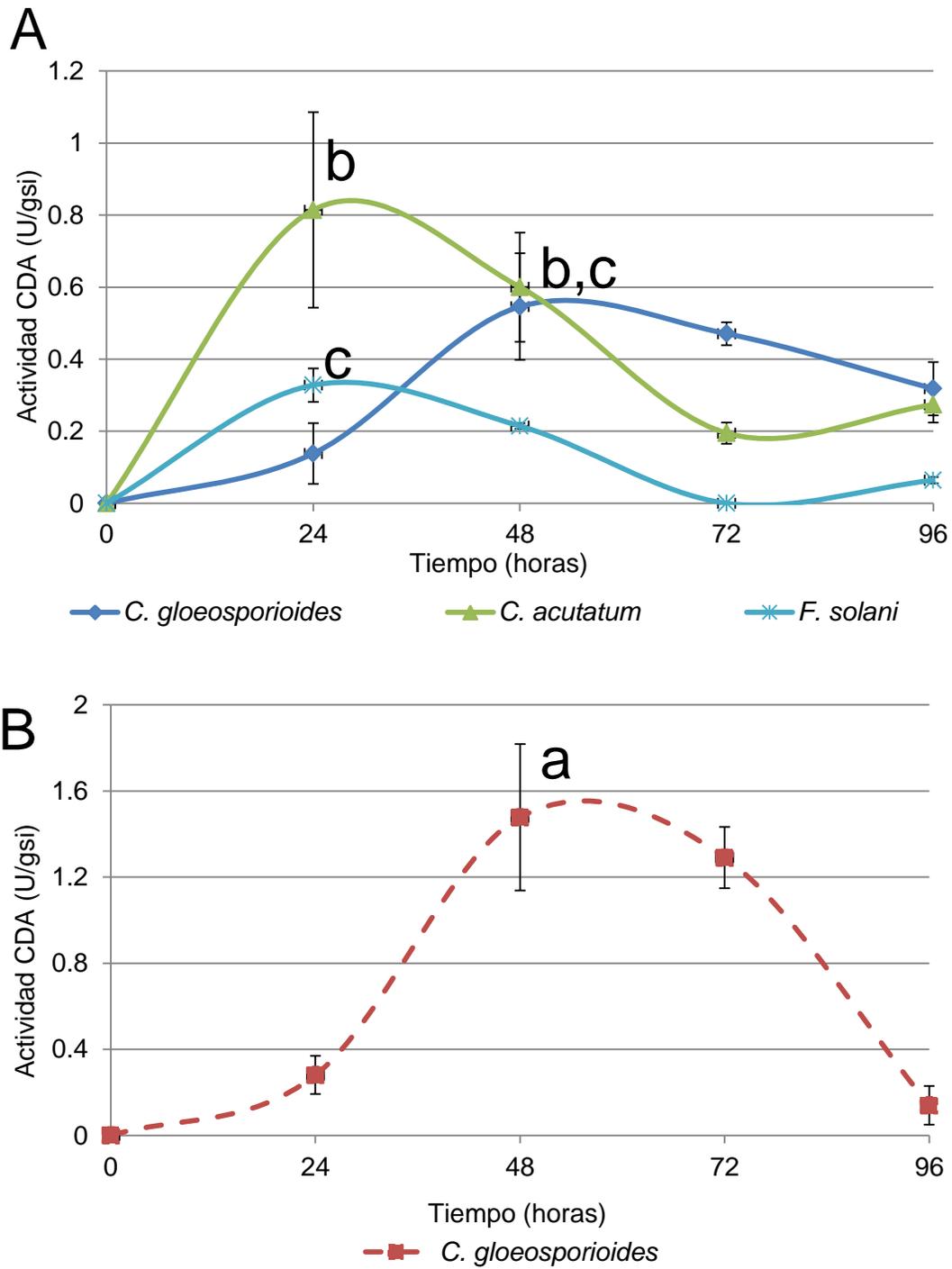


Figura 5. Cinética de actividad CDA expresada como U/gSI en: A) CS y B) CL de los hongos fitopatógenos. Valores con la misma letra no presentan diferencia significativa a  $\alpha \leq 0.05$

Tabla 8. Comparación de los máximos picos de actividad CDA expresados en U/ml de CL y CS.

Hongo	Cultivo	Tiempo de máxima de actividad CDA (horas)	Actividad CDA U/ml
<i>C. gloeosporioides</i>	Líquido	48	0.034±0.0079a
<i>C. gloeosporioides</i>	Sólido	48	0.0126±0.003b,c
<i>C. acutatum</i>	Sólido	24	0.019±0.006b
<i>F. solani</i>	Sólido	24	0.0075±0.0017c

Valores con la misma letra no presentan diferencia significativa a  $\alpha \leq 0.05$

En la Figura 6 se muestran las cinéticas de actividad específica CDA. El CL de *C. gloeosporioides* mostro la mayor actividad específica a las 48 horas con una media estimada en 13.7 U/mg de proteína, los CS mostraron menor actividad específica siendo el pico de actividad para *C. acutatum* a las 48 horas con una media estimada en 2.65 U/mg de proteína, para *C. gloeosporioides* a las 24 horas con una media estimada de 0.78 U/mg de proteína y para *F. solani* a las 24 horas con una media estimada de 0.19 U/mg de proteína; la diferencia entre el CS y el CL de *C. gloeosporioides* fue mayor a la obtenida en las actividades volumétricas debido a la mayor producción de proteína en el CS.

En la Figura 6 se muestra la comparación de los picos máximos de actividad CDA de los hongos expresado como U/mg de proteína. Kim y col. (2008) reportó la producción de CDAs de *Mortierella spp* obteniendo 3.75 U/mg en un medio de cultivo con glucosa, extracto de levadura y peptona; la optimización de este medio de cultivo dio como resultado una actividad máxima de 20 U/mg de proteína al tercer día de cultivo, este reporte es el único existente con una actividad comparable con la obtenida por *C. gloeosporioides* en CL (13.7 U/mg) sin embargo el medio no optimizado dio actividad similar a la de *C. acutatum* en CS; otro reporte que está dentro del orden de magnitud de la producción es el de *Rhizopus nigricans* en el que en los filtrados obtienen 1.9 U/mg de proteína (Jeraj y col., 2006). Las

actividades reportadas por Araki e Ito (1975) y Win y Stevens (2001) se encuentran dentro del orden de magnitud de la producción de *C. gloeosporioides* en CS.

Es importante mencionar que existen inconsistencias en las tablas de purificación de algunos reportes y probablemente se encuentren dentro de los órdenes de magnitud de los hongos probados.

*A. niger* no mostro actividad CDA bajo las condiciones de cultivo y el medio utilizado, sin embargo existen reportes sobre la producción de esta enzima en otras especies como *Asperillus nidulans* (Alfonso y col. 1995), y otros *Aspergillus* spp (De Santiago, 2011) y se han identificado genes de polisacárido desacetilasas en *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, y *A. clavatus*.

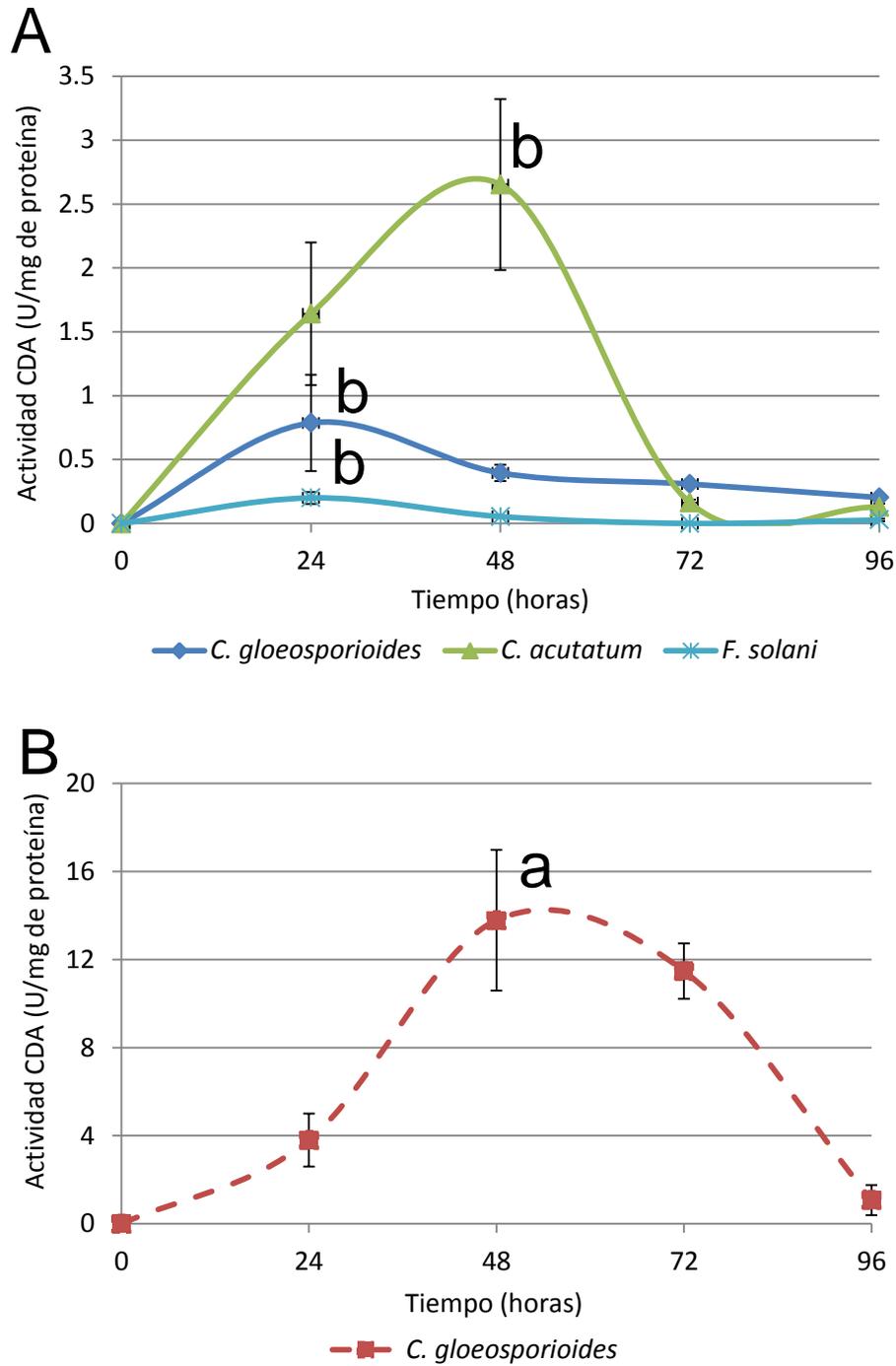


Figura 6. Cinética de actividad específica CDA en: A) CS y B) CL de los hongos fitopatógenos. Valores con la misma letra no presentan diferencia significativa a  $\alpha \leq 0.05$ .

### **7.1.1 Microscopía electrónica de barrido.**

Se realizaron observaciones al microscopio electrónico de barrido del hongo *C. gloeosporioides* a las 48 horas en CS y CL se seleccionó este tiempo por ser aquel en el que ocurre la mayor actividad CDA (U/gSI) (

Figura 7). En CL y CS se observaron esporas con la morfología y tamaños aproximados a 10  $\mu\text{m}$  características similares a las reportadas en otros trabajos (Zulfiqar y col., 1996; Chau y Álvarez; 1983), sin embargo las esporas en CL fueron escasas. En CS fue posible observar apresorios, los cuales han sido descritos como estructuras de infección- Siegrist y Kaus (1990) observaron un incremento en la actividad CDA a las 24 horas después de inocular esporas de *C. lagenarium* en hojas de pepino, tiempo en el que de acuerdo con los autores la germinación de esporas y desarrollo de hifas debe de ocurrir. De igual forma De Santiago (2011) observa el desarrollo de hifas y apresorios de *C. gloeosporioides* a las 72 horas, tiempo en el que observa una inducción por parte del cultivo del hongo en hojas de limón, y señala que a pesar de no observar estructuras infectivas en el espacio intercelular, las CDA podrían producirse también durante la formación de los apresorios. En CL no se observaron apresorios.

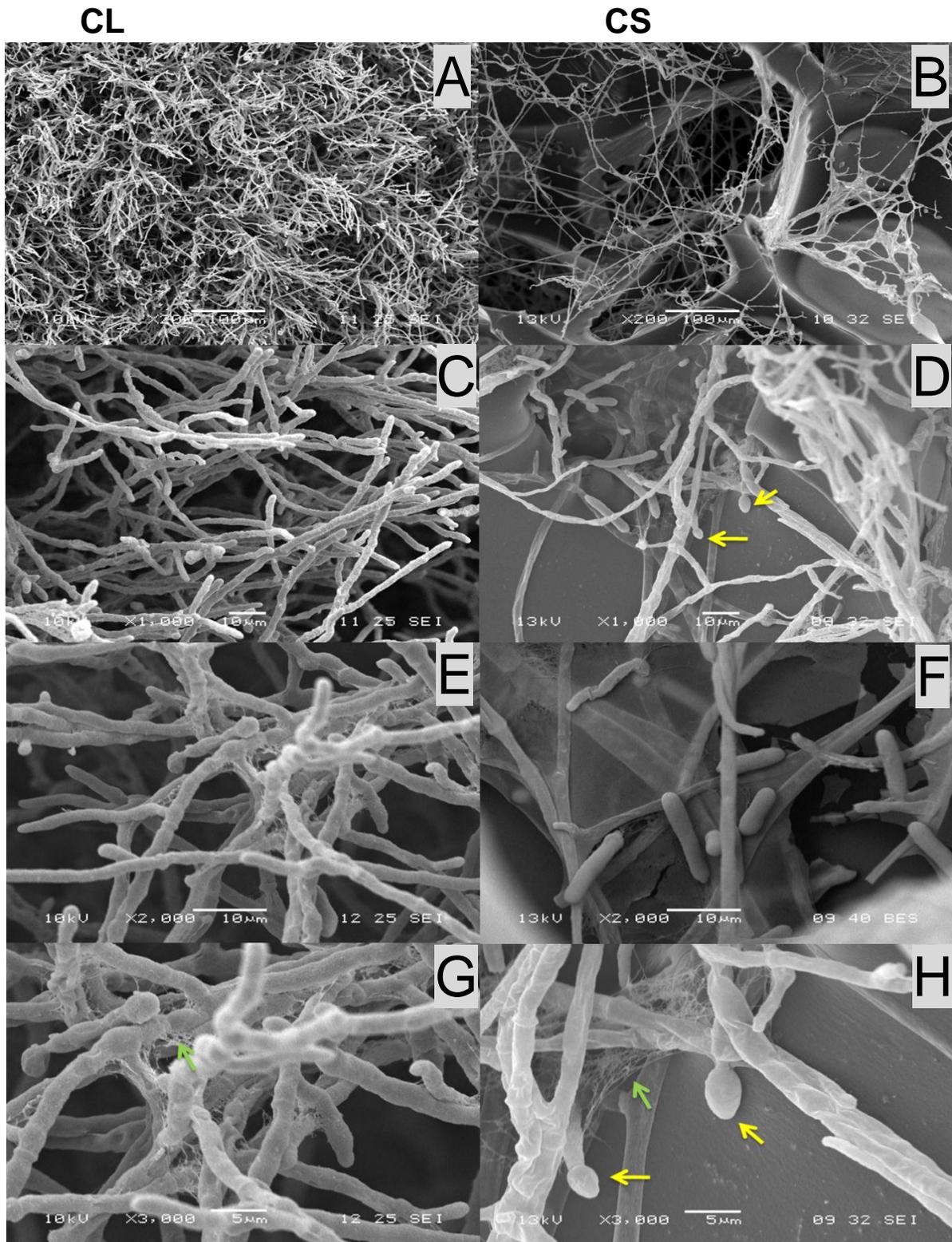


Figura 7. Micrografías electrónicas de barrido de *C. gloeosporioides* en CL (A, C, E y G) y CS (B, D, F, y H) a las 48 horas. Los apresorios son señalados con flechas amarillas y la matriz extracelular con flechas verdes.

Para *C. acutatum* se realizaron las observaciones al microscopio electrónico a las 24 horas en CL y CS (Figura 8), se realizó a este tiempo debido a que en el CS fue el tiempo en donde se produjo la mayor actividad CDA. Se observaron esporas con la morfología y tamaño similar (ca. 10  $\mu\text{m}$ ) a las de *C. gloeosporioides* (

Figura 7); este parecido entre ambas especies de *Colletotrichum* ha sido reportado previamente en el crecimiento de ambos hongos en flores y tejidos de limón (Zulfiqar y col. 1996). Las observaciones permitieron ver la presencia de apresorios en ambos tipos de cultivos, sin embargo si se observa una diferencia en cuanto a la longitud del túbulo germinal que se forma previo al apresorio, en CL fue observado un túbulo germinal largo, mientras que en el CS el apresorio no se observa claramente, sino que al parecer éste se forma inmediatamente a partir de la espora.

Otra diferencia observada en ambos tipos de cultivo es la producción de matriz extracelular, aparentemente se observa una mayor cantidad de esta matriz en CS; esta matriz extracelular puede estar compuesta de proteínas, glucoproteínas o polisacáridos. En *C. lindemuthianum* la matriz extracelular ha sido identificada como glucoproteínas y en *C. graminícola* se han identificado que contiene enzimas como cutinasas. Los principales papeles biológicos de esta matriz extracelular es la adhesión (Carver y col. 1995), así como permitir a las hifas percibir la superficie donde se encuentra y la diferenciación de estructuras infectivas (Epstein y col., 1987). La mayor producción aparente de esta matriz en CS podría ser inherente al cultivo, ya que en estas superficies es necesaria la adhesión al soporte.

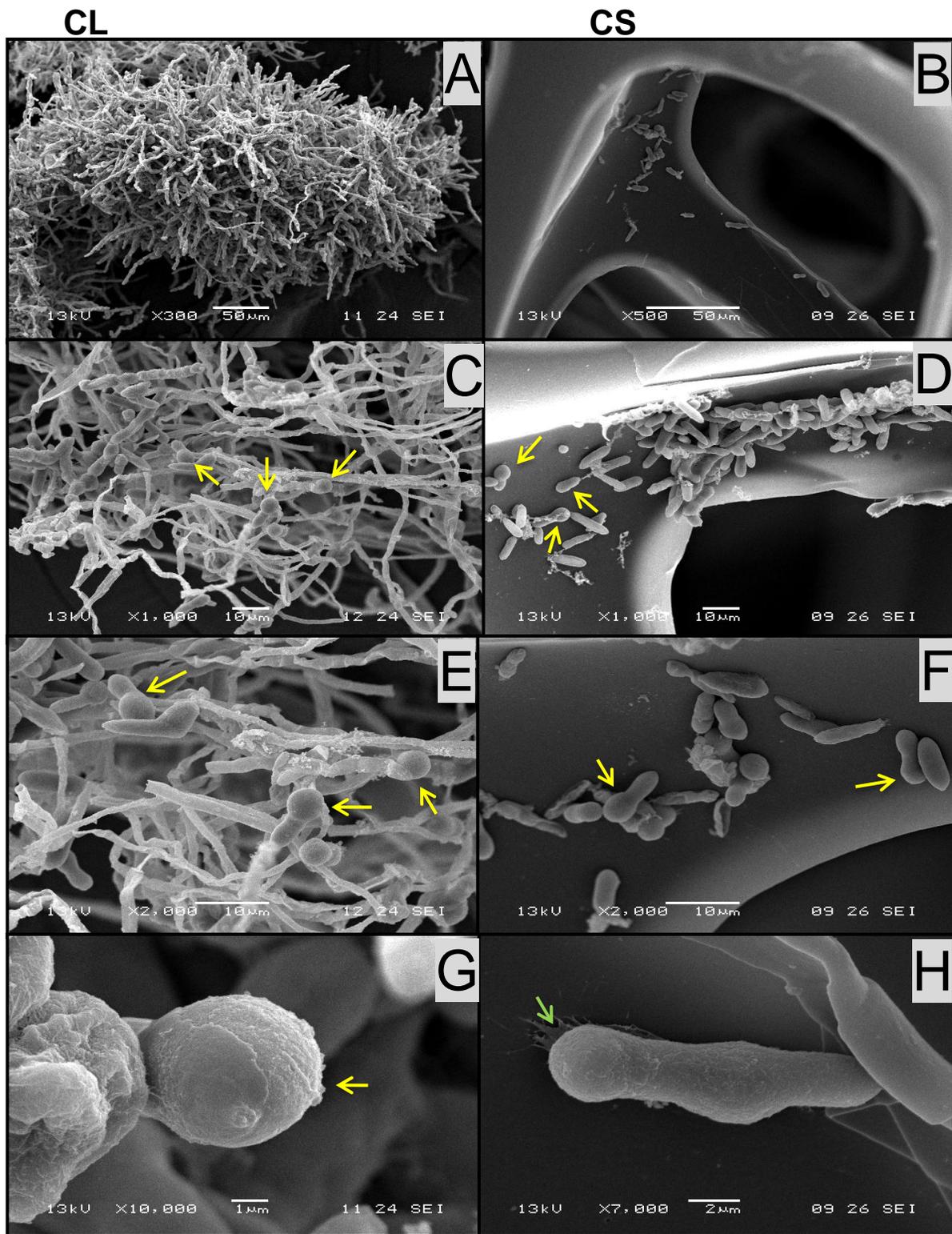


Figura 8 Micrografías electrónicas de barrido de *C. acutatum* en CL (A, C, E y G) y CS (B, D, F, y H) a las 24 horas: Las esporas son señaladas con flechas rojas, los apresorios son señalados con flechas amarillas y la matriz extracelular con flechas verdes.

En el caso de *F. solani* se realizaron las observaciones a las 24 horas en ambos tipos de cultivo (Figura 9). En el CL no fue posible observar esporas u otras estructuras diferenciadas en su mayoría los pellets presentaban crecimiento homogéneo de hifas y no fue posible observar matriz extracelular. En el CS, si fue posible observar esporas de aproximadamente 10 a 15  $\mu\text{m}$ , ligeramente curvadas y similares a las de otros reportes del mismo hongo (Arriaga y Revah; 2005) y de otras especies del genero *Fusarium* (Aoki y col. 2003). Además fue posible observar apresorios y matriz extracelular; en *F. solani* se ha determinado que esta matriz contiene una glucoproteína que se involucra directamente en la adhesión de las macroconidias al huésped. También fue posible observar apresorios, éstas estructuras fueron vistas sobre el PUF.

La microscopia electrónica nos permitió observar diferencias en el crecimiento de los hongos fitopatógenos en ambos tipos de cultivo. *C. gloeosporioides* mostró apresorios solo al crecer en CS, existen reportes sobre el desarrollo de estas estructuras en soportes sólidos como el vidrio o poliestireno, sin embargo al parecer la producción de CDAs no requiere del desarrollo de estructuras de infección en *C. gloeosporioides*, en su mayoría los reportes sobre la producción de estas enzimas ha sido realizada en CL. En cuanto a *C. acutatum* la producción de apresorios parece no requerir el contacto con estructuras rígidas, pues es posible observar numerosas de estas estructuras tanto en el CL como en el CS, sin embargo como se mencionó previamente, la producción de CDAs solo es observada durante el CS; esta producción exclusiva en CS podría deberse a un mecanismo de represión catabólica, una de las ventajas del CS son los niveles más bajos de represión catabólica observados (Viniegra-González y Favela-Torres, 2006; Barrios-González, 2012); sin embargo sería necesario realizar CL con otras fuentes de carbono como fructosa, quitina coloidal, etc. En el caso de *F. solani* parece ser que la producción de CDAs esta directamente relacionada con la formación de apresorios y a su vez la formación de apresorios si requiere del contacto con estructuras rígidas, ya que en CL solo se observa crecimiento homogéneo de hifas, mientras que en CS en posible observar una gran variedad de estructuras diferenciadas; además también podría deberse a mecanismos de represión catabólica.

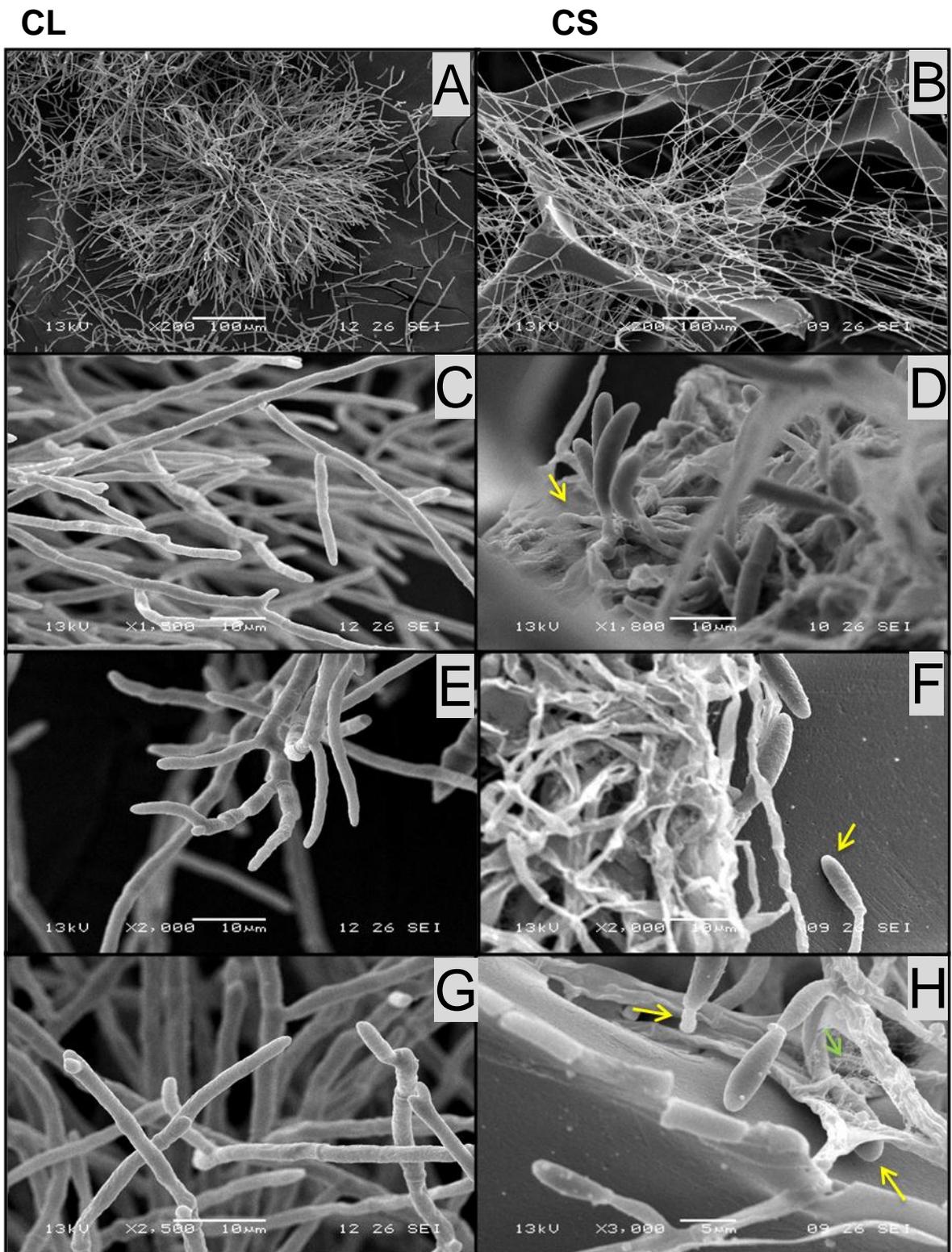


Figura 9 Micrografías electrónicas de barrido de *F. solani* en CL (A, C, E y G) y CS (B, D, F, y H) a las 24 horas. Los apertorios son señalados con flechas amarillas y la matriz extracelular con flechas verdes.

## 7.2 Identificación de genes de CDA.

### 7.2.1 Verificación cualitativa de la extracción de ADN.

Se realizó la extracción de ADNg de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *F. solani* se verificó en geles de agarosa. Se puede observar que se obtuvieron bandas de ADN integro, basado en el grosor y nitidez de las bandas obtenidas. Se observó poca degradación (Figura 10). Es necesario recalcar que el ADNg de los hongos del genero *Colletotrichum* y el de *F. solani* fueron corridos en electroforesis separadas y la tinción fue realizada con bromuro de etidio.

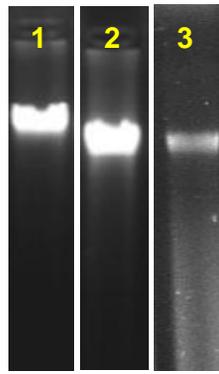


Figura 10. Verificación de la extracción de ADNg de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *F. solani* 1) ADNg de *C. acutatum*; 2) ADNg de *C. gloeosporioides*; 3) ADNg de *F. solani*.

### 7.2.2 Amplificación de los genes por PCR.

En la Figura 11 se muestran los productos de PCR de la primera estrategia de amplificación bajo condiciones ITS con BSA. Para *C. acutatum* utilizando el juego F-CDA/R-CDA se observó una banda tenue alrededor de los 500 pb. Se logró una mejor amplificación utilizando el juego de oligonucleótidos F-Deg/R-CDA, mostrándose también una banda nítida de aproximadamente 500 pb. *C. gloeosporioides* mostro bandas tenues alrededor de los 500 pb y otra banda alrededor de los 200 pb, ambos hongos mostraron una mejor amplificación al utilizarse el juego de oligonucleótidos F-Deg/R-CDA; ninguno de los controles mostraron bandas con los oligonucleótidos diseñados. *C. acutatum* no mostró amplificación utilizando los oligonucleótidos ITS, *C. gloeosporioides* si mostró una banda de aproximadamente 500 pb y otra de 1000 pb cuando se utilizaron el juegos de oligonucleótidos ITS, el control positivo al ser un ADNg de un hongo (*Aspergillus spp.*) si mostro una banda de aproximadamente 600pb, el control negativo no mostro ninguna banda. *C. acutatum*

tampoco mostró amplificación utilizando el juego de oligonucleótidos 26S, mientras que *C. gloeosporioides* y el control positivo mostraron bandas alrededor de los 600 y 700 pb respectivamente; la falta de bandas utilizando los oligonucleótidos universales en *C. acutatum* podría deberse principalmente a la falta de optimización de las condiciones de PCR, otras razones podrían ser una degradación del ADN obtenido y/o una baja alineación por poca similitud a las secuencias de estos oligonucleótidos.

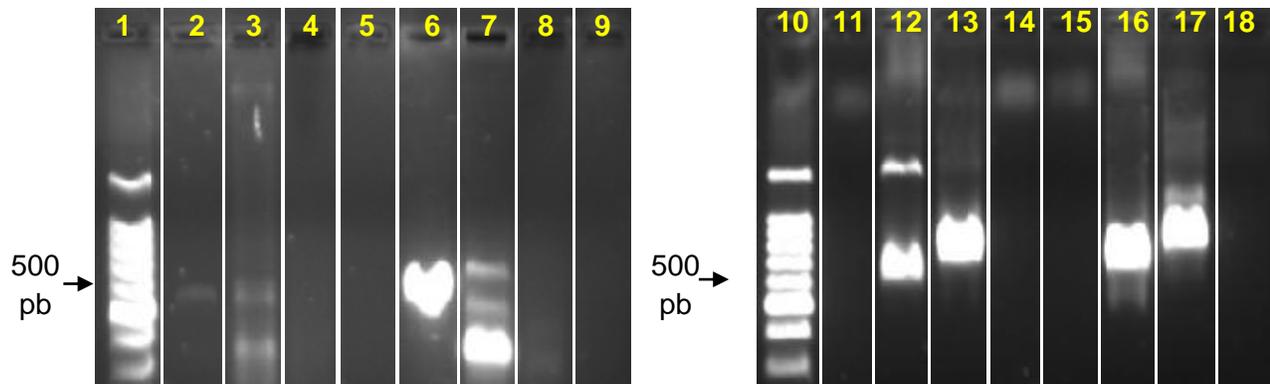


Figura 11. Amplificación condiciones 1 (Tabla 3): 1) Marcador 100pb; 2) *C. acutatum* F-CDA/R-CDA; 3) *C. gloeosporioides* F-CDA/R-CDA; 4) Control (+) F-CDA/R-CDA; 5) Control (-) F-CDA/R-CDA; 6) *C. acutatum* F-Deg/R-CDA; 7) *C. gloeosporioides* F-Deg/R-CDA; 8) Control (+) F-Deg/R-CDA; 9) Control (-) F-Deg/R-CDA; 10) Marcador 100pb; 11) *C. acutatum* ITS; 12) *C. gloeosporioides* ITS; 13) Control (+) ITS; 14) Control (-) ITS; 15) *C. acutatum* 26S; 16) *C. gloeosporioides* 26S; 17) Control (+) 26S; 18) Control (-) 26S.

En la Figura 12 se muestran los productos de PCR de la segunda amplificación. En las condiciones 2 (Tabla 4), *C. acutatum* mostro nuevamente una banda tenue de 500pb utilizando el juego de oligonucleótidos F-CDA/R-CDA, sin embargo no se observó la banda nítida que se encontró en la Figura 7, cuando se utilizó el juego de oligonucleótidos F-Deg/R-CDA. *C. gloeosporioides* mostro bandas tenues y poca resolución cuando se utilizaron los oligonucleótido F-CDA/R-CDA, las bandas mostraron mayor nitidez utilizando el juego de oligonucleótidos F-Deg/R-CDA, estas bandas coinciden con las mismas mostradas en la Figura 7; sin embargo la resolución continúa siendo baja. Los controles positivo y negativo continuaron sin mostrar bandas.

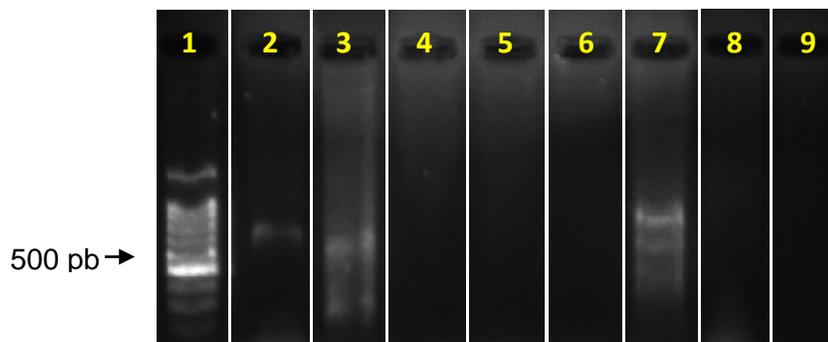


Figura 12. Amplificación utilizando condiciones 2 (Tabla 4) para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*: 1) Marcador 100pb; 2) *C. acutatum* F-CDA/ R-CDA; 3) *C. gloeosporioides* F-CDA/R-CDA; 4) Control (+) F-CDA/R-CDA; 5) Control (-) F-CDA/R-CDA; 6) *C. acutatum* F-Deg/R-CDA; 7) *C. gloeosporioides* F-Deg/R-CDA; 8) Control (+) F-Deg/R-CDA; 9) Control (-) F-Deg/R-CDA.

Al utilizar las condiciones 3 (Tabla 5), con los iniciadores F-CDA/R-CDA se observaron en general bandas más nítidas; *C. acutatum* mostró una banda tenue y *C. gloeosporioides* cuatro bandas tenues con barrido cuando se utilizó el juego de oligonucleótidos F-CDA/R-CDA. Al utilizar el juego de oligonucleótidos F-Deg/R-CDA *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* mostraron bandas más nítidas, sin embargo la resolución fue baja (Figura 13). Los controles positivo y negativo continuaron sin mostrar bandas. El resto de los productos de amplificación obtenidos en las condiciones 3 (Tabla 5) utilizando el juego de oligonucleótidos F-Deg/R-CDA fueron los seleccionados para purificar y secuenciar.

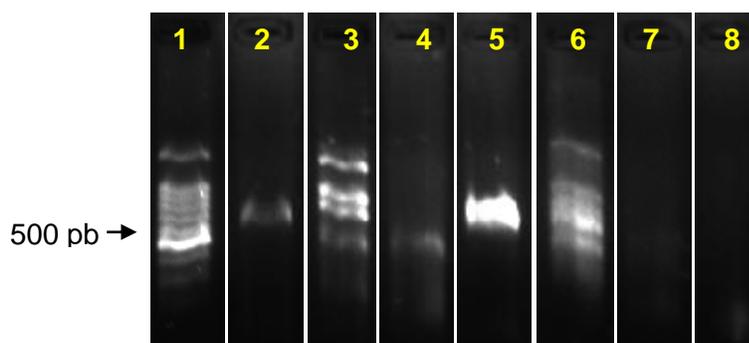


Figura 13. Amplificación utilizando condiciones 3 (Tabla 5) para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*: 1) Marcador 100pb; 2) *C. acutatum* F-CDA/R-CDA; 3) *C. gloeosporioides* F-CDA/R-CDA; 4) Control (+)F-CDA/R-CDA; 5) *C. acutatum* F-Deg/R-CDA; 6) *C. gloeosporioides* F-Deg/R-CDA; 7) Control (+)F-Deg/R-CDA; 8) Control (-)F-Deg/R-CDA.

En la Figura 14 se muestra la amplificación bajo las condiciones 4 en *F. solani*, se observan bandas tenues de 500 pb aproximadamente, las bandas obtenidas con las  $T_a$  de 59.6, 61.1 y 63.2°C mostraron una mayor nitidez, por lo que se decidió trabajar estas mismas temperaturas y variar la concentración de ADNg que se adiciona a la reacción de PCR con el fin de obtener una banda con suficiente nitidez para realizar el corte y purificación de la misma, y que los resultados de la secuenciación sean mejores.

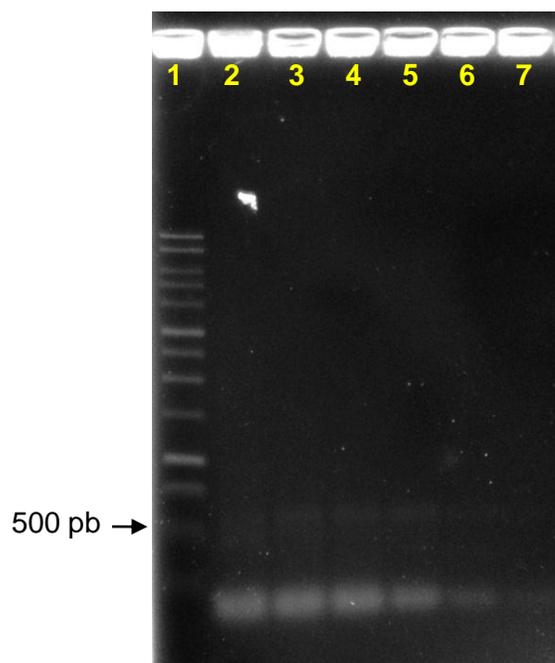


Figura 14 Amplificación utilizando las condiciones 4 (Tabla 6 Condiciones de amplificación 4 para *F. solani*, componentes de la reacción. Tabla 6) con 100 ng/ $\mu$ l de ADNg de *F. solani* y diferentes  $T_a$ : 1) Marcador kb; 2) 57.2°C; 3) 59.6°C; 4) 61.1°C; 5) 63.2°C; 6) 65.6°C; 7) 66.6°C.

En la Figura 15 se muestran los productos de amplificación de *F. solani* aumentando las concentraciones de ADNg y manteniendo constantes las 3 mejores  $T_a$ , se observó que a la mayor  $T_a$  (63.2°C) y mayor concentración (200 ng/ $\mu$ l) la banda obtenida se veía con más nitidez. Por lo que se decidió correr el resto de estos productos en un gel de agarosa más concentrado y a baja velocidad.

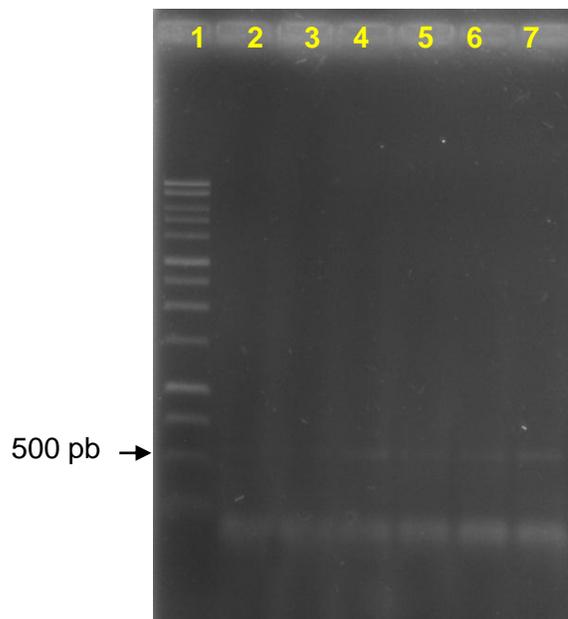


Figura 15 Amplificación utilizando las condiciones 4 (Tabla 6) variando la concentración de ADN<sub>g</sub> de *F. solani* y con las 3 mejores  $T_a$ : 1) Marcador 1kb; 2) 150 ng/ $\mu$ l / 59.6°C; 3) 150 ng/ $\mu$ l / 61.1°C; 4) 150 ng/ $\mu$ l / 63.2°C; 5) 200 ng/ $\mu$ l / 59.6°C; 6) 200 ng/ $\mu$ l / 61.1°C; 7) 200 ng/ $\mu$ l / 63.2°C.

### 7.2.3 Purificación, amplificación y tratamiento de las bandas purificadas.

Las bandas a purificar de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* se muestran en la Figura 16. Los productos de la amplificación de las bandas purificadas de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* se muestran en la Figura 17, se puede apreciar que las bandas se muestran suficientemente nítidas y homogéneas para que los productos de amplificación sean llevados a PCR de secuenciación y posterior secuenciación.

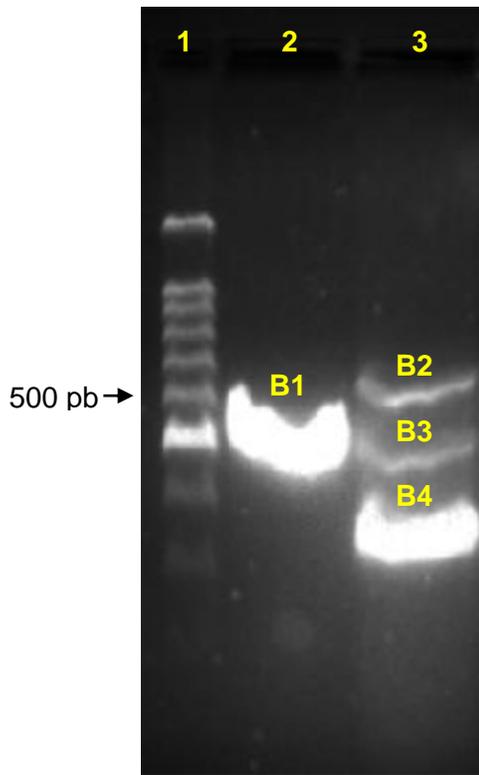


Figura 16. Contenido total de los productos de amplificación de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* utilizando las condiciones de amplificación 3: 1) Marcador 100pb, 2) *C. acutatum* F-Deg/R-CDA; 3) y 4) *C. gloeosporioides* F-Deg/R-CDA.

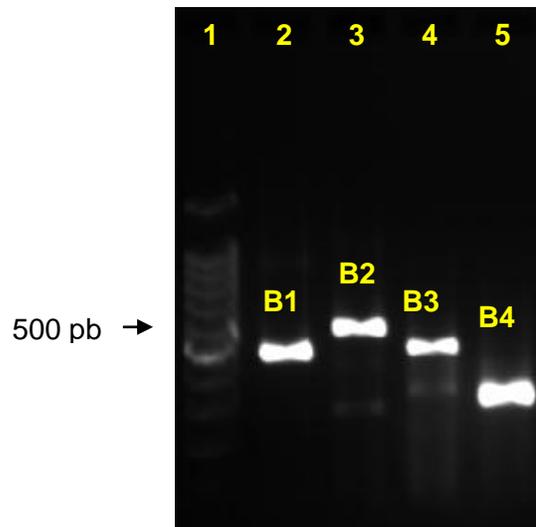


Figura 17. Verificación de los productos de amplificación de las bandas purificadas de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. 1) Marcador 100pb; 2) *C. acutatum* utilizando

oligonucleótidos F-Deg/R-CDA; 3), 4), y 5) *C. gloeosporioides* utilizando oligonucleótidos F-Deg/R-CDA.

La banda de *F. solani* a purificar se muestra en la Figura 18, dicha banda fue denominada como banda B5, en este gel se pueden observar 2 bandas tenues de menor tamaño (señaladas con flechas amarillas) que no se purificaron debido al bajo rendimiento de amplificación. A diferencia de las bandas purificadas de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, la banda purificada de *F. solani* no fue reamplificada, solo se realizó la verificación de la purificación de la banda concentrada por medio de electroforesis (Figura 19).

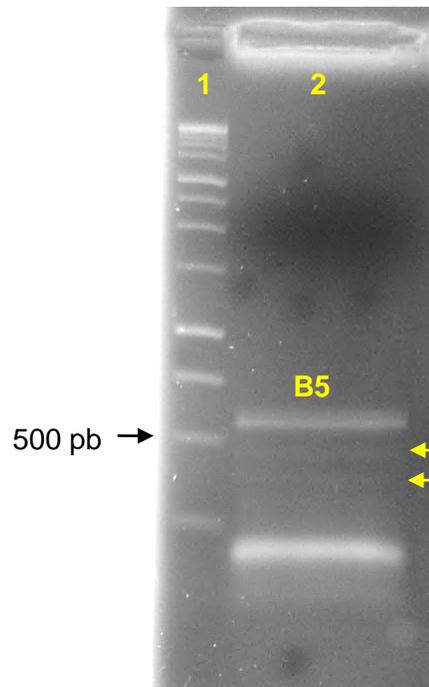


Figura 18 Contenido total del producto de amplificación de *F. solani* utilizando las condiciones 4 (Tabla 6) con 200 ng/ $\mu$ l y  $T_a$  de 63.2°C. Se señalan con flechas amarillas bandas de menor tamaño e intensidad que no se utilizaron para secuenciación.

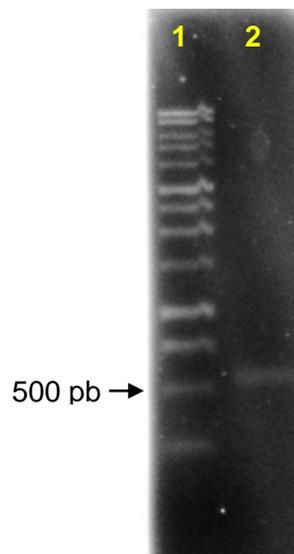


Figura 19 Verificación de la purificación de la banda de *F. solani*; la muestra fue concentrada a aproximadamente 20  $\mu$ l de volumen final: 1) Marcador 1kb; 2) Banda B5 purificada y concentrada.

#### 7.2.4 Secuencia de las bandas purificadas.

De las 5 bandas, solo las bandas B1 pertenecientes a *C. acutatum*, B2 y B3 pertenecientes a *C. gloeosporioides* y B5 perteneciente a *F. solani* mostraron similitud a secuencias reportadas en la base de datos del NCBI, las secuencias fueron reparadas utilizando las secuencias con mayor similitud obtenidas en el NCBI a continuación se muestran las secuencias reparadas:

Banda B1 de *C. acutatum* utilizando el iniciador F-Deg:

```
CGACCGTCGCCGCAACAACGTCAAGGCCACCTTCTTCGTCAACGGCAACAACACTGGGGC
AACATCGAGACGGCACCCGGCCCGGACAACATCCGCCGCATGAAGGCCGAGGGTCCAC
CTCATCGGCTCTCACACCTACTCTCACCCGGATCTGAGCACCTCTCCTCGGCGGACCG
CATCTCTCAGATGACCCAGCTCGAGGACGCGACCCGCCGTATCGCCGGCTTCGCGCCC
AAGTACATGCGCGCGCCGTTCTCTCCTGCGACGCCGCTTGCCTGAGCGATATGGCCA
GCCTGGGCTACCACGTCATCGACACCAGCCTCGATACAAAGGATTACGAGAACGACACC
CCCGAGACCACGCACATCTCGGCTGAGAAGTTCAACAACGAGCTTAGCGCCGACGCCG
CGAGCAACAGCTACATTGTCCTCTCCCACGATGTCCACCAGCAGACTGTCGTTTCTCTG
```

GTGCAGAAGATGATCGACAACCTCAAGTCCAAGGGCTACCGCGCCGTCACCGTCGGCG  
AGTGCCTCGG

Banda B2 de *C. gloeosporioides* utilizando el iniciador F-Deg:

GCGACGCCTATCCTCCACGTCAGCTGTGCACATCGATCATCGCTGGAGACACATTAGTA  
GGACATGATCAACGGCATCTCCGTCAGCACCCCTGCAGGAAGTACCCCCAAACCTGCCC  
GTAATCTGGCCGAGATCTGACTACATCAGCACATGATTGCCGAGGGTCACCAGGTGCGC  
AGCCACACGTGGTCTCACGAGAACCTCGACTCCTTGACACTGTCCCAGCGCCAGAACCA  
GATGGTGTACAACGAGATCGCCTTCACCGACATCTTGGGCTTCTACCCTACTTACATGC  
GTCCTCCTTACTCCATCTGCGGATCCGAGTGCCAGGGACAGATGGCCGATCTTGGTTAC  
CACATCACCTACTTTGATCTCGACACTCAGGGTTACCTGCACACCGACCCTAGCCAGAT  
CGGCGTCAGCGTCAACCTGTGGGGACCAAGCCATGCTGGCCAGGTCTCCTTGGCACGG  
GCTCCTACTTGCACATCGAGGCACGACATTCACCAGCAGATTGCCAGGTTCTTACTCC  
TCACATTCTGGACCTCCGTCGTTGCCAACGGCTGGAGGGCCGTCACCGTCGGCGAGTG  
CGCTCAG

Banda B3 de *C. gloeosporioides* utilizando el iniciador F-Deg:

CTTGTTCTTATGTGTATCTCTACTGCGCCGGGATGGGCAAGTGAGTCAGCCTCCTGGTT  
ACACAAGATGAGCGAAAGCATCGCGGACCCGACCCCGCTCGCCGCGCTGCGCCACCA  
GGGCCCCATCTCCACGGCGTACTTCTTCGACCACCACGCCACGCCGAGGATATCGCC  
GTCATGGTCACGGAGGAGGACTTCCTCGCCGCGAACC GCGA ACTCGTCCCGTCCGTCA  
GCGCGGGCGAGCTGTCTCACTACGAGCAGGTCCGCGCCATGTTTCGAGGGCTCGCCTG  
ACAAGGATAAGCAGCAGCAGCCG CAGCAGCAGCAGCGGCCGGCGACTGCAGGTTTGA  
GAGCCGTGTCTGGGTCTCGATCGTGTGAGGGCTAGTTCCAAGGGCAAGGGCAAGGC  
CGTCACCGTCGGCGAGTGCCTCA

Banda B5 de *F. solani* utilizando el iniciador F-Deg:

CCTTGCCCCTTACGTGTCTTTTCAGCTCATGATCTTGTGATAGATGCGTCGTGTTTCAGCG  
TTGCGGACTGTCTGGGCGAGCTGTAGGCGACGGATGGACTCTCTCTCGTAGCTCATAAT

GCGTTCAAACCTGGCAGTGACCTGTCGGAGCTGGGGAAGCGGAAGCAAGAACAGCATG  
TCAAACAATGGTGCAAGCTCGATCCGTTTGTGAACTGTGGGCATGACAGCTTGGAGATC  
TTCCACGTA CTGGCTTCTCTGTTAAGGATTTGTTAGTTGAGTCAGCCATATGTGGAATAA  
TGACACTCACTCTTCCTTGCTCTAGCATTCTGAAGGAACTGCCAAAGGTCAGGTCACCAA  
TAATATCCGTAGCCATAAAGCTGAACCATTTATGGACATCTGTGTACCCTACCTTTCTGTT  
TTCAACTTCCATCTGATCCATGGCCAAGTCCACCTTGGCCTGGATAAGCGGCTCAAAGG  
CGGGCAAGGATGAGTTGCTCAGAGGATGAGCCAGAAGCCGTCACCGTCGGCGAGTGC  
CTCAGCCC GCCGTCACCGTCGGCGAGTGCCTCAGATTCTTGGTAAAGTGTTTCTGTGC

En la

Tabla **9** se muestra el análisis de las bandas al utilizar la herramienta BLAST, la cual compara una secuencia de nucleótidos con otras secuencias reportadas en la base de datos del NCBI.

Tabla 9. Comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos del NCBI utilizando la herramienta BLAST.

Hongo	Banda e iniciador utilizado	Descripción	Valor E	Máx. identidad	Genebank ID	Referencia
<i>C. acutatum</i>	B1/F-Deg	Secuencia de gen CDA de <i>C. lindemuthianum</i>	1e-40	84%	AY633657.1	Shrestha y col., 2004
		ARNm de una xilanasa desacetilasa de <i>Verticillium albo-atrum</i>	6e-15	69%	9537701 XM_003002178.1	Ma y col., 2010
<i>C. gloeosporioides</i>	B2/F-Deg	Secuencia completa del gen quitina desacetilasa CBL1 de <i>M. grisea</i>	1e-31	75%	AB535713.1	Murata y col., 2009
		ARNm de una carbohidrato esterasa de la familia 4 de <i>N. haematococca</i>	4e-24	72%	XM_003050202.1	Coleman y col., 2009
<i>C. gloeosporioides</i>	B3/F-Deg	Secuencia completa del gen de proteína del peroxisoma PEX6 de <i>C. lagenarium</i>	7e-70	84%	AF343063.1	Kimura y col., 2001
<i>F. solani</i>	B5/F-Deg	ARNm de una proteína hipotética de <i>N. haematococca</i> con similitud a citocromos P450 de varios hongos.	4e-131	79%	XM_003043249.1	Coleman y col., 2009
<i>F. solani</i>	B5/F-Deg	Secuencia de gen quitina desacetilasa de <i>C. lindemuthianum</i>	0.25	100%	AY633657.1	Shrestha y col., 2004
<i>F. solani</i>	B5/F-Deg	Secuencia completa del gen quitina desacetilasa CBL1 de <i>M. grisea</i>	0.87	100%	AB535713.1	Murata y col., 2009

La secuencia de la banda B1 de *C. acutatum* mostró una similitud mayor a la secuencia parcial previamente reportada del gen de *C. lindemuthianum*, mismo gen en el cual fueron diseñados los oligonucleótidos no degenerados (F-CDA y R-CDA); la secuencia recuperada fue de 534 nucleótidos mientras la secuencia reportada para *C. lindemuthianum* dentro de la región consenso es de 522 nucleótidos (Shrestha y col., 2004), se encontró también similitud; aunque en menor porcentaje, al ARN mensajero (ARNm) de una xilanasa/desacetilasa bifuncional de *V. albo-atrum* (Ma y col. 2010; Secuencia de referencia en el NCBI XM\_003002178.1).

La secuencia de la banda B2 de *C. gloeosporioides* mostro una mayor similitud al gen de quitina desacetilasa de *M. grisea* (Murata y col., 2009; Secuencia de referencia en el NCBI AB535713.1) en el cual se basaron los sitios de degeneración en el diseño del oligonucleótido degenerado (F-Deg), la secuencia recuperada fue de 594 nucleótidos. También se encontró similitud al ARNm de una proteína de la familia de las carbohidrato esterasas de *N. haematococca* (Coleman y col., 2009), cuya forma asexual es conocida como *F. solani*, algunos autores han mencionado la homología de ciertas regiones de las quitina desacetilasas con regiones de las acetil xilan esterasas (Tsigos y col., 2000; Laurie y col., 1997; Fernandes y col., 1999); debido a este resultado se consideró evaluar los oligonucleótidos diseñados para los hongos del genero *Colletotrichum* en *F. solani*.

La secuencia de la banda B3 de *C. gloeosporioides* mostró similitud a la secuencia completa de un gen de una proteína Pex6 de *C. lagenarium* (Akiko y col. 2001), otras secuencias previamente reportadas de proteínas del peroxisoma de los hongos filamentosos *V. albo-atrum* (Ma y col. 2010) y *M. grisea* (Wang y col., 2006); dichas proteínas del peroxisoma parecen ser necesarias para la penetración mediada por los apresorios de hongos fitopatógenos (Akiko y col., 2001, Makoto y col., 2006). En general se observó similitud a genes de hongos fitopatógenos. Debido a que esta secuencia no es del interés de este trabajo no se continuó analizando.

La secuencia de la banda B5 de *F. solani* mostró similitud a la secuencia de un ARNm de *N. haematococca* que no está caracterizado, pero al utilizar la herramienta BLAST sobre esta secuencia de ARNm reportado se obtuvieron similitudes altas a ARNm de citocromos P450 de *Talaromyces stipitatus* (Fedorova y col., 2009), *A. oryzae* (Swano y col., 2011) y otros. También se pudieron observar similitudes a quitinas desacetilasas de *C. lindemuthianum* y

*M. grisea* pero estas solo fueron en regiones cortas de entre 25 a 26 pb, estas regiones similares fueron idénticas a la secuencia complementaria del oligonucleótido R-CDA, por lo mismo los valores E obtenidos son altos; ya que esta banda no es del interés de este trabajo no se continuo analizando.

En la Tabla 11 se muestra el análisis de las secuencias de la banda B1 y B2 de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* respectivamente utilizando la herramienta BLASTX, la cual traduce la secuencia a analizar a la proteína correspondiente y busca similitudes con otras proteínas reportadas. Ambas secuencias muestran máximas identidades altas a otras secuencias de quitina desacetilasas del género *Colletotrichum* o su estado asexual *Glomerella*, aunque también a polisacárido desacetilasas no caracterizadas de otros géneros.

Tabla 10. Comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos del NCBI utilizando la herramienta BLASTX.

Hongo	Banda e iniciador utilizado	Descripción	Max. Identidad	Valor E	Genebank ID	Referencia
<i>C. acutatum</i>	B1/F-Deg	Cadena A, Estructura de la quitina desacetilasa del hongo patógeno <i>C. lindemuthianum</i>	79%	3e-99	2IW0_A	Blair y col., 2006
		Polisacárido desacetilasa de <i>Colletotrichum higginsianum</i>	82%	3e-97	CCF43628.1	ND
		Polisacárido desacetilasa de <i>Glomerella graminicola</i>	77%	4e-95	EFQ25242.1	Vaillancourt y col., 2010
		Quitina desacetilasa de <i>Verticillium dahliae</i>	53%	1e-56	EGY14496.1	Ma y col., 2011
<i>C. gloeosporioides</i>	B2/F-Deg	Proteína de unión a la quitina de <i>C. higginsianum</i>	73%	1e-61	CCF45230.1	ND
		Polisacárido desacetilasa <i>G. graminicola</i>	71%	2e-59	EFQ36004.1	Vaillancourt y col., 2010
		Proteína de unión a la quitina de <i>C. graminicola</i>	67%	1e-54	EFQ27037.1	Vaillancourt y col., 2010
		Quitina desacetilasa putativa de <i>Magnaporthe oryzae</i>	53%	2e-38	BAI44124.1	Mochizuki y col., 2011

En la Tabla 12 se muestra el análisis de las secuencias de la banda B1 y B2 de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* respectivamente utilizando la herramienta TBLASTX, la cual traduce tanto la secuencia a analizar y otras secuencias reportadas a sus proteínas correspondientes y busca similitudes con otras proteínas reportadas. Para la banda B1 de *C. acutatum* se obtienen valores E de  $3E-92$  a desacetilasas de *C. lindemuthianum*, y valores E menores a desacetilasas de *M. oryzae* y *A. fumigatus*.

Los valores E más bajos obtenidos utilizando las herramientas BLASTX y TBLASTX comparados con los obtenidos con la herramienta BLAST son debido al degeneramiento del código genético, donde varios codones pueden codificar a un mismo aminoácido.

Tabla 11. Comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos del NCBI utilizando la herramienta TBLASTX.

Hongo	Banda e iniciador	Descripción	Valor E	Genebank ID	Referencia
<i>C. acutatum</i>	B1/F-Deg	Gen quitina desacetilasa <i>C. lindemuthianum</i>	3e-92	AY633657.1	Shrestha y col., 2004
		ARNm de una polisacárido desacetilasa de <i>A. fumigatus</i>	7e-40	XM_746739.1	Nierman y col. 2005
		Gen putativo de quitina desacetilasa de <i>M. oryzae</i>	4e-39	AB513124.1	Mochizuki y col. 2011
		Gen putativo de quitina desacetilasa de <i>M. grisea</i>	4e-39	AB535713.1	Murata y col. 2009
		Polisacárido desacetilasa de <i>A. clavatus</i>	4e-38	XM_001271869.1	Nierman, 2008
<i>C. gloeosporioides</i>	B2/F-Deg	ARNm de carbohidrato esterasa de <i>Myceliophthora thermophila</i>	6e-41	XM_003662913.1	Berka y col., 2011
		Gen putativo de quitina desacetilasa de <i>M. oryzae</i>	7e-39	AB513124.1	Mochizuki y col., 2011
		Gen de quitina desacetilasa de <i>M. grisea</i>	7e-39	AB535713.1	Murata y col., 2009
		ARNm de una carbohidrato esterasa de <i>Thielavia terrestris</i>	3e-38	XM_003655563.1	Berka y col., 2011
		ARNm parcial quitina desacetilasa de <i>A. clavatus</i>	4e-26	XM_001268140.1	Nierman, 2008
		ARNm de una quitina desacetilasa de <i>A. fumigatus</i>	3e-26	XM_745838.1	Nierman y col., 2005

## 8. Conclusiones.

Se determinó la producción de CDAs en CL y CS de 4 hongos fitopatógenos, los resultados obtenidos mostraron un efecto significativo del tipo de cultivo sobre la producción de las CDAs. *C. gloeosporioides* mostró una mayor actividad en cultivo líquido; sin embargo la actividad CDA en *C. acutatum* y *F. solani* solo está presente cuando el hongo crece en cultivo sólido; por lo que este tipo de cultivo continua siendo atractivo para la producción de CDAs; se ha reportado que *C. graminicola* desarrolla apresorios y túbulos germinales en superficies duras como vidrio y plástico, y posteriormente otras estructuras infectivas que contienen quitosano en su superficie se desarrollan a los pocos días (El Gueddari y col. 2002), esto podría explicar porque en el cultivo líquido de *F. solani* no es posible detectar actividad CDA, ya que tampoco fue posible encontrar apresorios, mientras que en el cultivo líquido si se encontró tanto apresorios como matriz extracelular que están relacionadas en los procesos de patogénesis. Sin embargo para *C. acutatum* parece ser que la producción de CDAs no solo esta relacionada con el desarrollo de apresorios, ya que ambos tipos de cultivo mostraron estas estructuras infectivas, y que otros factores que son proporcionados por las propias características y ventajas del cultivo sólido son necesarios para la producción de CDAs, estas características podrían ser la transferencia de nutrientes y oxígeno, o probablemente exista algún tipo de represión catabólica que sea más notoria en el cultivo líquido.

Se identificaron secuencias parciales de genes hipotéticos de CDA de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, que mostraron homología a genes y proteínas CDA, así como otras polisacárido desacetilasas y carbohidrato esterasas previamente reportadas, estos resultados confirman la presencia de actividad CDA en los hongos seleccionados.

## 9. Referencias.

- Akiko K., Yoshitaka T., Iwao F. Tetsuro O. Peroxisomal metabolic function is required for appressorium-mediated plant infection by *Colletotrichum lagenarium*. 2001. *The Plant Cell*. 13, 1945-1957.
- Alonso D., Gimeno M., Olayo R., Vázquez H., Sepúlveda J., Shirai K. 2009. Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial finished textiles. *Carbohydrate Polymers*. 77:536-543.
- Arakane Y., Dixit R., Begum K., Park Y., Specht C., Merzendorfer H., Kramer K., Muthukrishnan S., Beeman R. 2009. Analysis of functions of the chitin deacetylase gene family in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 39:355-365.
- Aoki T., O'Donnell K., Homma Y., Lattanzi A. 2003. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex-*F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia*. 95(4):660-684.
- Araki Y., Ito E. 1975. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: Enzymatic deacetylation chitin. *European Journal of Biochemistry*. 55:71-78.
- Arriaga S., Revah S. 2005. Removal of *n*-hexane by *Fusarium solani* with a gas-phase biofilter. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 32:548-553.
- Barber M., Bertram E., Ride J. 1989. Chitin oligosaccharides elicit lignifications in wounded wheat leaves. *Physiological and molecular plant pathology*. 34:3-12.
- Barrios-Gonzalez J. 2011. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*. 47:175-185.
- Berka R., Grigoriev I., Otilar R., Salamov A., Grimwood J., Reid I., Ishmael N., John T., Darmond C., Moisan M., Henrissat B., Coutinho P., Lombard V., Natvig D., Lindquist E., Schmutz J., Lucas S., Harris P., Powlowski J., Bellemare A., Taylor D., Butler G., de Vries R., Allijn I., van den Brink J., Ushinsky S., Storms R., Powell A., Paulsen I., Elbourne L., Baker S., Magnuson J., Laboissiere S., Cluterbuck A., Martinez D., Wogulis M., de Leon A., Rey M.,

- Tsang A. 2011. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nature Biotechnology*. 29(10):922-927.
- Bigelis R., He H., Yang H., Chang L., Greenstein M. 2006. Production of fungal antibiotics using polymeric solid supports in solid-state and liquid fermentation. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 33:815-826.
- Blair D., Hekmat O., Schuttelkopf A., Shrestha B., Toyuyasu K., Withers S., Van Aalten D. 2006. Structure and mechanism of chitin deacetylase from the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry*. 45:9416-9426.
- Brown A., Sreenivasaprasad., Timmer L. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and Key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology*. 86:523-527.
- Brown T. 1993. *Essential Molecular Biology: A practical approach*. IRL Press at Oxford University Press. Volume I.
- Carver T., Ingerson-Morris S., Thomas B., Zeyen R. 1995. Early interactions during powdery mildew infection. *Canadian Journal of Botany*. 73(1):632-639.
- Chatterjee S., Chatterjee S., Chatterjee B., Guha A. 2008. Enhancement of growth and chitosan production by *Rhizopus oryzae* in whey medium by plant growth hormones. *International Journal of Biological Macromolecules*. 42:120-126.
- Chau K. F., Alvarez A. M. 1983. A histological study of anthracnose on *Carica papaya*. *Phytopathology*. 73:1113-1116.
- Chiang Y., Wang T., Lee W. 2009. Chitosan coating for the protection of amino acids that were entrapped within hydrogenated fat. *Food Hydrocolloids*. 23:1057-1061.
- Christodoulidou A., Bouriotis V., Thireos G. 1996. Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. 271:31420-31425.
- Christodoulidou A., Briza P., Ellinger A., Bouriotis V. 1999. Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes. *FEBS Letters*. 460:275-279.

Chung Y., Chen C. 2008. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*. 99:2806-2814.

Cira L., Huerta S., Hall G., Shirai K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*. 37:1359-1366.

Coleman J., Rounsley S., Rodriguez M., Kuo A., Wasmann C., Grimwood J., Schmutz J., Taga M., White G., Zhou S., Schwartz D., Freitag M., Ma L., Danchin E., Henrissat B., Coutinho P., Nelson D., Straney D., Napoli C., Barker B., Gribskov M., Rep M., Kroken S., Molnar I., Rensing C., Kennell J., Zamora J., Farman M., Selker E., Salamov A., Shapiro H., Pangilinan J., Lindquist F., Lamers C., Grigoriev I., Geiser D., Covert S., Temporini E., Vanetten H. 2009. The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. *PLoS Genetics*. 5(8).

Davis L., Bartnicki S. 1984. Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Biochemistry*. 23:1065-1073.

De Vrije T., Antoine N., Buitelaar R., Bruckner S., Dissevelt M., Durand A., Gerlagh M., Jones E., Lüth P., Oostra J., Ravensberg W., Renaud R., Rinzema A., Weber F., Whipps J. 2001. The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and marketing. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56:58-68.

Deising H., Seigrist J. 1995. Chitin deacetylase activity of the rust *Uromyces viciae-fabae* controlled by fungal morphogenesis. *FEMS Microbiology Letters*. 127:207-212.

De Santiago C. 2011 Estudio del efecto de inductores sobre la actividad quitina desacetilasa de hongos fitopatógenos. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM.

Díaz-Godínez G., Soriano-Santos J., Augur C., Viniegra-González G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26:271-275.

El Ghaouth A., Arul J., Grenier J., Asselin A. 1992. Effect of chitosan and other polyions on chitin deacetylase in *Rhizopus stolonifer*. *Experimental Mycology*. 16:173-177.

El-Sharif A., Hussain M. 2011. Chitosan-EDTA new combination is a promising candidate for treatment of bacterial and fungal infections. *Current Microbiology*. 62:739-745.

Epstein L., Laccetti L., Staples R., Hoch H. Cell-substratum adhesive protein involved in surface contact responses of the bean rust fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 30(3):373-388.

Fedorova N., Joardar V., Maiti R., Schobel S., Amedeo P., Galens K., Inman J., Galinsky K., White O., whitty b., Wortman J., Nierman W. 2009. No Publicado.

Fernandes A. C., Fontes C. M., Gilbert H. J., Hazlewood G. P., Fernandes T. H., Ferreira L. M. 1999. Homologous xylanases from *Clostridium thermocellum*: evidence for bi-functional activity, synergism between xylanase catalytic modules and the presence of xylan-binding domains in enzyme complexes. *Biochemistry Journal*. 324:105-110.

Flaishman M., Kolattukudy P. 1994. Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as signal. *Proceedures of the National Academy of Science*. 91:6579-6583

Foster J., Thomson K., Marcal H., Butt J., Watson S., Wakefield D. 2010. Chitosan-vancomycin composite biomaterial as a laser activated surgical adhesive with regional antimicrobial activity. *Biomacromolecules*. 11:3563-3570.

Gao X., Katsumoto T., Onodera K. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *Journal of Biochemistry*. 117:257-263.

Gauthier C., Clerisse F., Dommes J., Jaspard M. 2008. Characterization and cloning of chitin deacetylases from *Rhizopus circinans*. *Protein Expression and Purification*. 59:127-137.

El Gueddari N., Rauchhaus U., Moerschbacher B., Deising H. 2002. Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytologist*. 2002. 156:103-112.

Hoch H., Staples R. 1991. Signaling for infection structure formation in fungi. The fungal spore and disease initiation in plants and animals. New York: Plenum. 25-46.

Hölker U., Höfer M., Lenz J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology Bioechnology*. 64:175-186.

Jeraj N., Kunič B., Lenasi H., Breskvar K. 2006. Purification and molecular characterization of chitin deacetylase from *Rhizopus nigricans*. *Enzyme and Microbial Technology*. 39:1294-1299.

John M., Röhrig H., Schmidt J., Wieneke U., Schell J. 1993. *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90:625-629.

Ishida H., Hata Y., Kawato A., Abe Y., Suginami K., Imayasu S. 2000. Identification of functional elements that regulate the glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid state culture of *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics*. 37:373-379.

Kwon Y., Esptein L., Staples R. 1991. Cytoskeletal organization in *Uromyces urediospore* germlings apices during appressorium formation. *Protoplasma*. 165:37-53.

Kafetzopoulos D., Thireos G., Vournakis J., Bouriotis V. 1993. The primary structure of fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90:8005-8008.

Kauss H., Bauch B. 1988. Chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Methods in Enzymology*. 161:518-523.

Kauss H., Jeblick W., Domard A. 1989. The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determines its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplast of *Catharanthus roseus*. *Planta*. 178:385-392.

Kim Y., Young J., Zhao Y., Oh K., Nguyen V., Dong R. 2008. Enzymatic deacetylation of chitin by extracellular chitin deacetylase from newly screened *Mortierella* sp. DY-52. *Journal of Microbiology Biotechnology*. 18:759-766.

Kimura A., Takano Y., Furusawa I., Okuno T. 2001. Peroxisomal metabolic function is required for appressorium-mediated plant infection by *Colletotrichum lagenarium*. *Plant Cell*. 13(8):1945-1957.

Laurie J. I., Clarke J. H., Ciruela A., Faulds C. B., Williamson G., Gilbert H. J., Rixon J. E., Millward-Sadler J., Hazlewood G. P. 1997. The NodB domain of multidomain xylanase from *Cellulomonas fimi* deacetylates acetylxylan. FEMS Microbiology Letters. 148:261-264.

Liu T., Zhao L., Sun D., Tan X. 2010. Entrapment of nanoscale zero-valent iron in chitosan beads for hexavalent chromium removal from wastewater. Journal of Hazardous Materials. 184:724-730.

Ma L., Klosterman S., Subbarao K., Dobinson K., Veronese P., Kang S., Gold S., Young S., Jaffe D., Gnerre S., Berlin A., Heiman D., Hepburn T., Sykes S., Chen Z., Alvarado L., Kodira C., Lander E., Galagan J., Nusbaum C., Birren B. 2010. Annotation of *Verticillium albo-atrum* VaMs.102. No publicado.

Ma L., Klosterman S., Subbarao K., Dobinson K., Veronese P., Kang S., Gold S., Young S., Jaffe D., Gnerre S., Berlin A., Heiman D., Hepburn T., Sykes S., Alvarado L., Kodira C., Lander E., Galagan J., Nusbaum C., Birren B. 2011. The genome sequence of *Verticillium dahlia* VdLs.17. No publicado.

Makoto A., Tetsuro O., Yoshitaka T. 2006. Multiple contributions of peroxisomal metabolic function to fungal pathogenicity in *Colletotrichum lagenarium*. Applied and Environmental Microbiology. 72, 6345-6354.

Malenčić D., Kevrešan S., Popović B., Kiprovski B., Djurić S. 2012. Cholic acid changes defense response to oxidative stress in soybean induced by *Aspergillus niger*. Central Journal of Biology. 7(1):132-137.

Martínez G., Shirai K., Pelayo C., Pérez J., Sepúlveda J. 2009. Effect of *Lactobacillus plantarum* and chitosan in the reduction of browning of pericarp Rambutan (*Nephelium lappaceum*). Food Microbiology. 26:444-449.

McMurrough I., Floresca A., Bartinicki S. 1971. Pathway of chitin synthesis and cellular localization of chitin synthase in *Mucor rouxii*. Journal of Biological Chemistry. 246:3999-4007.

Meens J., Schreiber C., Hain M. 2001. Screening of marine fungi for new chitin deacetylase enzymes. Chitin Enzymology 2001. Editado por Riccardo A. A. Muzzarelli. 533-539.

Mendgen K., Hahn M., Deising H. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 34:367-386.

Mochizuki S., Saitoh K., Minami E., Nishizawa Y. 2011. Localization of probe-accessible chitin and characterization of genes encoding chitin-binding domains during rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. *Journal of General Plant Pathology*. 77:163-173.

Moerschbacher B., Noll U., Flott B., Reinsener H. 1988. Lignin biosynthetic enzymes in steam rust infected, resistant and susceptible near-isogenic wheat lines. *Physiological and molecular plant pathology*. 33:33-46.

Murad A., Noronha E., Miller R., Costa F., Pereira C., Mehta A., Caldas R., Franco O. 2008. Proteomic analysis of *Metarhizium anisopliae* secretion in the presence of the insect pest *Callosobrunchus maculatus*. *Microbiology*. 154:3766-3774.

Murata S., Ohno Y., Nakajima Y., Kamakura T., 2009. Involvement of *Magnaporthe oryzae* homologous chitin deacetylase protein genes in appressorium differentiation. No publicado.

Muzzarelli R. 2011. Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration. *Carbohydrate Polymers*. 83:1433-1445.

Nahar P., Ghormade V., Deshpande M. 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85:80-88.

Nierman W., Pain A., Anderson M., Wortman J., Kim H., Arroyo J., Berriman M., Abe K., Archer D., Bermejo C., Bennett J., Bowyer P., Chen D., Collins M., Coulsen R., Davies R., Dyer P., Farman M., Fedorova N., Fedorova N., Feldblyum T., Fischer R., Fosker N., Fraser A., Garcia J., Garcia M., Goble A., Goldman G., Gomi K., Griffith-Jones S., Gwilliam R., Haas B., Haas H., Harris D., Horiuchi H., Huang J., Humphray S., Jimenez J., Keller N., Khouri H., Kitamoto K., Kobayashi T., Konzack S., Kulkarni R., Kumagai T., Lafon A., Latge J., Li W., Lord A., Lu C., Majoros W., May G., Miller B., Mohamoud Y., Molina M., Monod M., Mouyna I., Mulligan S., Murphy L., O'Neil S., Paulsen I., Penalva M., Perteua M., Price C., Pritchard B., Quail M., Rabinowitsch E., Rawlins N., Rajandream M., Reichard U., Renauld H., Robson G., Rodriguez de Cordoba S., Rodriguez-Peña J., Ronning C., Rutter S., Salzberg S., Sanchez M., Sanchez-Ferrero J., Saunders D., Seeger K., Squares R., Squares S., Takeuchi

M., Tekaia F., Turner G., Vazquez de Aldana C., Weidman J., White O., Woodward J., Yu J., Fraser C., Galagan J, Asai K., Machida M., Hall N., Barrell B., Denning D. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. 438(7071):1151-1156.

Nierman W. 2008. Secuencia. No publicado.

Nwe N., Stevens W. 2002. Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction, *Biotechnology Letters*. 24:131-134.

Ozer N. 2011. Screening for fungal antagonists to control black mold disease and to induce the accumulation of antifungal compounds in onion after seed treatment. *Biocontrol*. 56(2):237-247.

Podila G., Rogers L., Kolattukudy P. 1993. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotricum gloeosporioides*. *Plant Physiology*. 103:267-272.

Ramírez M. 2008. Análisis del perfil génico de *Pichia guilliermondii* durante su interacción *in vivo* con *Penicillium digitatum*. Tesis de Maestría. Centro de Biotecnología Genómica.

Ramírez-Coutiño L., Marín-Cervantes M., Huerta S., Revah S., Shirai K. 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*. 41:1106-1110.

Rangel J., Monroy R., Leyva E., Díaz P., Shirai K. 2009. Chitosan selectivity for removing cadmium (ii), cooper (ii), and lead (ii) from aqueous phase: pH and organic matter effect. *Journal of Hazardous Materials*. 162:503-511.

Romero S., Augur C., Viniegra G. 2000. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. 15:1255-1258.

Shrestha B., Blondeau K., Stevens W., Hegarat F. 2004. Expression of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein expression and purification*. 38:196-204.

Siegrist J., Kauss H. 1990. Chitin deacetylase in cucumber leaves infected by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 36:267-275.

Suresh P., Sachindra N., Bhaskar N. 2011. Solid state fermentation production of chitin deacetylase by *Colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676 using different substrates. *Journal of Food Science Technology* 48:349-356.

Swano T., Tanaka T., Machida M., Yamada O. 2011. No Publicado.

Téllez M., Fernández F., Montiel A., Sánchez C., Díaz G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*. 81: 675-679.

Timmer L., Brown G., Zitko S. 1998. The role of *Colletotrichum spp.* in postharvest anthracnose of citrus and survival of *C. acutatum* on fruit. *Plant Disease*. 82:415-418.

Tokuyasu K., Ohnishi M., Hayashi K. 1996. Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 60:1598-1603.

Tokuyasu K., Ohnishi M., Hayashi K., Mori Y. 1999. Cloning and expression of chitin deacetylase gene from deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87:418-423.

Toprak, U., Baldwin, D., Erlandson, M., Gillott, C., Hou, X., Coutu, C., Hegedus, D.D. 2008. A chitin deacetylase and putative insect intestinal lipases are components of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix. *Insect Molecular Biology*. 17:573-585.

Tsigos I., Bouriotis V. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *The Journal of Biological Chemistry*. 270:26286-26291.

Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 18:305-311.

Vaillancourt L., Ma L., Thon M., Dickman M., Young S., Zeng Q., Koehrsen M., Alvarado L., Berlin A., Borenstein D., Chen Z., Engels R., Freedman E., Gellesch M., Goldberg J., Griggs

A., Gujja S., Heiman D., Hepburn T., Howarth C., Jen D., Larson L., Lewis B., Mehta T., Park D., Pearson M., Roberts A., Saif S., Shea T., Shenoy N., Sisk P., Stolte C., Sykes S., Walk T., White J., Yandava C., Haas B., Galagan J., Nusbaum C., Birren B. 2010. The genome sequence of *Glomerella graminicola* strain M1.001. No publicado.

Vander P., Varum K., Domard A., Gueddari N., Moerschbacher B. 1998. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiology*. 118:1353-1359.

Viniegra-González G., Favela-Torres E., Aguilar C., Romero-Gomez S., Díaz-Godínez G., Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13:157-167.

Viniegra-Gonzalez G., Favela-Torres E. 2006. Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression?. *Food Technology Biotechnology*. 44(3):397-406.

Wang B., Guo G., Wang C., Lin Y., Wang X., Zhao M., Guo Y., He M., Zhang Y., Pan L. 2010. Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mRNA sequencing. *Nucleid Acid Reserch*. 38(15):5075-5087.

Wang Z., Soanes D. M., Talbot N. J. 2006. Fatty acid beta-oxidation and peroxisomal biogenesis are required for appressorium function by *Magnaporthe grisea*. School of Biosciences, University of Exeter.

Wharton P., Diéguez J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 61:3-22.

White S., Farina P., Fulton I. 1979. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Applied Enviromental Biotechnology*. 38(2):323-328.

Win N., Stevens W. 2001. Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Applied Microbiology Biotechnology*. 57:334-341.

Yin H., Zhao X., Du Y. 2010. Oligochitosan: A plant diseases vaccine-A review. *Carbohydrate Polymers*. 82:1-8.

Zhang Y., Wei W., Lv P., Wang L., Ma G., 2011. Preparation and evaluation of alginate-chitosan microspheres for oral delivery of insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 77:11-19.

Zhao Y., Park R., Muzzarelli R. 2010. Chitin deacetylases: properties and applications. *Marine Drugs*. 8:24-46.

Zulfiqar M., Brlansky R. H., Timmer L. W. 1996. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Mycologia*. 88:121-128.

## 10. ANEXOS

### 10.1 Curvas Patrón.

#### 10.1.1 Curva de Proteína (Seroalbúmina bovina) determinada con microensayo de Bradford.

Se preparó una solución de seroalbúmina bovina de 100 µg/ml y se diluyó para preparar una serie de muestras de 0 a 15 µg/ml. Se agregaron 160 µl de las muestras de seroalbúmina y 40 µl de reactivo de Bradford en pozos de una una microplaca y se homogenizó por pipeteo. Se determinó la absorbancia de las muestras a 595 nm en un lector automatizado de microplacas.

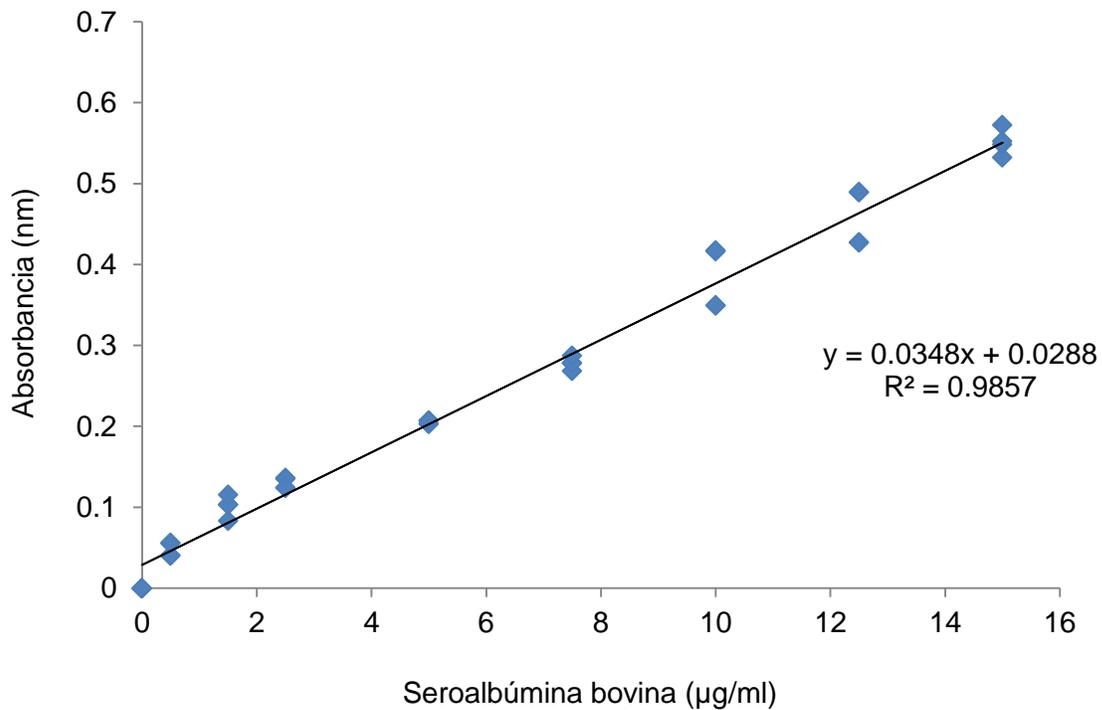


Figura 20 Curva patrón para la determinación de proteína por el método de Bradford.

### 10.1.2 Curva de glucosamina (Kauss y Bauch; 1988).

Se preparó una solución de glucosamina de 0.1  $\mu\text{mol/ml}$  y se diluyó para preparar una serie de muestras de 0 a 0.035  $\mu\text{mol/ml}$ . Se realizó la técnica de Kauss y Bauch (1988) reemplazando la EGC con las soluciones de glucosamina y el extracto enzimático por agua; no se incubaron las muestras.

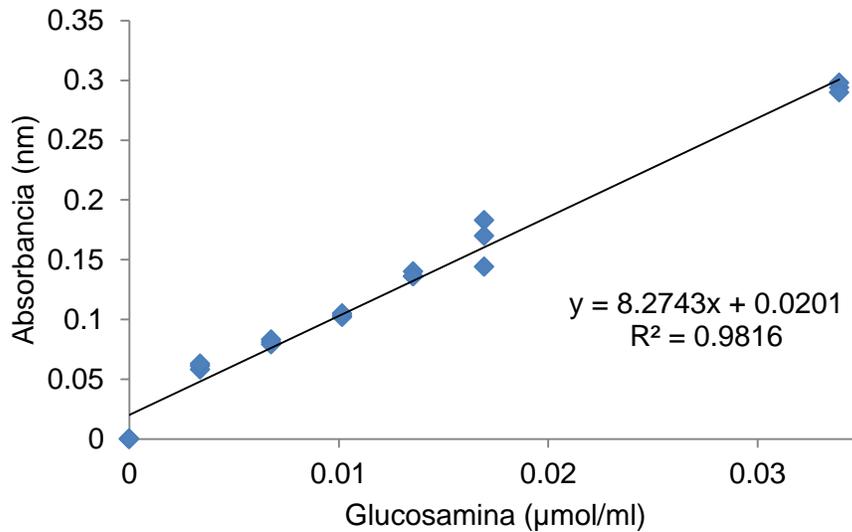


Figura 21 Curva patrón de glucosamina para determinación de actividad CDA por el método de Kauss y Bauch (1988).

## 10.2 Análisis estadístico.

### 10.2.1 Actividad CDA (U/gsi).

Tabla 12 Descriptivos de análisis estadístico de actividad CDA expresada como U/gsi.

Hongo/Tiempo/ Cultivo	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<i>C. gloeosporioides/</i> 48h/CL	5	1.47800	.342470	.153157	1.05277	1.90323	1.165	2.000
<i>C. gloeosporioides/</i> 48h/CS	5	.54580	.147659	.066035	.36246	.72914	.354	.668
<i>C. acutatum/24h/CS</i>	5	.81420	.271276	.121318	.47737	1.15103	.503	1.058
<i>F. solani/24h/CS</i>	5	.32820	.073917	.033057	.23642	.41998	.256	.438
Total	20	.79155	.492397	.110103	.56110	1.02200	.256	2.000

Tabla 13 ANOVA de actividad CDA expresado como U/gsi.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter- grupos	3.734	3	1.245	22.823	.000
Intra- grupos	.873	16	.055		
Total	4.607	19			

Tabla 14 Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para actividad CDA expresada como U/gsi.

Hongo/Tiempo/ Cultivo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
<i>F. solani</i> /24h/CS	5	.32820		
<i>C. gloeosporioides</i> / 48h/ CS	5	.54580	.54580	
<i>C. acutatum</i> /24h/CS	5		.81420	
<i>C. gloeosporioides</i> / 48h/CL	5			1.47800
Sig.		.475	.302	1.000

### 10.2.2 Actividad CDA (U/ml).

Tabla 15 Descriptivos de análisis estadístico de actividad CDA expresada como U/ml.

Hongo/Tiempo/ Cultivo	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<i>C. gloeosporioides</i> / 48h/ CL	5	.03415	.007913	.003539	.02433	.04398	.027	.046
<i>C. gloeosporioides</i> / 48h/CS	5	.01261	.003417	.001528	.00837	.01685	.008	.015
<i>C. acutatum</i> /24h/CS	5	.01881	.006270	.002804	.01103	.02660	.012	.024
<i>F. solani</i> /24h/CS	5	.00758	.001713	.000766	.00545	.00971	.006	.010
Total	20	.01829	.011379	.002544	.01296	.02362	.006	.046

Tabla 16 ANOVA de actividad CDA expresada como U/ml.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter- grupos	.002	3	.001	22.815	.000
Intra- grupos	.000	16	.000		
Total	.002	19			

Tabla 17 Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para actividad CDA expresada como U/ml.

Hongo/Tiempo/ Cultivo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
<i>F. solani</i> /24h/CS	5	.00758		
<i>C. gloeosporioides</i> / 48h/CS	5	.01261	.01261	
<i>C. acutatum</i> /24h/CS	5		.01881	
<i>C. gloeosporioides</i> / 48h/CL	5			.03415
Sig.		.475	.302	1.000

### 10.2.3 Actividad CDA (U/mg de proteína).

Tabla 18 Descriptivos de análisis estadístico de actividad específica CDA (U/mg de proteína).

Hongo/Tiempo/ Cultivo	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<i>C. gloeosporioides</i> /48h/CL	5	13.7822 8	3.193385	1.428125	9.81717	17.7473 9	10.863	18.649
<i>C. gloeosporioides</i> /48h/CS	5	.78683	.375860	.168090	.32013	1.25352	.517	1.408
<i>C. acutatum</i> /24h/ CS	5	2.65285	.669440	.299383	1.82163	3.48407	1.922	3.204
<i>F. solani</i> /24h/CS	5	.19986	.046917	.020982	.14161	.25812	.160	.274
Total	20	4.35546	5.857956	1.309879	1.61385	7.09706	.160	18.649

Tabla 19 ANOVA de actividad específica CDA (U/mg de proteína)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter- grupos	608.840	3	202.947	75.240	.000
Intra- grupos	43.157	16	2.697		
Total	651.997	19			

Tabla 20 Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para actividad específica CDA (U/mg de proteína)

Hohngo/Tiempo/ Cultivo	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
<i>F. solani</i> /24h/CS	5	.19986	
<i>C. gloeosporioides</i> /48h/CS	5	.78683	
<i>C. acutatum</i> /24h /CS	5	2.65285	
<i>C. gloeosporioides</i> /48h/CL	5		13.7822 8
Sig.		.125	1.000