

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO -BIOLÓGICAS



**“Determinación de la presencia del gen *cdh* en
Colletotrichum lindemuthianum (Sacc & Magnus) Lamb
Scrib”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

IBQ. CLAUDIA ADRIANA RAMÍREZ VALDESPINO

ASESOR:

D.C. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

CO-ASESORA:

D.C. GEORGINA ELENA REYNA LÓPEZ

Morelia, Michoacán, Diciembre 2011.

RESUMEN

La celobiosa deshidrogenasa (CDH) es una hemoflavoenzima óxido-reductasa fúngica extracelular de interés biotecnológico. En el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* se ha descrito la actividad enzimática tipo CDH, que mostró un amplio espectro de sustratos. Por lo que es importante establecer su correlación con la presencia del gen *cdh* en el genoma del hongo. Con oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de secuencias conservadas de CDH homólogas de ascomicetos, se amplificó una secuencia de aproximadamente 500 pares de bases, la cual compartió un 87% de similitud con los genes *cdh* I de *N. crassa*, 86% con el de *S. macrospora*, 55% con el de *H. insolens*, 36% con el de *A. clavatus* y un 16% con el de *S. bisbyi*. Al igual que para algunos hongos que presentan el gen *cdh*, en *C. lindemuthianum* se detectó una doble copia. Se determinó la expresión temporal del gen *cdh* y el tamaño de su transcrito que es de aproximadamente 2500 pares de bases, similar en tamaño a los genes *cdh* descritos. Los resultados de este trabajo indican que el gen *cdh* está presente en el genoma de *C. lindemuthiamun* y su expresión y la actividad enzimática tipo CDH correlacionan.

Agradecimientos:

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ya que a través del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas me permitió realizar mis estudios de posgrado en su programa de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mi estancia en la maestría.

Al programa de ECOES-Movilidad Santander, por la beca otorgada en el periodo Enero-Mayo del 2011.

A la División de Ciencias Naturales y Exáctas de la Universidad de Guanajuato, por permitirme realizar la parte experimental de este trabajo en sus instalaciones.

A los doctores J. Félix Gutiérrez Corona y Guadalupe Martínez Cadena por permitir que trabajara en sus laboratorios.

Y sabemos que a los que aman a Dios, todas las cosas les ayudan a bien...

Romanos 8.28

IIQB-UMSNH

Te dedico este logro
a Ti, esperanza mía, castillo mío,
mi fortaleza y en quien confío.
Gracias por haber hecho lo que hiciste por mí.

AGRADECIMIENTOS:

A ti Señor, que me das vida y me llevas con amor en tu camino, gracias por las pruebas, por la disciplina. Gracias porque en cada momento de este proyecto y de mi vida estuviste conmigo y gracias a Ti estoy donde estoy y soy lo que soy.

A mis padres y familia, por su apoyo constante y por su amor. Porque a pesar de la distancia, siempre me han acompañado. Los amo.

A mis asesores, los doctores Georgina E. Reyna López y Mauro M. Martínez Pacheco, por dirigirme en la realización de este trabajo, compartir sus conocimientos conmigo y guiarme a lo largo de dos años.

A mi comité tutorial, integrado por los doctores: Rodolfo López Gómez, Rafael Salgado Garciglia y Rosa Elva Norma del Río Torres, por las observaciones realizadas al trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Fisiología Celular en Morelia, muy especialmente a Alberto y a la maestra María Eugenia, gracias por su apoyo. Mariana, quien iba a decir que después de haber sido mi maestra en la licenciatura seríamos compañeras de laboratorio, gracias por tu apoyo. Mony, gracias por compartir tus conocimientos conmigo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio en Guanajuato: Hilda y Cruz, gracias por su apoyo y amistad. Cruz, gracias por ayudarme con mis experimentos.

Ángeles, Caro, Migue, Sandra y a los que me falta por mencionar, por hacer más grata mi estancia al llenarla de risas y consejos.

A Alma, Liz y Cintia por abrirme las puertas de su casa durante esta estancia, por su constante apoyo y palabras de ánimo cuando más lo necesitaba y sobre todo por su amistad. Las quiero niñas.

A los técnicos Nacho y Aurelio, por ayudarme con las hibridaciones, fueron parte importante de este proyecto y a todas las demás personas que conocí en la División de Ciencias Naturales y Exactas.

Gracias a todas las personas hermosas que he podido conocer en esta experiencia: Álvaro Camarena, por ayudarme, apoyarme y adoptarme, junto a su linda esposa y familia.

Paco, gracias por compartir tus enseñanzas y risas conmigo. Adrian (que ya te encuentras en un lugar mucho mejor) y Lolita, Alex y Raquel, Carlitos y Lulú, Familia Nájera Ruiz y a todos aquellos que me faltan por mencionar... Dios les bendiga abundantemente y les multiplique todo lo que me han dado.

A Maura, Mary, Clau, gracias por su amistad.

Fer, Beris y Mario, gracias por apoyarme a ir más allá y no quedarme en un mismo lugar.

Elena, Ana, Ivy, Isa a pesar de la distancia, nuestra amistad sigue ahí.

A mis hermanos y amigos: Josué, Claudia, Glancy y su familia, Dios les bendiga.

Omar, gracias por ser un gran amigo y apoyarme a cada momento.

Luis, gracias por ayudarme con mis dudas y por conseguirme una excelente casa donde vivir, mejor compañía no hubiera podido tener, eres un gran amigo.

Ale, muchas gracias por tu amistad y por tu apoyo. Te quiero niña.

Gracias a todos aquellos que estuvieron conmigo y que me apoyaron en esta aventura.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES.....	2
II.1	Óxido-reductasas	2
II.2	Óxido-reductasas fúngicas	3
II.3	Celobiosa deshidrogenasas fúngicas.....	4
II.4	Metabolismo de la celobiosa	5
II.5	Características de la CDH	6
II.6	Función biológica de la CDH.....	7
II.7	Características de los genes <i>cdh</i>	8
II.8	Caracterización bioquímica de la disacárido óxido-reductasa de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	11
	II.8.1 Biología de <i>C. lindemuthianum</i>	11
	II.8.2 El genoma de <i>C. lindemuthianum</i>	12
	II.8.3 Enzimas extracelulares de <i>C. lindemuthianum</i>	13
III.	JUSTIFICACIÓN.....	16
IV.	HIPÓTESIS.....	17
V.	OBJETIVO GENERAL.....	18
V.1	Objetivos particulares.....	18
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	19
VI.1	Material biológico	19
VI.2	Medios de cultivo.....	19
VI.3	Obtención de cultivos	20
VI.4	Aislamiento de ADN genómico.....	21
VI.5	Aislamiento de ARN total.....	22
VI.6	Alineamiento de secuencias homólogas	22
VI.7	Diseño de oligonucleótidos	23
VI.8	Obtención de un fragmento del gen <i>cdh</i>	23
VI.9	Purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa de bajo punto de fusión	24

VI.10	Ligación y transformación	25
VI.11	Obtención de ADN plasmídico (Minipreparaciones).....	25
VI.12	Obtención de ADN plasmídico en altas concentraciones (Midipreparaciones)	26
VI.13	Experimento tipo Southern	26
VI.14	Experimento tipo Northern	27
VII.	RESULTADOS	29
VII.1	Identificación del gen <i>cdh</i> de <i>C. lindemuthianum</i>	29
VII.1.1	Aislamiento de ácidos nucleicos de <i>C. lindemuthianum</i> y <i>N. crassa</i>	29
VII.1.2	Búsqueda de secuencias conservadas de los genes <i>cdh</i>	29
VII.1.3	Obtención de un fragmento del gen <i>cdh</i>	31
VII.1.4	Obtención de una sonda del gen <i>cdh</i>	33
VII.2	Identificación del número de copias del gen <i>cdh</i> de <i>C. lindemuthianum</i>	35
VII.3	Determinación de la expresión del gen <i>cdh</i> de <i>C. lindemuthianum</i> ...	36
VIII.	DISCUSIÓN.....	39
IX.	CONCLUSIÓN.....	46
X.	PERSPECTIVAS.....	47
XI.	REFERENCIAS.....	48

ÍNDICE DE CUADROS

1.	Óxido-reductasas y sus características catalíticas.....	2
2.	Genes <i>cdh</i> fúngicos aislados y caracterizados de diferentes organismos.....	8
3.	Clasificación filogenética de los genes <i>cdh</i> de diferentes organismos	9
4.	Genes aislados y caracterizados de <i>C. lindemuthianum</i>	13
5.	Enzimas extracelulares caracterizadas de <i>C. lindemuthianum</i> ...	14
6.	Secuencias de CDH consideradas para este estudio	30
7.	Similitud de las secuencias CDH	31
8.	Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la búsqueda del gen <i>cdh</i>	31
9.	Porcentaje de similitud de los fragmentos amplificados con oligonucleótidos para el gen <i>cdh</i>	33
10.	Similitud del fragmento <i>cdh</i> de <i>C. lindemuthianum</i> con secuencias nucleotídicas reportadas en el NCBI	34

ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Modelo de una reacción de óxido-reducción catalizada por una enzima	3
2.	Rutas de degradación de la celobiosa	5
3.	Ciclo de vida de <i>C. lindemuthianum</i>	12
4.	Análisis electroforético de ácidos nucleicos de <i>C. lindemuthianum</i> y <i>N. crassa</i>	29
5.	Secuencia amplificada del gen <i>cdh</i> de <i>C. lindemuthianum</i>	32
6.	Análisis electroforético de los fragmentos obtenidos por PCR con oligonucleótidos diseñados para el gen <i>cdh</i>	32
7.	Amplificación por RT-PCR de una sonda homóloga y heteróloga del gen <i>cdh I</i> de <i>C. lindemuthianum</i>	34
8.	Hibridación tipo Southern del gen <i>cdh</i> de <i>C. lindemuthianum</i>	35
9.	Análisis de expresión del gen <i>cdh</i> de <i>C. lindemuthianum</i>	37
10.	Análisis densitométrico de la expresión del gen <i>cdh</i> de <i>C. lindemuthianum</i> ...	38
11.	Análisis semicuantitativo de expresión del gen <i>cdh</i> de <i>C. lindemuthianum</i>	38

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ARN	Ácido ribonucleico
<i>cdh</i>	Gen <i>cdh</i>
CDH	Celobiosa deshidrogenasa
Da	Daltons
DCFIF	2,6-diclorofenolindofenol
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
FMN	Mononucleótido de flavina
Kb	Kilobases
Mpb	Mega pares de bases
MOPS	Ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
ORF	Marco de lectura abierto
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de polimerasa en transcripción reversa
TE	Tris-Ácido Clorhídrico-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

I. INTRODUCCIÓN

El uso de las enzimas en procesos catalíticos industriales económicamente viables y amigables con el medio ambiente se ha desarrollado en forma rigurosa y sistemática, en congruencia con el rápido avance y expansión de la biotecnología moderna. Son las hidrolasas las enzimas de mayor uso comercial, mientras que el uso de las óxido-reductasas va en aumento. En el grupo de las óxido-reductasas se encuentra la celobiosa deshidrogenasa (CDH) que tiene potencial aplicación biotecnológica y por ello, hace interesante la búsqueda de organismos productores de esta enzima y la investigación de las características fisicoquímicas para su estabilidad y la producción de la enzima. Para ello, se requiere conocer los aspectos básicos de la bioquímica de esta enzima y la biología del organismo productor.

Entre las aplicaciones de la CDH se encuentran, su uso como agente aclarador en la industria textil (Ciullini y col., 2008), clarificación de jugos (Henriksson y col., 1995), biosensor de compuestos fenólicos y de celobiosa y lactosa (Elmgren y col., 1992; Lindgren y col., 1999) y para su uso en la bio-remediación en el tratamiento de residuos de compuestos fenólicos (Henriksson y col., 1995). Si bien su función en los organismos tales como los ascomicetos que la poseen aún no se conoce con certeza, se sabe que en basidiomicetos está implicada en el metabolismo de la celobiosa, disacárido producto de la hidrólisis de la celulosa. Estos son aspectos básicos interesantes en el estudio de los genes *cdh* provenientes de los ascomicetos.

Recientemente en el grupo de trabajo se realizó la caracterización bioquímica de una actividad enzimática tipo CDH en un extracto crudo obtenido de *C. lindemuthianum*, un hongo fitopatógeno del frijol con un ciclo de vida complejo, cuyo genoma no ha sido secuenciado, que presenta una gran plasticidad morfológica y virulenta, así como variabilidad genética, del cual no se han encontrado reportes que indiquen que el gen *cdh* haya sido identificado y que presenta una gran actividad enzimática extracelular.

A continuación se plantea la importancia biotecnológica y biológica de las enzimas óxido-reductasas, el conocimiento actual de las CDH fúngicas y su relación con el modelo biológico de estudio. Conocimiento que servirá de apoyo a los resultados encontrados y su explicación posible para el planteamiento de esta tesis.

II. ANTECEDENTES

II.1 Óxido-reductasas

Las óxido-reductasas catalizan la transferencia de electrones de un sustrato a otro, donde el sustrato oxidado es conocido como el donador de electrones contrario al sustrato reducido, que es el aceptor de electrones. Para lograr su función fisiológica, las óxido-reductasas emplean varios centros activos redox, entre los más comunes incluyen residuos de aminoácidos como tirosina o cisteína, iones metálicos como cobre, hierro y molibdeno, centros hierro-azufre o grupos *hemo*, y coenzimas como FMN y FAD. Esta clase de enzimas están ampliamente distribuidas entre los microorganismos, plantas y animales (Xu, 2005). En el Cuadro 1 se muestran diferentes tipos de óxido-reductasas y sus características catalíticas (Xu, 2005).

Cuadro 1. Óxido-reductasas y sus características catalíticas (Xu, 2005).

Óxido-reductasas	Características catalíticas
Oxidasas	Oxidasas libres de Cofactor, Tiol oxidasas, Oxidasa que contienen Cobre o Flavinas, oxidasas con centros Redox múltiples.
Peroxidasas	Heme peroxidasas, Catalasa, Haloperoxidasas, otras peroxidasas.
Oxigenasas/Hidroxilasas	Oxigenasas libres de Cofactores, oxigenasas que contienen s, Fe-, Cobre o Flavinas, oxigenasas con centros múltiples.
Deshidrogenasas/reductasas	Que contienen Flavinas, Quinonas, o Zn, que contienen múltiples centros redox, Aldo-Ceto Reductasas, reductasas que contienen Cu o flavinas.

En la Figura 1 se muestra el modelo de una reacción de óxido-reducción catalizada por una enzima, que en este caso requiere de una coenzima, con sustrato en su estado reducido y el agente externo que se encuentra oxidado, se tiene a la enzima que para este caso requiere de una coenzima, así como de un agente oxidante externo. Una vez que se da la interacción enzima-coenzima-sustrato, se lleva a cabo el transporte de electrones del sustrato a la coenzima y finalmente al agente oxidante, de tal forma que al terminar la catálisis el sustrato queda oxidado y el agente externo queda reducido.

Las óxido-reductasas han sido extensamente estudiadas por su potencial aplicación biotecnológica. Entre estas se van a encontrar enzimas que contienen ión metálico, tales como lacasas, tirosinasas y tres tipos de hemo enzimas tales como: peroxidasas,

hemoglobina y la celobiosa deshidrogenasa, que han sido poco a poco estudiadas y se ha ido elucidando su papel fisiológico (Demarche y col., 2011).

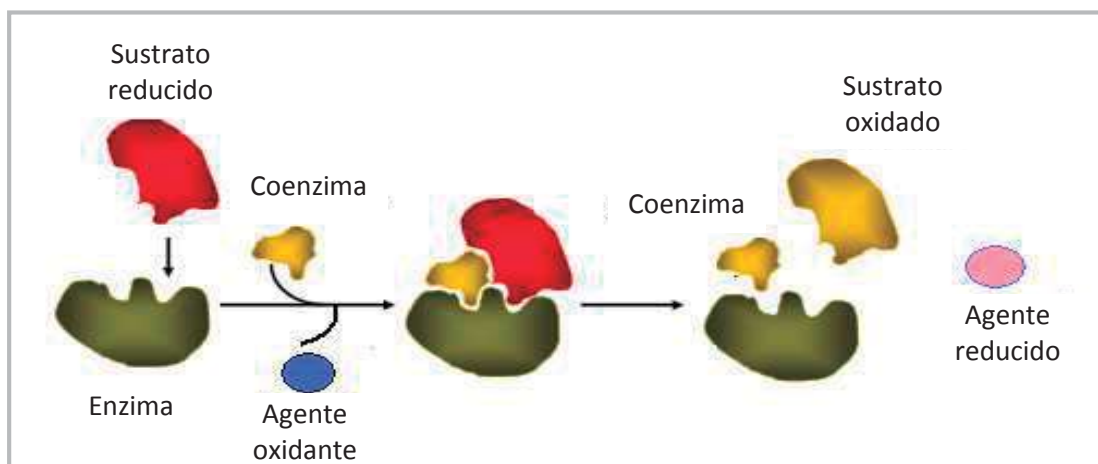


Figura 1. Modelo de una reacción de óxido-reducción catalizada por una enzima.

II.2 Óxido-reductasas fúngicas

Los hongos usualmente contienen una amplia variedad de carbohidrato oxidasas extracelulares, en las que se incluyen por ejemplo: a la glucosa oxidasa, glioxal oxidasa y la galactosa oxidasa. Las glioxal oxidasas fúngicas extracelulares ha sido descritas únicamente en el basidiomiceto de la pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* (Kersten y Kirk, 1987). Las glioxal oxidasas son un componente esencial en la vía de degradación de la lignina y proveen de H_2O_2 extracelular como co-sustrato para las lignin peroxidasas y peroxidasas dependiente de Mn (Janse y col., 1998). Tanto el glioxal como el metilglioxal, ambos sustratos de esta enzima son encontrados en el ambiente extracelular donde crece este hongo. La galactosa oxidasa cataliza la oxidación de D-galactosa y alcoholes primarios vía oxígeno molecular al correspondiente aldehído y H_2O_2 (Berkessel y col., 2005). Es una enzima monomérica de 68 kDa que contiene Cobre y un cofactor derivado de aminoácidos (Leuthner y col., 2005). También se encuentra la glucosa oxidasa, una glicoproteína que cataliza la oxidación de la β -D-glucosa por el oxígeno molecular hasta δ -gluconolactona un compuesto que espontáneamente se hidroliza hasta ácido glucónico y H_2O_2 (Bentley, 1963). La función específica de estas carbohidrato oxidasas extracelulares en el metabolismo y en el desarrollo del hongo no ha sido determinada con precisión, pero todas ellas contribuyen a la producción de H_2O_2 , un metabolito que tal vez sea útil tanto en la degradación de polímeros como en la fitopatogénesis. Mas sin embargo, la utilidad biotecnológica de ellas ha quedado de

manifiesto con la importancia de la glucosa oxidasa, hoy en día, una enzima utilizada en diversas aplicaciones (Schou y col., 1994; Xu y col., 1999; Henriksson y col., 2000).

Estableciendo una utilidad práctica en procesos biotecnológicos y la importancia de conocer las propiedades fisicoquímicas enzimáticas, es necesario estudiar las condiciones de obtención masiva de enzimas, los genes y su regulación. Son particularmente atractivas las óxido reductasas que presenten las siguientes tres propiedades: 1) que para su función usen dos grupos prostéticos redox activos: uno *hemo* y otro Flavino. 2) que usen como sus donadores de electrones a los carbohidratos y piridín nucleótidos (NADPH o NADH). 3) que sean extracelulares y solubles. Esto ayudaría a entender la interacción fundamental entre el grupo flavino y el grupo *hemo* en una proteína matriz, así como también al desarrollo de nuevos agentes biológicos para incluirlos en varias aplicaciones industriales o para aplicaciones médicas las cuales no necesiten NADPH como donador de electrones.

II.3 Celobiosa deshidrogenasas fúngicas

La celobiosa deshidrogenasa (CDH) es producida por un gran número de hongos fitopatógenos y saprófitos (ascomicetos y basidiomicetos), con metabolismo heterótrofo que adquieren sus nutrimentos mediante absorción, los cuales secretan enzimas extracelulares que descomponen moléculas complejas a compuestos simples que pueden absorber y utilizar (Zámocký y col., 2006).

La CDH fue primeramente aislada y caracterizada de los basidiomicetos *P. chrysosporium* y *T. versicolor* y fue identificada como una óxido-reductasa (Westermarck y col., 1974; Roy y col., 1996). Posteriormente en el basidiomiceto *Pycnoporus cinnabarinus* (Temp y Eggert, 1999) se encontró una actividad CDH, al igual que en *Coniophora puteana*, el cual mostró una CDH aparentemente relacionada con una reacción tipo Fenton (Hyde y col., 1997). En el basidiomiceto *Grifola frondosa*, se sugirió que la CDH está sujeta a una represión catabólica (Yoshida y col., 2002). En *Sclerotium rolfsii* reportes indican que es un organismo sobreproductor de CDH, de 10 a 50 veces más que en *P. chrysosporium* cuando al medio de cultivo se le adiciona celulosa (Baminger y col., 2001).

En cuanto a la producción de CDH por ascomicetos, poco es lo que se conoce. Fue primeramente detectada en especies de *Monilia* (Dekker, 1980), posteriormente, Schou y col. (1998) reportaron la CDH de *Humicola insolens*, donde se sugirió estaba implicada en una reacción tipo Fenton bajo condiciones alcalinas. Posteriormente, se estudió en

Sporotrichum thermophile, donde se reportó como una enzima termoestable con una temperatura óptima de 60°C (Subramanian y col., 1998). En *Neurospora crassa* se ha reportado la actividad CDH (Zhang y col., 2011), al igual que en *Chaetomium atrobrunneum*, *Corynascus thermophilus*, *Dichomera saubinetii*, *Hypoxylon haematostroma* y *Stachybotrys bisbyi* (Harreither y col., 2011).

Cabe señalar que no únicamente en hongos se ha reportado actividad CDH, sino también en las bacterias celulolíticas *Cytophaga* sp. LX-7 (Li y col., 1996) y *Fibrobacter succinogenes* S85 (Nouaille y col., 2009). Sin embargo, la presencia de la actividad CDH permanece como “cuestionable” en estos organismos (Henriksson y col., 2000).

II.4 Metabolismo de la celobiosa

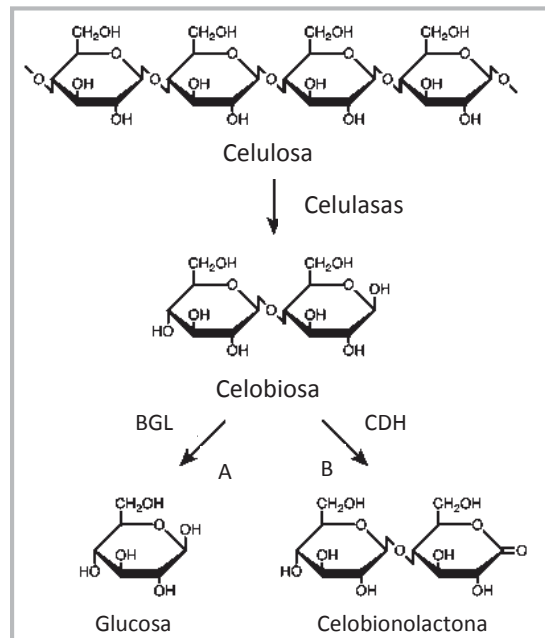


Figura 2. Rutas de degradación de la celobiosa. (A) Una hidrólisis catalizada por una β -glucosidasa para obtener dos moléculas de glucosa. (B) Oxidación catalizada por la CDH para obtener celobionolactona.

La celobiosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$; β -glucopiranosil (1-4) β -glucopiranososa) es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa unidas por los grupos hidroxilo del carbono uno en posición beta de una de las moléculas y del carbono 4 de la otra. Al producirse dicha unión se desprende una molécula de agua y ambas moléculas quedan unidas mediante un oxígeno monocarbonílico que actúa como puente. La celobiosa se puede obtener por hidrólisis química o enzimática de la celulosa.

Éste disacárido puede ser metabolizado mediante dos vías; una, hidrolítica catalizada por la β -glucosidasa [β -D-glucósido-O-glucohidrolasas, E.C. 3.2.1.21] para obtener dos moléculas de glucosa. Otra, oxidativa catalizada por la Celobiosa deshidrogenasa [Celobiosa: (aceptor) 1-óxido-reductasa, E.C. 1.1.99.18], la cual convierte a la celobiosa en celobionolactona, Figura 2 (Yoshida y col., 2004).

II.5 Características de la CDH

La CDH es una proteína monomérica que consiste de dos dominios, uno que contiene un grupo *hemo* b hexacoordinado (Cox y col., 1992) y un dominio que contiene un dinucleótido de adenina y flavino que está unido no covalentemente (FAD) (Bao y col., 1993; Roy y col., 1994) o un 6-hidroxi FAD (Igarashi y col., 1999). Ambos dominios están conectados por una región de aproximadamente 50 aminoácidos sensible a proteasas la cual es rica en hidroxiaminoácidos, principalmente serina y treonina (Raices y col. 1995; Henriksson y col., 2000).

El rompimiento proteolítico de la CDH rinde un fragmento con el grupo *hemo* que queda inactivo y un fragmento con el grupo FAD activo. Este último contiene el sitio catalítico y reduce a la celobiosa eficientemente (Ludwig y Haltrich, 2003).

La CDH es una hemoflavoenzima extracelular producida por un número de hongos degradadores de lignocelulosa. Oxida el extremo reductor de la celobiosa y algunos celooligosacáridos a sus correspondientes 1,5-lactonas, las cuales son subsecuentemente hidrolizadas al correspondiente ácido carboxílico. Además de los celooligosacáridos, la CDH tiene la capacidad de oxidar otros azúcares, siendo los mejores sustratos aquellos que se encuentran unidos por enlaces β -1,4 con glucosa con extremo reductor (Henriksson y col., 2000).

Hasta la fecha se desconoce cuál es el aceptor de electrones natural de la enzima, pero se conoce que la enzima reducida puede ser eficientemente re-oxidada por diferentes aceptores de electrones tales como varias benzoquinonas sustituidas, radicales fenoxilo, citocromo c y algunos iones metálicos como Fe^{+3} o Cu^{+2} , mientras que el oxígeno es un débil aceptor de electrones (Morpeth, 1991; Kremer y Wood, 1992; Renganathan y Bao 1994; Roy y col., 1994; Henriksson y col., 2000; Cameron y Aust 2001; Ludwig y Haltrich, 2003).

La longitud de la cadena de la enzima está en el intervalo de los 749 y los 840 aminoácidos, siendo la masa molecular determinada entre los 79 600 y los 114 000 Da

(Raices y col., 1995; Li y col., 1996). El dominio flavino es de aproximadamente 60 kDa y el dominio *hemo* de 30 kDa, mientras que los 10 kDa restantes pertenecen a una glicosilación principalmente de monómeros de manosa (Henriksson, 1995). El dominio *hemo* presenta un grado mayor de glicosilación con respecto al dominio flavino (Cohen y col., 1997). La CDH es una enzima muy estable con respecto al pH y a la temperatura. La enzima es más estable en el intervalo de pH de 3 a 5, menos estable entre 5 y 8 y completamente inestable a pH de 8 a 10, mientras que a pH de 2 la enzima es casi completamente inactivada en dos horas debido a la liberación de la coenzima FAD (Bao y col., 1993; Henriksson, 1995; Subramaniam y col., 1998).

La CDH de *P. chrysosporium* es una enzima inducible cuando el hongo crece con celulosa como fuente de carbono (Bao y col., 1994). Para el caso de la CDH de *T. versicolor* y *Sporothrychum thermophile* la celobiosa resulta ser inductor en la producción de la enzima (Roy y col., 1996; Subramaniam y col., 1998). Estudios preliminares demostraron que la CDH tiene un dominio de unión a la celulosa al igual que otras Celulasas, lo que mejora la unión y facilita la actividad catalítica de la enzima con sus sustratos (Henriksson y col., 1991; Kremer y Wood, 1992; Linder y Teeri, 1997).

II.6 Función biológica de la CDH

La función de la CDH no se conoce con certeza, sin embargo, por estudios que se han realizado principalmente en *P. chrysosporium*, se sugiere pudiera estar implicada en diversos mecanismos que a continuación se citan.

Se sugiere que para el basidiomiceto *P. chrysosporium* la CDH es importante para la degradación de celulosa y que presenta una función concertada con las celulasas, previniendo la recondensación de las cadenas de celulosa por las endoglucanasas (Eriksson y col., 1993; Ander, 1994; Henriksson y col., 1995). La CDH también contribuye a la degradación de lignina, ya que puede reducir tanto a quinonas relacionadas con la lignina como a radicales fenoxilo, los cuales son producidos por la ligninasa (Samejima y Eriksson, 1992). La CDH puede tener una función de protección una vez que reduce quinonas, uno de los principales sistemas antimicrobianos usados por las plantas (Morpeth, 1991) o bien por la generación de peróxido de hidrógeno o anión superóxido, sin embargo, esto también dañaría al organismo productor, por lo que se considera poco probable (Wilson y col., 1990; Nutt y col., 1997). Kremer y Wood (1992) sugirieron que la CDH puede ser una Fe^{+3} reductasa, la cual puede reducir Fe^{+3} a Fe^{+2} , este ión ferroso en

presencia de peróxido de hidrógeno forma radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton, dicho radical hidroxilo es un potente despolimerizador de celulosa. Se sugiere que la CDH pudiera transferir electrones al citocromo, a través de lo cual el hongo obtendría energía de forma rápida a través de la fosforilación oxidativa (Coudray y col., 1982; Dekker, 1988).

II.7 Características de los genes *cdh*

Si bien la CDH más estudiada es la secretada por el hongo *P. chrysosporium*, no ha sido la única, pero si la primera cuyo gen fue caracterizado, secuenciado y su proteína secuenciada y cristalizada (Raíces y col., 1995). En el Cuadro 2 se presentan las CDH cuyos genes han sido aislados, secuenciados y caracterizados, así como el número de nucleótidos que presentaron dichas secuencias y el número de aminoácidos. El cuadro no incluye a las CDH hipotéticas descritas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Cuadro 2. Genes *cdh* fúngicos aislados y caracterizados de diferentes organismos.

División	Organismo	No. de residuos de aminoácidos	No. de bases	No. de acceso
Ascomycetos	<i>Myceliophthora thermophila</i>	828	2487	AAC26221
	<i>Humicola insolens</i>	785	2358	AAF69005
	<i>Neurospora crassa</i>	829	2490	NCU00206
Basidiomicetos	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	773	2322	AAB92262
	<i>Trametes versicolor</i>	768	2307	AAC50004
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	769	2310	AAC32197
	<i>Grifola frondosa</i>	768	2307	BAC20641
	<i>Myriococcum thermophilum</i>	828	2487	ABS45566
	<i>Coniophora puteana</i>	774	2325	BAD32781

Zámoký y col. (2006), mencionan que a la fecha, el gen *cdh* ha sido identificado en 21 organismos, algunos de los cuales aún no han sido caracterizados, sino que están como secuencias hipotéticas. La longitud promedio es de 2480 pb, desde el extremo amino terminal, las secuencias codificantes para el péptido señal, el dominio citocromo y el dominio flavodeshidrogenasa. Algunos ADNc descritos, principalmente de ascomycetos contienen una región adicional después de la región del dominio citocromo, la cual codifica para un pequeño motivo de unión a celulosa, clasificado como un módulo de unión a carbohidratos del tipo I.

Los genes *cdh* descritos, han sido agrupados filogenéticamente en tres clases: en la clase I se encuentran todos los genes *cdh* de basidiomicetos; la clase II abarca genes *cdh* caracterizados y parte de los hipotéticos de ascomicetos y la clase III agrupa los genes *cdh* hipotéticos de ascomicetos restantes, ver el Cuadro 3 (Zámoký y col., 2008).

Cuadro 3. Clasificación filogenética de los genes *cdh* de diferentes organismos.

División	Organismo	No. de residuos de aminoácidos	No. de acceso
Clase I: Basidiomicetos	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	773	AAB92262
	<i>Trametes versicolor</i>	768	AAC50004
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	769	AAC32197
	<i>Grifola frondosa</i>	768	BAC20641
	<i>Athelia rolfsii</i>	771	AAO64483
	<i>Coniophora puteana</i>	774	BAD32781
	<i>Irpex lacteus</i>	777	BAD36748
Clase II: Ascomicetos	<i>Neurospora crassa</i> 1	829	NCU00206
	<i>Aspergillus nidulans</i>	780	CBF78806
	<i>Neurospora crassa</i> 2	828	NUC05923
	<i>Aspergillus fumigatus</i> 1	820	EDP55266
	<i>Myriococcum thermophilum</i>	828	ABS45566
	<i>Magnaporthe grisea</i>	840	EHA58327
	<i>Thielavia heterothallica</i>	807	AAC26221
Clase III: Ascomicetos	<i>Humicola insolens</i>	785	AAF69005
	<i>Aspergillus oryzae</i>	789	001822302
	<i>Aspergillus fumigatus</i> 2	820	EAL94059

En las secuencias de los genes *cdh* el contenido de GC es predominante (un promedio de 57%) que correlaciona con lo esperado para el respectivo organismo. De manera interesante, la mayoría de los genomas de hongos analizados, presentan múltiples marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican para la CDH. Li y col. (1997), identificaron dos variantes alélicas del gen *cdh* en *P. chrysosporium* los cuales presentaban un 98% de identidad, mientras que en *N. crassa* hay dos secuencias que codifican para la CDH que sólo comparten un 57% de similitud, lo que hace que estos genes aparezcan como filogenéticamente diferentes. Otras especies fúngicas tanto de ascomicetos como de basidiomicetos, poseen genes *cdh* con una historia evolutiva diferente (Zámoký y col., 2004).

Para la mayoría de las especies investigadas, el análisis del ADN genómico reveló la presencia de intrones en la secuencia codificante. En el caso de las dos variantes alélicas

de *P. chrysosporium* se reporta la presencia de 14 exones y 13 intrones que se encontraron en la misma posición (Li y col., 1996). Los exones del 2 al 5 se encuentran en el dominio citocromo, el quinto abarca la región que codifica para el péptido de unión. Los exones 6 al 14 codifican para el dominio flavin deshidrogenasa. El ADN genómico con el ORF para la CDH de *T. versicolor* está interrumpido por 14 intrones. El promedio de la longitud del intrón es de 56 nucleótidos. Acerca de la región codificante de la CDH de *Pycnoporus cinnabarinus* se reporta que presenta 16 exones interrumpidos por 15 intrones con un promedio de 52 nucleótidos (Moukha y col., 1999).

En cuanto a la distribución de los intrones en los genes que codifican para la CDH en ascomicetos no están bien documentados, pero a partir del análisis del genoma, es claro que algunos de los ORFs también están interrumpidos por algunos intrones, que son comparables en longitud con los de las CDH de los basidiomicetos. En el caso de *N. crassa* se sabe que uno de sus genes *cdh* está interrumpido por 3 intrones, sin indicar su posición en el gen (Zhang y col., 2011).

En *M. thermophila* (ascomiceto) el gen *cdh* presenta secuencias de nucleótidos que codifican para tres dominios: el dominio *hemo* en el N-terminal, un dominio flavino intermedio y en el extremo C-terminal, un motivo de unión a celulosa, el cual muestra una similitud con dominios de unión a celulosa de una celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* (Subramaniam y col., 1998) algo totalmente nuevo ya que las CDH reportadas (todas de basidiomicetos) con anterioridad no presentan este último dominio independiente, sino que se encuentra formando parte del dominio flavino.

Acerca de la expresión del gen *cdh*, en *P. chrysosporium* (Li y col., 1996; Habu y col., 1997) se reporta que es inducido posiblemente por celulosa o alguno de sus productos de degradación. En *T. versicolor* (Roy y col., 1996; Dumonceaux y col., 1998) se observó que la expresión del gen *cdh* es estimulada bajo condiciones celulolíticas y es controlada a nivel transcripcional, ya que el transcrito fue detectado al mismo tiempo que la proteína activa apareció en el sobrenadante. En el caso de *P. cinnabarinus* crecido en un medio cuya única fuente de carbono es la celulosa, se observó la presencia del transcrito desde el primer día de incubación, llegando a un máximo en el día seis. También se analizó la expresión del gen *cdh* en cultivos que contenían celulosa, glucosa o celobiosa, sin embargo, la expresión fue mayor en condiciones celulolíticas.

II.8 Caracterización bioquímica de la disacárido óxido-reductasa de *Colletotrichum lindemuthianum* AFG2

Para explicar la caracterización bioquímica de la disacárido deshidrogenasa (DDH) de *C. lindemuthianum* primeramente se describe el modelo biológico usado, así mismo se mencionan generalidades acerca de sus genes y enzimas que le han sido parcial o totalmente caracterizados.

II.8.1 Biología de *C. lindemuthianum*

C. lindemuthianum es el agente causal de la antracnosis del frijol que ha ocasionado pérdidas económicas en las regiones donde se cultiva. Adicionalmente ha resultado un modelo biológico para el estudio de la diferenciación celular relacionada al proceso de fitopatogénesis (O'Connell y col., 1996). Asimismo, ha resultado ser un buen productor de enzimas extracelulares (Martínez Pacheco y col., 2009). *C. lindemuthianum* es un hongo ascomiceto, posee un ciclo de vida complejo, con dos fases de desarrollo. En cada una de ellas, presenta estadios diferenciados únicos que le permiten sobrevivir. Independientemente de la fase de desarrollo, la germinación de las esporas ocurre de forma similar.

En su forma imperfecta *C. lindemuthianum* se reproduce asexualmente, forma acérvulos que contienen a las conidias o esporas, las que a su vez están embebidas en un mucílago. La espora al germinar puede presentar dos estilos de vida, uno, como saprofito, en el cual está capacitado para crecer prácticamente en cualquier fuente de carbono, incluyendo celulosa cristalina, ya que secreta enzimas líticas de polisacáridos que utiliza para obtener fuentes de carbono. El otro estilo es como biótrofo, en la que está capacitado para obtener nutrimentos de la planta viva. Por este comportamiento bifásico se le clasifica como un organismo hemibiótrofo (Martínez Pacheco y col., 2009). En la Figura 3 se esquematizan ambas formas de vida.

Durante su fase saprofítica la germinación de las esporas comienza cuando el periodo de latencia ha terminado, posterior a la germinación comienza el crecimiento vegetativo, lo que le permite aumentar el área de contacto con el sustrato y adquirir su alimento, esto va seguido de la formación de estructuras fructíferas para que finalmente se presente la esporogénesis, cerrando el ciclo e iniciando otro del mismo tipo. Como biótrofo, la germinación de las esporas comienza cuando las condiciones ambientales son favorables (específicamente el contenido de agua), la germinación comienza con la

adhesión de la espора a la superficie vegetal, donde debido a la absorción de agua y al crecimiento activo se produce un aumento de tamaño que le permite generar un tubo germinativo que se diferenciará al apresorio donde surgirá un “clavo” que le ayuda a atravesar la barrera de la pared vegetal, este proceso está seguido por la formación de la hifa primaria, la cual le permite obtener su alimento a partir del contenido celular, terminando el ciclo con el crecimiento vegetativo. En ambas fases, el hongo requiere de un conjunto de enzimas líticas extracelulares para la obtención de nutrientes (Martínez Pacheco y col., 2009).

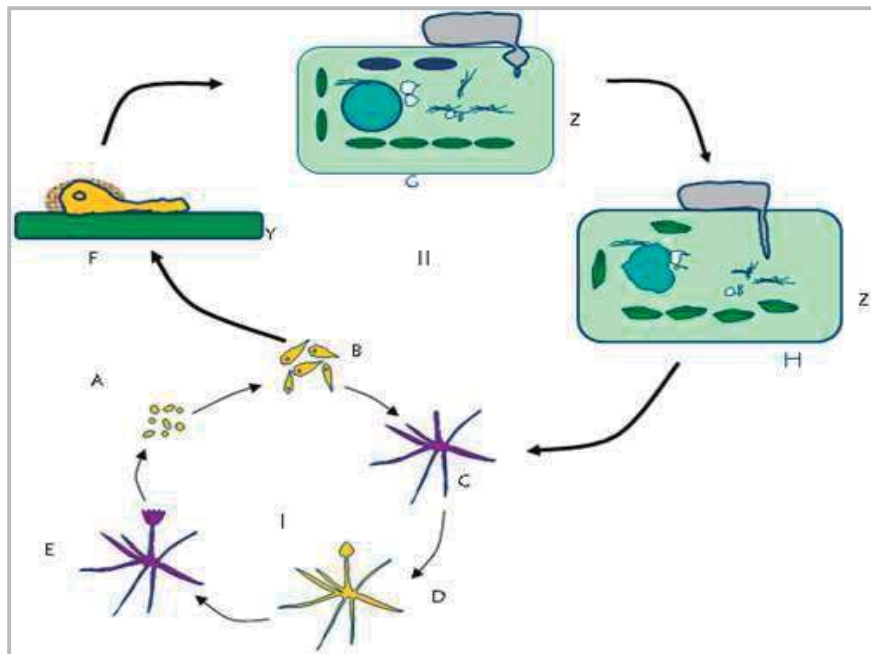


Figura 3. Ciclo de vida de *C. lindemuthianum*. I. Fase saprofitica. II. Fase biotrófica, A) Esporas; B) Germinación de las esporas; C) Crecimiento vegetativo; D) Estructuras fructíferas; E) Esporogénesis; F) Adhesión; G) Penetración; H) Hifa primaria; Y) Superficie del frijol; Z) Célula del frijol (Flores García, 2004; Martínez Pacheco y col., 2009).

II.8.2 El genoma de *C. lindemuthianum*

Es poco lo que se conoce acerca de la organización del material genético de *C. lindemuthianum*. Al respecto, O’Sullivan y col. (1998) realizaron un estudio citométrico de flujo con varios aislados para medir el tamaño del genoma. El estudio reveló que las distintas cepas presentaron una variación hasta del 40% en el tamaño del genoma; mediante un análisis tipo Southern del perfil de los telómeros fúngicos clonados, se encontró que el número de cromosomas varía entre 9 y 12, con dos clases de tamaño: unos pequeños de 2.5 Mpb y otros grandes de 7 Mpb o incluso de mayor tamaño.

Además, en el genoma del hongo se encontraron dos tipos de elementos repetidos agrupados y en cromosomas polimórficos diferentes, con una sola copia de una secuencia flanqueadora, que se utilizaron como marcadores de los cromosomas pequeños. Sin embargo, estos marcadores no se detectaron en algunas cepas. Esta evidencia indica que parte de la variación observada en la organización del genoma de *C. lindemuthianum*, puede ser debida a regiones que son dispensables en el ciclo vegetativo del hongo.

La mayoría de los genes que se tienen reportados hasta la fecha, corresponden a genes implicados en la patogenicidad del hongo hacia su principal hospedero *Phaseolus vulgaris*, no encontrándose hasta la fecha la descripción de algún gen que codifique para una CDH. En la Cuadro 4 se presentan los genes descritos de *C. lindemuthianum*.

Cuadro 4. Genes aislados y caracterizados de *C. lindemuthianum*.

Gen	Función	pb	No. intrones	Referencia
<i>mat1-2-1</i>	MAT1-2-1	870	3	García-Serrano y col., 2008
Gen tipo <i>ste12</i>	Formación de apresorios	2452	3	Wong Sak Hoi y col., 2007
<i>cda</i>	Quitina-desacetilasa	-	-	Shrestha y col., 2004
<i>clnr1</i>	Regulador de nitrógeno	3263	2	Pellier y col., 2003
<i>endoPG</i>	Pectinasa	-	-	Corentin y col., 2002
<i>clap1</i>	ATPasa transportadora de Cu	1674	1	Paritson y col., 2002
<i>clpt4</i>	Rab/GTPasa	2526	5	Dumas y col., 2001
<i>clta1</i>	Relacionado a patogenicidad	-	-	Dufresne y col., 2000
<i>clk1</i>	Ser-Tre proteína cinasa	2285	3	Dufresne y col., 1998
<i>CIH1</i>	Glicoproteína rica en prolina	-	-	Perfect y col., 1998
<i>clpg2</i>	Endopoligalacturonasa	1098	1	Centis y col., 1997
<i>clpg1</i>	Endopoligalacturonasa	1600	NR	Centis y col., 1996
<i>gpdA</i>	G3PD	1014	1	Templeton y col., 1992

II.8.3 Enzimas extracelulares de *C. lindemuthianum*

Del hongo *C. lindemuthianum* se han descrito diversas enzimas extracelulares, ver Cuadro 5, todas ellas involucradas en la degradación de algunos componentes de la pared celular vegetal.

Calderón y col. (2011) realizaron la caracterización parcial de una actividad enzimática tipo Disacárido Deshidrogenasa en el hongo *C. lindemuthianum*. Cuando se analizó la actividad de ésta disacárido deshidrogenasa, se observó que podía usar a la celobiosa como tal, por lo que se consideró una CDH.

Cuadro 5. Enzimas extracelulares caracterizadas de *C. lindemuthianum*.

Enzimas	Función	Referencia
Celobiosa deshidrogenasa	Degradación de celobiosa	Calderón Oropeza y col., 2011
β-glucosidasa, Endo y Exo celulasas	Degradación de celulosa	Flores García, 2004 Martínez Pacheco y col., 2009
Poligalacturonasas; Pectin y Pectato liasas	Hidrólisis de α -D-galacturonosil-(1,4)-O- α -D-galacturonato, rhamnogalacturonanas, arabinanas, galactanas	Anderson, 1978; Wijesundera y col., 1989; Keon, 1990; Wattard y col., 1997
Quitina desacetilasa	Degradación de quitina	Tsigos y Bouriotis, 1995
Cutinasa	Degradación de alcoholes primarios, ácidos y sus ésteres, alcoholes secundarios, cetonas, parafinas	Dickman y Patil, 1986; Sthal y Shafer, 1992
Lacasa	Oxidación de lignanos, alcoholes cinnamílicos	Anderson y Nicholson, 1996

Sin embargo, mostró afinidad por otros sustratos, como lactosa y sacarosa. Se determinó que la concentración óptima de celulosa con la que se obtiene mayor producción de CDH se encuentra en el intervalo de los 31-54 g/L. Se consideró la adición de dextrosa para acelerar el crecimiento y producción de enzimas de *C. lindemuthianum* ya que se determinó que con celulosa como única fuente de carbono, el hongo produce la mayor cantidad de sus celulasas hasta después del día 16 de incubación (Flores García, 2004). Los resultados indicaron que la celulosa no es un inductor en la producción de CDH ya que los parámetros cinéticos obtenidos con dextrosa a las dos concentraciones probadas fueron mejores a los obtenidos con la mezcla de celulosa y dextrosa a las dos concentraciones evaluadas.

Por lo anterior, se seleccionó la condición de fermentación con dextrosa al 5%, ya que fue la que generó mayor rendimiento de CDH y la adición de nitrato de potasio como fuente de nitrógeno, aumenta la producción de CDH en 1.6 veces en estas condiciones, el rendimiento obtenido fue de 48.5 U/L.

Para comprobar que dicha actividad era debida a la presencia de la CDH, se analizó su comportamiento frente a diferentes compuestos, tales como sulfato de zinc, nitrato de plata, ácido lactobiónico y lactona de ácido D-glucurónico, los que generaron una inhibición de la actividad, con valores entre el 30% hasta más del 80%, comparada con la actividad observada sin presencia de inhibidor. El pH y la temperatura óptima fueron de 5.5 y de 55 a 60 °C respectivamente. La CDH presentó su máxima afinidad por el Dicloro

fenol-indofenol (DCFIF) como sustrato reducido. Se determinó la masa molecular aparente de la CDH en condiciones nativas, el cual fue de aproximadamente 79 kDa. Las constantes cinéticas aparentes de la enzima son $V_{m\acute{a}x}$ 0.1468 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ proteína, K_m de 3.68 μM y una E_a de 15, 671.89 J/mol.

El trabajo realizado, permitió detectar a una disacárido deshidrogenasa de *C. lindemuthianum*, cuyas características bioquímicas obtenidas sugieren fuertemente que se trata de una CDH, esto de acuerdo a la similitud que guarda la enzima de este hongo con respecto a las reportadas hasta la fecha.

Además resulta interesante su estudio, ya que presenta ventajas tanto de estabilidad como de producción en el área de la biotecnología. En cuanto a la estabilidad, presenta un intervalo de temperatura óptima dentro del rango e incluso mayor a las ya reportadas, donde a una temperatura de 55°C la enzima ya es inactiva, como la CDH de *Chaetomium* sp. (Karapetyana y col., 2006); es inducida en presencia de glucosa y otros oligosacáridos, ventaja que a nivel industrial se traduce en un ahorro económico, para mantener la eficiencia del sistema.

Se reportó una actividad tipo CDH de *C. lindemuthianum*, que mostró un amplio espectro de sustratos y en el entendido de que si en el genoma de *C. lindemuthianum* se encuentra el gen *cdh* y se expresa e incluso lo haga con el mismo comportamiento que la actividad observada, esto sería indicio de que es una correlación, es decir, hay un gen *cdh*, se expresa, da lugar a una CDH y por tanto, hay actividad de CDH. Por lo anterior, en este trabajo se planteó la pregunta de identificar al gen *cdh*, así como la determinación de su expresión.

III. JUSTIFICACIÓN

La CDH tiene diversas aplicaciones biotecnológicas y está implicada en el metabolismo de la celobiosa. La CDH ha sido caracterizada para algunos basidiomicetos, pero no de igual manera en ascomicetos. En estos últimos la diversidad de las CDH, es mayor. En *C. lindemuthianum* se ha descrito la actividad enzimática tipo CDH, que mostró un amplio espectro de sustratos. Por lo que es importante establecer la correlación con la presencia del gen *cdh* en el genoma del hongo.

IV. HIPÓTESIS

La actividad enzimática tipo CDH reportada en *C. lindemuthianum* se correlaciona con la presencia del gen *cdh* en este organismo

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia y expresión del gen *cdh* en *C. lindemuthianum*.

V.1 Objetivos particulares

- Identificar el gen *cdh* en *C. lindemuthianum*.
- Determinar la expresión del gen *cdh* de *C. lindemuthianum*.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1 Material biológico

El aislado silvestre AFG2 de *C. lindemuthianum* proviene de campos de labranza sembrados con *Phaseolus vulgaris* var. flor de mayo del Estado de Zacatecas, durante los años de 1995 a 2001 y forma parte del cepario del laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH.

Aislado silvestre de *Neurospora crassa* aislado 74A, el cual fue donado por la D. C. Patricia Ponce Noyola, Profesora investigadora de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato.

Cepa de *Escherichia coli* TOP10: F⁻ *mcrA*Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80/*lacZ*Δ*M15*Δ/*lacX74**recA1**araD139*Δ(*ara-leu*)7697 *galJ* *gaK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*.

VI.2 Medios de cultivo

Agar papa dextrosa (PDA). Se utilizaron 39 g del medio agar papa dextrosa (Bioxon) y se disolvieron en 1 L de agua destilada, se sometió a ebullición durante un minuto y finalmente se esterilizó.

Caldo papa dextrosa (PDB). Se utilizaron 24 g del medio caldo papa dextrosa (Bioxon) y se disolvieron en 1 L de agua desionizada y se esterilizó.

Medio Luria Bertani (LB). La composición es: NaCl 1%, peptona biotriptasa 1% y extracto de levadura 0.5%.

Agar Luria Bertani (LBA). Tiene la misma composición que el LB, adicionado de 1.5% de agar bacteriológico.

Medio mínimo líquido modificado (Bartnicki-García y Nickerson, 1962). El medio se preparó según lo descrito, pero se modificó la fuente de nitrógeno (nitrate de potasio por nitrate de amonio) y la concentración de la fuente de carbono del 2 al 5% (Calderón-Oropeza, 2009). La composición final para 1 L: 50 g de Glucosa, 3 g de KH₂PO₄, 0.5 g de MgSO₄·7H₂O, 0.5 g de KNO₃, 1.8 x 10⁻³ g de ZnSO₄·7H₂O, 1 x 10⁻³ g de FeSO₄·7H₂O, 1 x 10⁻³ g de Tiamina, 1 x 10⁻³ g de Ácido nicotínico, 4 x 10⁻⁴ g CuSO₄·5H₂O y MnSO₄·H₂O 3 x 10⁻⁴ g. Todos los componentes del medio de cultivo se disolvieron en agua desionizada y se ajustó el pH a 5.5 (Calderón-Oropeza, 2009), para finalmente esterilizarlo por filtración.

Medio Vogel líquido. La composición para 1 L es: Sacarosa 1.5 g, 1X sales de Vogel (50X sales de Vogel: 150 g citrato de sodio $-5\text{H}_2\text{O}$, 250 g KH_2PO_4 anhidro, 100 g NH_4NO_3 anhidro, 10 g $\text{MgSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g $\text{CaCl}_2-2\text{H}_2\text{O}$), 5 mL de solución de elementos traza, 2.5 ml solución de biotina (0.1 mg/mL). La solución de elementos traza contiene: En 195 ml de agua destilada se disolvió: 5 g de ácido cítrico. H_2O , 5 g $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2.6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g $\text{MnSO}_4.\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g H_3BO_3 anhidro y 0.05 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ (tomado del Fungal Genetic Stock Center- www.fgsc.net).

Medio Vogel líquido modificado. Es la misma composición del medio Vogel líquido, únicamente se cambió la fuente de carbono de Sacarosa por arroz integral.

Medio Vogel sólido. Es la misma composición que el medio Vogel líquido, únicamente se le adicionó agar bacteriológico al 1.5%.

VI.3 Obtención de cultivos

Obtención de esporas de *C. lindemuthianum*. En cajas conteniendo PDA se inocularon 100 μL de una suspensión de esporas, se incubaron por 8 días a 28°C , recuperando las esporas con agua destilada estéril; las esporas se lavaron con agua destilada estéril por centrifugación y se almacenaron a 4°C .

Obtención de conidias de *N. crassa*. En matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 100 mL de medio Vogel sólido, se inocularon 5×10^8 conidias/mL y se incubaron durante 4 días a temperatura ambiente; las conidias se recuperaron con agua destilada estéril y se almacenaron a 4°C .

Para la obtención de ADN:

De *C. lindemuthianum*. Matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 75 mL de medio PDB (relación medio:aire de aproximadamente 1:5), se inocularon 5×10^8 esporas/mL, se incubaron en agitación constante a 28°C para recuperar el micelio a las 13 h. Las células se filtraron al vacío y se lavaron con agua con DEPC. El micelio obtenido se puso en tubos eppendorf y se almacenaron a -70°C .

Para la obtención de ARN de *C. lindemuthianum*. Matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 100 mL de medio mínimo modificado, se inocularon 5×10^8 esporas/mL, se incubaron a 28°C en agitación constante y se recuperó el micelio cada 48 h por 8 días. Las células se filtraron al vacío y se lavaron con agua con DEPC. El micelio obtenido se recuperó en tubos eppendorf y se almacenó a -70°C .

Para la obtención de ADN de *N. crassa*. Matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 75 mL de medio Vogel (relación medio:aire de aproximadamente 1:5), se inocularon con 5×10^8 esporas/mL; se incubaron en agitación constante a 28°C para recuperar el micelio a las 13 h. El micelio se filtró al vacío y se lavó con agua con DEPC. El micelio obtenido se puso en viales y se almacenaron a -70°C.

Para la obtención de ARN de *N. crassa*. Se realizó siguiendo el protocolo indicado por Zhang y col., (2011). Consiste en crecer en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio Vogel modificado (cambiando la fuente de carbono de glucosa por arroz integral al 2%) inoculados con 5×10^8 conidias/mL. Se incubaron a 30°C en agitación constante y se recuperó el micelio a los 5 días. El micelio se filtró al vacío y se lavó con agua con DEPC para almacenarlos en tubos eppendorf estériles a -70°C.

VI.4 Aislamiento de ADN genómico

Para la obtención de ADN de *C. lindemuthianum* y de *N. crassa*, se siguió el protocolo descrito por Reader y Broda (1985), el cual consiste en:

Micelio de 13 h de incubación, se pasó a un mortero estéril y congelado y se pulverizó con nitrógeno líquido. La muestra triturada se transfirió a tubos eppendorf limpios, donde se adicionó el regulador de extracción (200 mM Tris HCl 200 mM pH 8.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS 0.5%), en una relación 480 μ L/ 40 mg de homogenado inicial, y se mezcló suavemente. Posteriormente, se le adicionó un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1), realizando la extracción por 10 min. La muestra se centrifugó a 12 000 rpm por 25 min a 4°C. Se tomó la fase superior y se adicionó el mismo volumen (500 μ L) de cloroformo, se mezcló y centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min a 4°C. De esta centrifugación se tomó la fase acuosa a la que se adicionó 0.54 del volumen de isopropanol (aprox. 250 μ L), con la que se mezcló y centrifugo a 12 000 rpm por 10 min a 4°C, para eliminar el sobrenadante. Finalmente, el ADN se lavó con etanol al 70%, centrifugando nuevamente a 12 000 rpm por 10 min, descartándose el sobrenadante, para secar el ADN y resuspenderlo en 20 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM) de pH 8. Para verificar la pureza del ADN obtenido, una alícuota de la solución se aplicó a un gel de agarosa (al 1%) en TAE 1X (Tris-acetato 0.040 M, EDTA 0.001 M a pH 8), al gel también se aplicó una alícuota de marcadores de tamaño (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 100-3000 bp, Fermentas) y se dejaron resolver, usando TAE 1X como regulador

de corrida. Después de la separación, el gel se observó con un transiluminador de luz UV y se le tomaron fotografías.

VI.5 Aislamiento de ARN total

La extracción de ARN total se realizó por el método de Chomczynski y Sacchi (1987) utilizando un sistema comercial (TRIzol Reagent, Invitrogene) que consistió en:

Pulverizar 0.1 g de micelio congelado a -70°C en un mortero con nitrógeno líquido. El micelio triturado se pasó a un tubo eppendorf estéril y se le adicionó 1mL de TRIzol, se homogenizó ligeramente y se dejó incubando durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 200 μL de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1), homogenizando vigorosamente por 15 seg. Se incubó a temperatura ambiente y se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min a 4°C para obtener tres fases. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo eppendorf estéril. La fase acuosa se precipitó con 0.5 ml de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C . Se desechó el sobrenadante y el ARN se lavó con 1 ml de etanol al 75% frío (-20°C). Finalmente se centrifugó a 8,000 rpm durante 5 min a 4°C . El ARN obtenido se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en un volumen final de 100 μl de H_2O con DEPC estéril y se almacenó a -70°C . De esta solución se tomó una alícuota, se diluyó con agua con DEPC y se determinó la concentración de RNA en base a su absorbencia a 260 nm (A_{260}). Para calcular la concentración se tomó como factor $A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/mL}$ de ARN.

Para revisar la integridad del ARN total obtenido, las muestras se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (1 mg/mL), utilizando un indicador de corrida (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) con un regulador de corrida TAE 1X (Tris-acetato 0.040 M, EDTA 0.001 M a pH 8), a 80V por 45 min (Sambrook y Rusell, 2001).

VI.6 Alineamiento de secuencias homólogas

Las secuencias de aminoácidos descritas para la CDH de varios organismos se alinearon usando los programas BlastP y MegaAlign 7 en la opción ClustalW utilizando los parámetros preestablecidos por los programas (Gap penalty 10, gap length penalti 0.2, % divergencia esperado 30, peso de transición del ADN 0.5) y las secuencias de

nucleótidos se alinearon utilizando el programa DNASTAR MegaAlign 7 utilizando los parámetros preestablecidos.

VI.7 Diseño de oligonucleótidos

Con el alineamiento de secuencias se buscaron zonas conservadas de las proteínas para diseñar oligonucleótidos. Este diseño se realizó con el programa DNASTAR PrimerSelect para obtener el par de oligonucleótidos para cada organismo. Una vez obtenidos, se analizaron y se degeneraron de acuerdo al uso de codones de *C. lindemuthianum*. Para los genes *cdh* de *N. crassa*, los oligonucleótidos no se degeneraron.

VI.8 Obtención de un fragmento del gen *cdh*

Usando los pares de oligonucleótidos del gen *cdh* diseñados, y tomando en cuenta las temperaturas de alineamiento proporcionadas por el proveedor (SIGMA-ALDRICH), se realizaron reacciones de amplificación (PCR) usando un gradiente de temperaturas de alineamiento, hasta obtener fragmentos de la longitud esperada. Las temperaturas fueron: *Af*=67°C; *Nf*= 66°C; *Ac* = 55°C, *Afla* = 62°C, *2Nf*= 70°C, *Hi* = 55°C, *AHi* = 60°C, *Nc828* = 74°C, *Nc829* = 74°C, con las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	Condiciones de amplificación (30-35 ciclos)			Extensión final
	Desnaturalización	Alineamiento (Gradiente)	Extensión	
95°C/5 min	95°C/1 min	45-65°C/1 min	72°C/1 min	72°C/ 10 min

El número de ciclos fue de 30 a 35. En un volumen total de 20 µL, las reacciones de PCR contenían: regulador para Taq ADN polimerasa, ADN genómico a diferentes concentraciones, dNTPs 200 µM, MgCl₂ 2.5 mM, Taq DNA polimerasa 1 U y los oligonucleótidos a una concentración de 0.5 µM. El producto de la reacción se analizó en un gel de agarosa al 1% utilizando TAE 1X (Tris-acetato 0.40 M y EDTA 0.001 M) como regulador y 70 voltios. Las muestras de DNA se mezclaron con indicador de corrida (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) y con 5 µL de bromuro de etidio (1 mg/mL), antes de ser aplicadas al gel, el cual se observó en un transiluminador de luz UV después de la separación.

Para los RT-PCR se usó ARN de diferentes tiempos (2, 4, 6, 8 y 10 días de incubación bajo inducción), tratado con DNasa I (Grado amplificación, Invitrogen) y siguiendo las indicaciones del proveedor (Super Script® One-Step RT-PCR with Platinum® Taq- Invitrogen). Brevemente consistió en 1 µg de la muestra de ARN fue tratada con DNasa I (1 µL) y se incubó por 15 min a temperatura ambiente, después de lo cual se inactivó con 1 µL de EDTA 25 mM y calentamiento por 10 min a 65°C. Para la reacción de RT-PCR, se tomaron 5 µL de ARN, 25 µL de mezcla de reacción 2X (proporcionada en el kit), 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos (*Nd*, 10 µM), *Taq* RT 2 µL y agua tratada con DEPC para un volumen final de 50 µL. Las condiciones de amplificación fueron:

Síntesis ADNc	Desnaturalización	Condiciones de amplificación (35 ciclos)			Extensión final
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
55°C/20 min	94°C/3 min	95°C/1 min	49°C/1 min	72°C/1 min	72°C/ 10 min

Para la obtención de un fragmento del gen *cdh* de *C. lindemuthianum*, únicamente se amplificó ADNc usando como templado ARN obtenido al octavo día en condiciones de inducción. Para los ensayos posteriores de expresión del gen *cdh* se usaron los tiempos 2, 4, 6 y 8 días postinoculación.

VI.9 Purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa de bajo punto de fusión

Una vez contando con las diferentes muestras de ADN, se les realizó un análisis electroforético y se procedió a purificar los fragmentos de interés siguiendo las indicaciones del sistema comercial Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas®).

Brevemente, consiste en una vez cortadas las bandas, se adicionó amortiguador de fusión y se calentó a 55°C por 5 min. Se le adicionó la solución de polvo de sílice y se incubó nuevamente a 55°C por 5 min. Se centrifugó por 10 seg a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante. La muestra se resuspendió en amortiguador de lavado y se centrifugó por 5 seg a máxima velocidad, esto se repitió 3 veces. La muestra se dejó secando por 15 min, se resuspendió en agua desionizada y se incubó a 55°C por 5 min. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se verificó su pureza siguiendo las indicaciones descritas en párrafos anteriores.

VI.10 Ligación y transformación

La ligación del fragmento obtenido y la transformación de células de *E. coli* se realizaron siguiendo las indicaciones del proveedor del vector pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®).

Brevemente, se realizó la mezcla de ligación que contenía en: 4 µL de producto de PCR fresco, 1 µL de solución salina y 1 µL de vector. La mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente. 2 µL de la reacción se utilizaron para transformar 50 µL de células competentes de *E. coli*, se incubaron por 20 min en hielo, seguidas de un choque térmico de 30 seg a 42°C. A las células se les adicionaron 250 µL de medio LB y se incubaron a 37°C, 200 rpm y 1 h. 50 µL de células se inocularon en medio selectivo LBA con ampicilina a una concentración de 50 µg/mL y 40 mg/ml X-gal. Se incubaron a 37°C por 14-16 h y se realizó la selección de las colonias positivas.

VI.11 Obtención de ADN plasmídico (Minipreparaciones)

De las clonas positivas obtenidas por la transformación se obtuvo el ADN plasmídico por la técnica de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979), la cual consistió en inocular 2 mL de medio (LB) que contenía ampicilina a una concentración de 50 µg/mL con una única colonia transformada de *E. coli* y dejarlo incubando toda la noche a 37°C con agitación constante (200 rpm). Posteriormente, se tomaron 1.5 mL del cultivo y se centrifugaron a máxima velocidad por 30 seg a 4°C; se eliminó todo el medio cuidadosamente para dejar las células sin líquido. Las células se suspendieron en 100 µL de solución de lisis fría I (50 mM de glucosa, 25mM de Tris-HCl pH 8 y 10 mM de EDTA pH 8). Posteriormente se le adicionaron 200 µL de solución alcalina II (0.2 N de NaOH y 1% de SDS, preparada al momento de usarla), se mezcló vigorosamente por inversión 5 veces y se incubaron en hielo durante 3-5 min. Después se le adicionan 150 µL de solución alcalina III (60 mL de acetato de potasio 5M, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de H₂O. La solución es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato), se homogenizó por inversión y se incubaron en hielo por 5 min. El lisado bacteriano se centrifugó a máxima velocidad por 5 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionó un volumen igual de fenol: cloroformo (1:1), se mezcló y se centrifugó a la máxima velocidad por 2 min a 4°C. La fase acuosa (capa superior) se transfirió a un tubo nuevo. Los ácidos nucleicos se precipitaron adicionando 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente, se mezcló bien y se incubó por 2 min a temperatura ambiente, para después

centrifugar por 5 min a 4°C. Después de esto, se eliminó el sobrenadante y el ADN se lavó con 1 mL de etanol al 70%, nuevamente se centrifugó por 2 min a 4°C, el etanol se removió cuidadosamente y el precipitado se resuspendió en 50 µL de regulador TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM) de pH 8.

VI.12 Obtención de ADN plasmídico en altas concentraciones (Midipreparaciones)

Se siguió la misma metodología que en la sección anterior, sólo que los cultivos fueron de 10 mL. El ADN obtenido se suspendió en 100 µL de regulador TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM) de pH 8.

VI.13 Experimento tipo Southern

Al ADN genómico obtenido como se especifica en la sección Vi.4 de este capítulo, se le determinó la concentración a A_{260} nm. De esta solución se tomaron 10 µg para digerir con las enzimas *EcoRI*, *PstI*, *XhoI*, *BamHI* y *HindIII*, usando los reguladores recomendados por el proveedor y en un volumen final de 20 µL. Las mezclas de reacción se incubaron por 16 h a 37°C. Después de este tiempo, a las mezclas de restricción se les adicionó 1/6 del volumen de un indicador de corrida (Bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) y se aplicaron a un gel de agarosa al 1% en TAE 1X, con bromuro de etidio, de 14 cm de longitud. Se aplicó al gel un voltaje constante de 30 Volts/cm², para permitir una buena separación de los fragmentos de restricción. Como marcador de tamaño se empleó una alícuota de ADN del fago λ cortado con *PstI*. Después que el frente alcanzó los 13 cm, el gel se retiró de la cámara de electroforesis y se le tomó una foto. Enseguida, los geles se prepararon para la transferencia a membranas de nylon (Hybond N⁺), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, el gel se colocó en una solución de HCl 0.25 N por 20 min, se enjuagó con agua destilada; luego se colocó en una solución de NaOH 0.4 N (solución desnaturalizante) por 30 min. Se enjuagó nuevamente con agua destilada, se colocó en una solución de Tris 0.5 M de pH 7 y NaCl 1.5 M (solución neutralizante) por 20-30 min, se enjuagó con agua desionizada y se colocó en una solución de SSC 6X (una solución 20X de SSC contiene NaCl 3 M y citrato de sodio 0.3 M), la cual también se empleó como solución de transferencia. Finalmente el gel se dispuso para la transferencia.

Después de la transferencia, la membrana se enjuagó en una solución SSC 3X, se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó por exposición a luz UV y posterior incubación

a 80°C por 1 h. Después de fijada, la membrana se empleó para la hibridación tipo Southern, para lo cual la membrana se colocó en una solución de pre-hibridación (Na_2HPO_4 0.5 M de pH 7.5, SDS al 7%, EDTA 1 mM y albúmina al 1 %). En esta solución se incubó por un mínimo de 2 h a la temperatura de hibridación.

Para el marcaje del fragmento que se empleó como sonda homóloga, el fragmento *cdh* de *C. lindemuthianum* que ya se encontraba insertado en el plásmido pCR2.1-TOPO® (Invitrogen®) fue cortado con *EcoRI* por 2 h a 37°C y analizado en geles de agarosa al 1% en TAE 1X con bromuro de etidio, usando como marcador de tamaño una alícuota de ADN de 100 a 3000 pb (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 100-3000 bp, Fermentas). Después de la electroforesis los fragmentos se purificaron de acuerdo a lo descrito en la sección Vi.9 de este capítulo. Una alícuota de la solución que contenía el fragmento se analizó en un gel de agarosa para calcular su concentración. De estos fragmentos purificados se tomaron de 2.5 a 55 ng para el marcaje usando el sistema comercial (Rediprime II DNA Labelling System, Amersham-GE). La sonda radioactiva se adicionó a la solución de prehibridación en donde se encontraba la membrana. La hibridación se llevó a cabo en un horno con agitación y a una temperatura de hibridación variable. Al día siguiente, se recuperó la solución con la sonda y se guardó a -20°C para su uso subsecuente. La membrana se lavó dos veces con una solución Na_2HPO_4 100 mM, SDS al 0.5% y EDTA 1 mM por 30 min; después se realizó un lavado mas con una solución de Na_2HPO_4 40 mM, SDS al 0.5% y EDTA 1 mM por 30 min cada uno a la temperatura de hibridación. Se eliminó el exceso de líquido de la membrana y se colocó entre hojas de plástico transparente. Se colocó la membrana en un “cassette” de autoradiografía, sobre ella se colocó la película fotográfica y se incubó a -70°C por tiempos variados. Después de este tiempo, la película se reveló para detectar las señales de hibridación.

VI.14 Experimento tipo Northern

Después de obtener las diferentes muestras de ARN total de los diferentes tiempos de incubación de *C. lindemuthianum*, se determinó su concentración por $A_{260\text{nm}}$. De cada muestra se tomaron 40 µg y se sometieron a una separación en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes, el cual se prepara con 1.5 g de agarosa, 17 mL de formaldehído (40% vol/vol), 10 mL de MOPS 10X (ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico 0.2 M, acetato de sodio pH 7 0.05 M y EDTA 0.01 M) y 2 µL de bromuro de etidio (10

mg/mL). Las muestras de ARN se desnaturalizan antes de colocarlas en el gel en una mezcla que contenía 40 µg de ARN, 20 µL de formamida desionizada, 4 µL de MOPS 10X, 6.4 µL de formaldehído (40% vol/vol) y 5 µL indicador de corrida (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%). La solución se incubó a 65°C por 1 h, se enfrió rápidamente en hielo y se aplicó al gel. Como marcador de tamaño se aplicó al mismo gel una alícuota del marcador de ARN de 0.5-10 Kb (Invitrogen), tratada de la misma manera que las muestras. Después de la electroforesis, se tomaron fotografías del gel y se preparó para la transferencia a membranas de nylon.

Para la transferencia, el gel se lavó con agua tratada con DEPC, luego se coloca en una solución de SSC 10X y en esta misma solución se transfirió. Las membranas usadas para la transferencia fueron Hybond N⁺ (Amersham). La transferencia se dejó proceder por 16 h y posteriormente, la membrana se fijó por exposición a luz UV y posterior incubación a 80°C por 1 h.

Para la hibridación, la membrana se colocó en una solución de pre-hibridación (Na₂HPO₄ 0.5 M de pH 7.5, SDS al 7%, EDTA 1 mM y albúmina al 1 %), se incubó a temperaturas variadas por un mínimo de 2 h y se adicionó la sonda marcada. Las hibridaciones se llevaron a cabo a temperaturas variadas por 15 h. Después de este tiempo, se retiró la sonda y las membranas se lavaron dos veces con una solución Na₂HPO₄ 100 mM, SDS al 0.5% y EDTA 1 mM por 30 min; después se realizó un lavado mas con una solución de Na₂HPO₄ 40 mM, SDS al 0.5% y EDTA 1 mM por 30 min cada uno. Todos los lavados se realizaron a temperaturas variadas. Posterior a los lavados se eliminó el exceso de líquido de las membranas, se colocaron entre hojas de plástico transparente y se expusieron a película fotográfica en cassetes incubados a -70°C por tiempos variados. Después de este tiempo, la película se reveló para detectar las señales de hibridación.

VII. RESULTADOS

VII.1 Identificación del gen *cdh* de *C. lindemuthianum*

VII.1.1 Aislamiento de ácidos nucleicos de *C. lindemuthianum* y *N. crassa*

El ADN es de gran peso molecular e íntegro, en el cual se observó el mismo patrón de señales electroforéticas en las repetidas extracciones que se realizaron. En la Figura 4a y 4b se muestra un gel representativo de la extracción de ADN tanto de *C. lindemuthianum* (Figura 4a) como de *N. crassa*, hongo usado como referencia (Figura 4b).

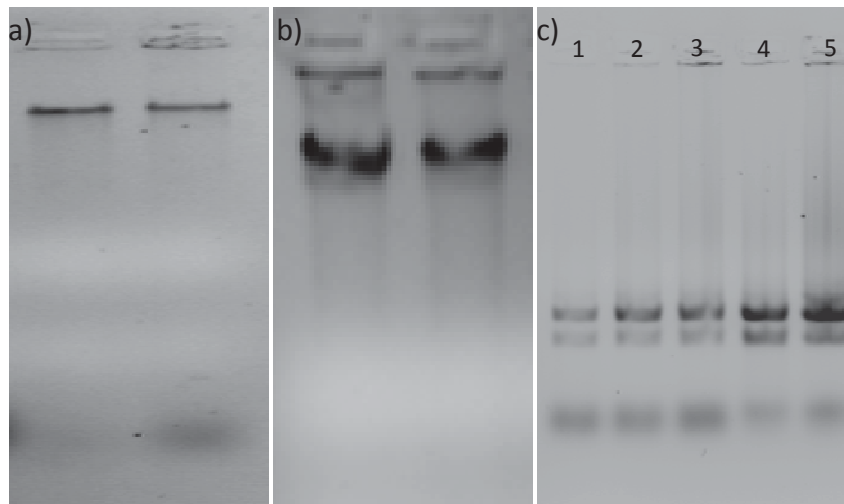


Figura 4. Análisis electroforético de ácidos nucleicos de *C. lindemuthianum* y *N. crassa*. ADN total de *C. lindemuthianum* a) y de *N. crassa* b). c) Separación electroforética de ARN total de *C. lindemuthianum* de micelio de 2, 4, 6 y 8 días de incubación (carriles 1, 2, 3 y 4, respectivamente) y de *N. crassa* de 5 días de incubación (carril 5).

De los cultivos de *C. lindemuthianum* se obtuvo ARN total en los tiempos 2, 4, 6 y 8 días postinoculación; para *N. crassa* se obtuvo de micelio de 5 días. En la Figura 4c se muestra una imagen representativa de los ARNs de *C. lindemuthianum* y de *N. crassa*.

VII.1.2 Búsqueda de secuencias conservadas de los genes *cdh*

Se realizó una búsqueda de todas las secuencias de aminoácidos y nucleótidos descritas para la CDH en la base de datos del GenBank. Se eligieron las secuencias que tuvieran entre 740 y 860 aminoácidos.

Se encontraron más de 300 secuencias con homología a la CDH (Febrero 2010), de las cuales sólo 18 cumplían con el tamaño establecido, 9 corresponden a ascomicetos y 9

a basidiomicetos (Cuadro 6). De las nueve reportadas para ascomicetos, solo las de *M. thermophila*, *H. insolens* y *N. crassa* han sido caracterizadas.

Cuadro 6. Secuencias de CDH consideradas para este estudio. Con un asterisco se muestran a los organismos cuya CDH se reporta como hipotética.

División	Organismo	No. de residuos de aminoácidos	No. de bases	No. De acceso
Ascomicetos	<i>Myceliophthora thermophila</i>	828	2487	AAC26221
	<i>Humicola insolens</i>	785	2358	AAF69005
	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181*	791	2376	EAW19340
	<i>Aspergillus flavus</i> *	857	2574	EED47548
	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP*	863	2592	EDU42497
	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1*	791	2376	EAW14611
	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293*	805	2418	EDP55266
	<i>Neurospora crassa</i> *	828	2487	NUC05923
			829	2490
Basidiomicetos	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	773	2322	AAB92262
	<i>Trametes versicolor</i>	768	2307	AAC50004
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	769	2310	AAC32197
	<i>Grifola frondosa</i>	768	2307	BAC20641
	<i>Athelia rolfsii</i>	771	2316	AAO64483
	<i>Grifola frondosa</i>	768	2307	BAC20641
	<i>Coniophora puteana</i>	774	2325	BAD32781
	<i>Irpex lacteus</i>	777	2334	BAD36748
	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	774	2325	ACF60617

Con el alineamiento de las secuencias, se encontró un porcentaje de similitud de entre el 35 y 40%. Posteriormente, se alinearon por separado las secuencias de los ascomicetos y las de los basidiomicetos, obteniendo porcentajes de similitud del 36 al 77 y del 65 al 83%, respectivamente, ver el Cuadro 7. También se determinó el porcentaje de similitud en el dominio de unión al grupo *hemo* en las secuencias de los ascomicetos, encontrando de un 33 al 66% de similitud (Cuadro 7). Estas secuencias mostraron de 54 a 79% de similitud en el dominio de unión al grupo FAD (Cuadro 7). Se utilizaron las secuencias de los organismos más relacionados a *C. lindemuthianum* en el dominio de unión al grupo *hemo* para el diseño de varios oligonucleótidos.

Cuadro 7. Similitud de las secuencias CDH. De ascomicetos y basidiomicetos; del alineamiento del dominio de unión a Citocromo de ascomicetos; y del alineamiento del dominio de unión al grupo FAD de ascomicetos.

Organismo	Porcentaje de similitud de las secuencias de nucleótidos			
	Por organismo	Entre organismos	Por dominio de unión a coenzima	
			Citocromo	grupo FAD
Basidiomicetos	65-83	35-40	-	-
Ascomicetos	36-77		36-64	54-79

VII.1.3 Obtención de un fragmento del gen *cdh*

Para la amplificación de un fragmento del gen *cdh* se diseñaron nueve pares de oligonucleótidos a partir de las secuencias de los genes *cdh* de *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. flavus* y *N. fischieri*, *H. insolens* y *N. crassa*; los cuales amplificaban regiones de entre 200 y 500 pares de bases. En el Cuadro 8 se muestran los oligonucleótidos diseñados, la clave de referencia, el organismo del cual se tomó la secuencia y el número de acceso de la secuencia en el GenBank.

Cuadro 8. Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la búsqueda del gen *cdh*. Clave de referencia, secuencia de los oligonucleótidos, nombre del organismo del cual se obtuvieron y número de acceso en el GenBank. En las secuencias degeneradas la nomenclatura es: A: adenina; T: timina; G: guanina; C: citosina; N: A+T+G+C; R: A+G; Y: C+T; M: A+C; S: G+C; W: A+T, H: A+T+C.

Referencia	Oligonucleótido Directo	Referencia	Oligonucleótido Reverso	Organismo	No. de acceso
<i>Aff1</i>	ACNGTNCNACNWSYCARACM	<i>Afr2</i>	GMNGCNGARGARCARMGNGTNGTN	<i>A. fumigatus</i>	EDP55266
<i>Nff1</i>	YTCCNWSYACNGCNYTNACNACN	<i>Nfr2</i>	CCNGTNGTNGTNCNGGN	<i>N. fischieri</i>	EAW19340
<i>Acf1</i>	ACNTGGACNATGCCNGCNACN	<i>Acr2</i>	GGNGGNGCNYTNGTNATH	<i>A. clavatus</i>	EAW14611
<i>Aflaf1</i>	WSNWSNGCNGGNTGGTGY	<i>Aflar2</i>	MGNGTNGMGNMGNGCNYTN	<i>A. flavus</i>	EED47548
<i>2Nff1</i>	CTCCCWSNACSGCCYTSACSACS	<i>2Nfr2</i>	CCCCGTSGTSGTSCCGGCGA	<i>N. fischieri</i>	EAW19340
<i>Hif</i>	CAWSNGACCCCTGGCTACTGC	<i>Hir</i>	AWSNACSACSGARGACGARAT	<i>H. insolens</i>	AAF69005
<i>AHif</i>	ATGGAYGGNAARYTNTAYMGNGAYGA	<i>AHir</i>	AARTTYTCNCKNGCRCTCNGC	<i>H. insolens</i>	AAF69005
<i>Nclf</i>	TACACCGGAAATGCAACCCTGACC	<i>Nclr</i>	AGCACCGGCGCCAACGATG	<i>N. crassa</i>	NUC05923
<i>Ncllf</i>	GCGGCGGTGGCTTCATTGCT	<i>Ncllr</i>	GGGCCCCCTTATTGCTGGTAGAAA	<i>N. crassa</i>	NUC00206

Se realizaron ensayos con los siete juegos de oligonucleótidos, obteniendo amplificaciones con los pares *Nf* de aproximadamente 2000 pb, *2Nf* de 613 pb, *Hi* y *Nd* (Figura 6a y 6b). Con los alineamientos de estas secuencias, se encontró que la que correspondía al gen *cdh* era el fragmento amplificado con los oligonucleótidos *Nd* (Figura 5). En el Cuadro 9 se muestran los resultados obtenidos. Cabe señalar que también se amplificó un fragmento de aproximadamente 500 pb de los genes *cdh* I y II de *N. crassa*, (Figuras 6c y 6d, respectivamente).

```

cga agt tgg ctc ggc tgg cgg ctc gga tcc agt gag tac tgg gtc gga tgc cct gtt tca gca cat gtt agt aac cat atg aca aag cgc ata gaa
R S W L G W R L G S S E Y W V G C P V S A H V S N H M T K R I E
caa aac gta ccc aga gca gtc agc agt agt ggt ctt cgt ggc aga agc cca agc gta ggt atg cgg gac tat ctc gag agg cgc tcc ata ttg acc
Q N V P R A V S S S G L R G R S P S V G M R D Y L E R R S I L T
aaa ccc att gtc atg aaa gcc gga aat ggc ctt gtc agg gca agt cgg gtt ctg aag att tcc ctt ggc cgc ggc acg gcc caa gac gag aag gcc
K P I V M K A G N G L V R A S R V L K I S L G R G T A Q D E K A
act gct ggt tac gct tcc ctt gct tcc tcc ttg gtt cca tgc gaa aca gtc ctg gca gcg ata gat caa ttc gaa ctg tgt cga gtt cac agt ggc aga
T A G Y A S L A S S L V P C E T V L A A I D Q F E L C R V H S G R
gat ctg ggt cag ggt tgc att t
D L G Q G C I
    
```

Figura 5. Secuencia amplificada del gen *cdh* de *C. lindemuthianum*. Secuencia nucleotídica y aminoacídica amplificada con los oligonucleótidos *Nci* del gen *cdh* de *C. lindemuthianum*.

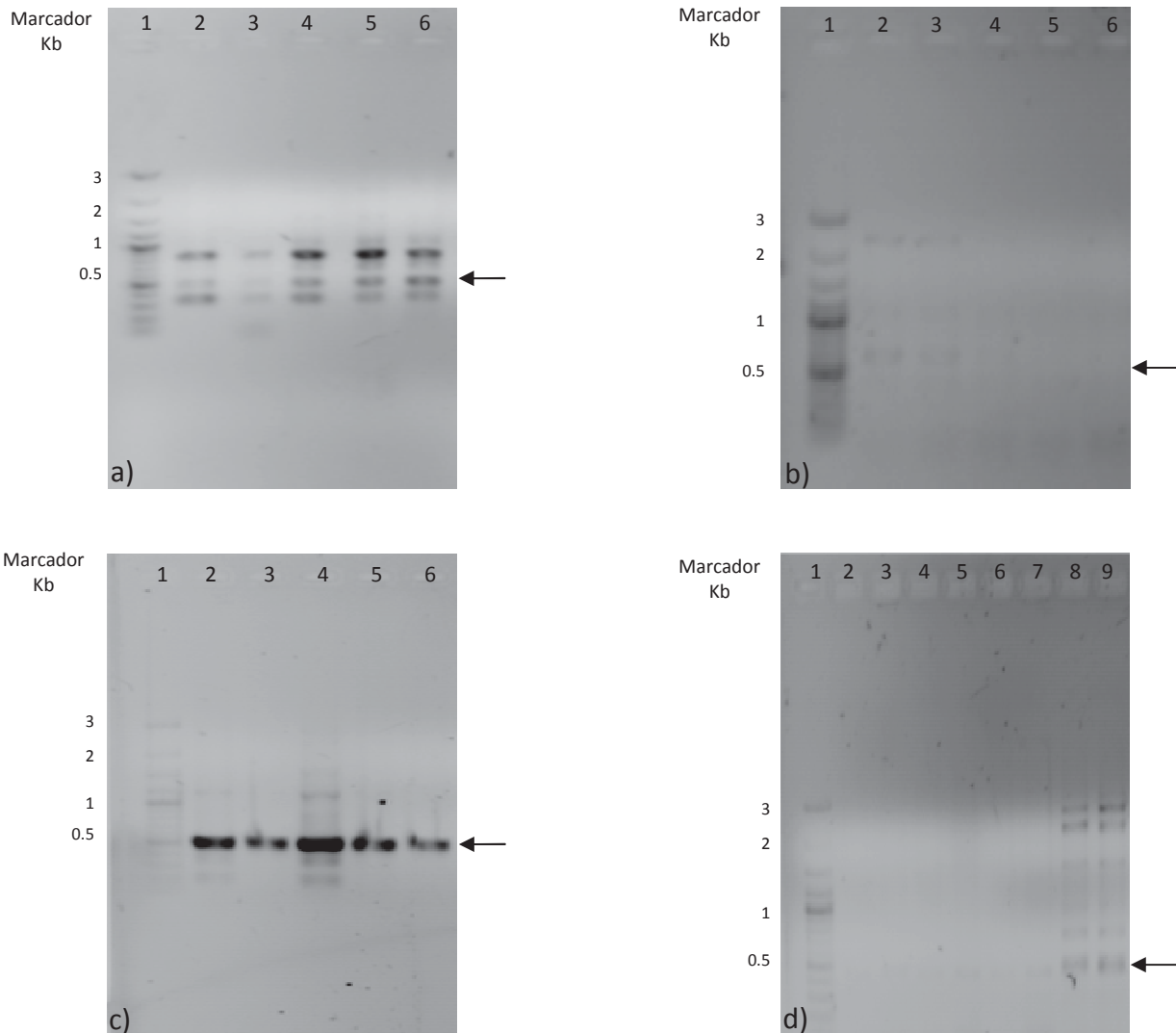


Figura 6. Análisis electroforético de los fragmentos obtenidos por PCR con oligonucleótidos diseñados para el gen *cdh*. PCR con oligonucleótidos diseñados para el gen *cdh* I a) y b) *cdh* II de *N. crassa* y ADN de *C. lindemuthianum*; c) *cdh* I y d) *cdh* II de *N. crassa* y ADN de *N. crassa*. Carril 1: marcador de tamaño 100 pb; carriles restantes, amplificaciones obtenidas. La flecha indica el fragmento amplificado.

Cuadro 9. Porcentaje de similitud de los fragmentos amplificados con oligonucleótidos para el gen *cdh*. Se presenta la clave de referencia, nombre del organismo del cual se obtuvieron, número de acceso en el GenBank, fragmento esperado, fragmento amplificado, secuencias obtenidas y porcentaje de similitud de estas secuencias con los genes *cdh* descritos.

Ref.	Organismo	No. de acceso	Fragmento esperado	Fragmento amplificado	Secuencia	% de similitud
<i>Af</i>	<i>A. fumigatus</i>	EDP55266	364	No amplificado		
<i>Nf</i>	<i>N. fischeri</i>	EAW19340	310	2000	No secuenciado	
<i>Ac</i>	<i>A. clavatus</i>	EAW14611	369	No amplificado		
<i>Afla</i>	<i>A. flavus</i>	EED47548	326	No amplificado		
<i>Nf2</i>	<i>N. fischeri</i>	EAW19340	310	613	GAATTCGCCCTTCCCCTGGTGGTCCCCGGCGAGGG GAGGGGAACCATGACGGGCGTATGTGATATTGTATC CAAGTTGAGTCATACAGGAGGTAGAACCAACCCGT CCTCGGGATAATCAAACATACTACGTCCCATGTTTCT CGCTTTTTTCCCTTCTCTAGTCCACTGTAATTACCT GTATAAGTATCAGGATACCGATCGATTGGCTCAGAA AATGGCTTATTGGCTTACGTGAGAAACCTAGCATAT ACCAATGGGACTTGACAATTTTGGGGGTCAATTT GTTAGCCCTGAAAAGTGCAGATACACCAAGAC ATTAACCTGTCAATTCACAGGGTCTCCACAGTGAA ATTTGGTGTGGGCCACCGTCAAGTCCCGTAAGTG GACCAGGCTGGCTCGGGCATTGCTTAGTCTACTA AGCTTTCCTGGCACTGCTCGGATTTTATTGGTCTTG CTCTGCTTTTTCTAGCGTCCGTCAAGCCAGAAAGCCG TCGTCAAGGCCGTCTGGGGAGAAGGGCGAATTC	0
<i>Hi</i>	<i>H. insolens</i>	AAF69005	297	-		
<i>AHi</i>	<i>H. insolens</i>	AAF69005	204	192	GAATTCGCCCTTATGGATGGTAAACTATACGGGAC GAGCTCAAGAAGCGCAAGTACGCTAAATGGCAACC GGATCGATTAGGTCTCAGACCGATGATGAAGACAA CGACAACACTACAATAACAATAATGAGGGGGAGG AGAACATACCATCAGCTGATGCGCGCAGAAAT TTAAGGGCGAATTC	0
<i>Ncl</i>	<i>N. crassa</i>	NCU05923	480	424	CGAAGTTGGCTCGGCTGGCGGCTCGGATCCAGTGA GTACTGGGTGGGATGCCCTGTTTCAGCACATGTTAG TAACCATATGTGAACAAAGCGCATAGAACAAAACG TACCCAGAGCAGTCAGCAGTAGTGGTCTTCGTGGCT AAAGAAGCCCAAGCTGAGTATgAGGTATGCGGGAC TATCTCGAGAGGGCTCCATATTGACCAAAACCATT GTCATGAAAGCCGAAATGGCCTTGTGAGGGCAAG TCGGGTTCTGAAGATTTCCCTTGGCCGCGCACGGC CCAAGACGAGAAGGCCACTGCTGGTTGATACGCTT CCCTTGCTTCTCTTGGTTCCATGCGAAACAGTCTT GGCAGCGATAGATCAATTGAACTGTGTCGAGTTC ACAGTGGCAGAGATCTGGGTGAGGGTTGCATTT	87
<i>Ncll</i>	<i>N. crassa</i>	EAA27355	510	No amplificado		

VII.1.4 Obtención de una sonda del gen *cdh*

Para la obtención de una sonda que no tuviera intrones del gen *cdh* se realizaron ensayos de RT-PCR usando los oligonucleótidos diseñados para el gen *cdh* I de *N. crassa* y teniendo como templado ARN de *N. crassa* para la obtención de una sonda heteróloga y de *C. lindemuthianum* para la obtención de una sonda homóloga. Ambas amplificaciones fueron de alrededor de 500 pb. En la Figura 7 se muestra los análisis electroforéticos de las reacciones realizadas. Las temperaturas de alineamiento seleccionadas para realizar el ensayo fueron 49°C para *C. lindemuthianum* y 60°C para *N. crassa*.

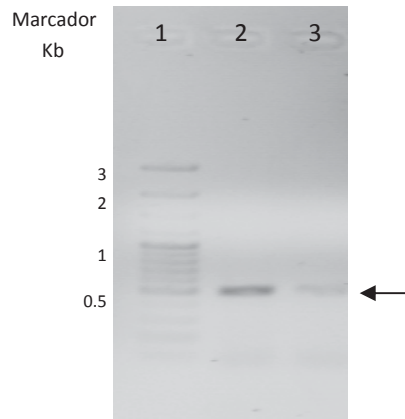


Figura 7. Amplificación por RT-PCR de una sonda homóloga y heteróloga del gen *cdh I* de *C. lindemuthianum*. Las reacciones se realizaron con oligonucleótidos diseñados en base al gen *cdh I* de *N. crassa* y usando como templado 1 µg de ARN de *C. lindemuthianum* (carril 2) y de *N. crassa* (carril 3). Con la flecha se indica el fragmento esperado de aproximadamente 500 pb.

El fragmento obtenido fue ligado al vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen), para luego transformar células competentes de *E. coli*. De las clonas positivas, se obtuvo ADN plasmídico que se sometió a una restricción de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Se secuenciaron dos clonas que tuvieran el inserto del gen *cdh* de *N. crassa* y dos de *C. lindemuthianum*. El fragmento del gen *cdh* de *N. crassa* presentó un 99% de identidad al reportado en la base de datos NCBI. El fragmento del gen *cdh* de *C. lindemuthianum* presentó un 87% de similitud al gen *cdh I* de *N. crassa*. En el Cuadro 10 se presentan los porcentajes de similitud obtenidos del fragmento *cdh* de *C. lindemuthianum* y otras secuencias reportadas en el NCBI.

Estos fragmentos del gen *cdh* se marcaron radioactivamente para usarlos como sonda heteróloga (*N. crassa*) y homóloga (*C. lindemuthianum*), de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

Cuadro 10. Similitud del fragmento *cdh* de *C. lindemuthianum* con secuencias nucleotídicas reportadas en el NCBI. Se indica el organismo, la proteína y el % de similitud.

Organismo	Proteína	% Similitud
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	Celobiosa deshidrogenasa	87
<i>Sordaria macrospora</i>	Proteína hipotética CDH	86
<i>Humicola insolens</i>	Celobiosa deshidrogenasa	55
<i>Aspergillus clavatus</i>	Celobiosa deshidrogenasa	36
<i>Stachybotrys bisbyi</i>	Celobiosa deshidrogenasa	16
<i>Hordeum vulgare</i>	Proteína hipotética	8
<i>Mus musculus</i>	Clona RP23-145M5	7

VII.2 Identificación del número de copias del gen *cdh* en *C. lindemuthianum*

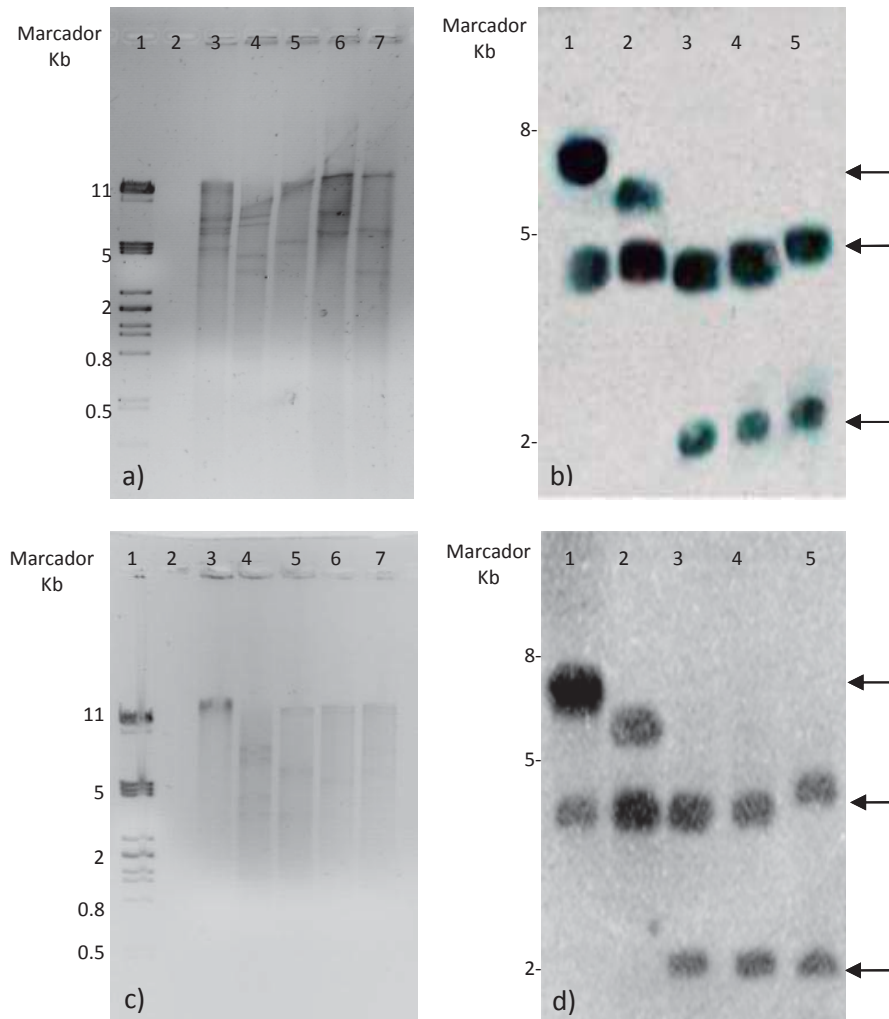


Figura 8. Hibridación tipo Southern del gen *cdh* de *C. lindemuthianum*. a) y c) Gel de agarosa con muestras de ADN de *C. lindemuthianum* digerido con *EcoRI*, *HindIII*, *XhoI*, *BamHI* y *PstI*. (Carriles 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente). En ambos geles el carril 1 es: Marcador de tamaño (fago λ cortado con *PstI*). Placa de autoradiografía obtenida de las membranas hibridadas con una sonda heteróloga b) y una sonda homóloga d). Las flechas indican las señales obtenidas al realizar la hibridación.

Muestras de ADN (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *C. lindemuthianum* fueron tratadas con diferentes enzimas de restricción: *EcoRI*, *HindIII*, *XhoI*, *BamHI* y *PstI*. En las Figuras 8a y 8b se muestran imágenes representativas del análisis electroforético de las muestras y del revelado de la placa, respectivamente. En las Figuras 8c y 8d se muestran el gel con el ADN cortado con diferentes enzimas y la placa colocada sobre la membrana, respectivamente. Ambas hibridaciones dan el mismo número de señales. Para todas las

muestras de ADN cortadas con las diferentes enzimas se observó una doble señal. Las señales se observaron a la altura de los 2 a las 8 Kpb de acuerdo al marcador utilizado.

VII.3 Determinación de la expresión del gen *cdh* de *C. lindemuthianum*

Para determinar los niveles de expresión del gen *cdh* de *C. lindemuthianum* se realizó un análisis tipo Northern, mediante la hibridación con una sonda heteróloga (ADNc de *cdh* de *N. crassa*) y con una homóloga (ADNc del gen *cdh* de *C. lindemuthianum*). En las Figuras 9a y 9b se muestran el gel desnaturizante de las muestras de ARN y la placa que estuvo en contacto con la membrana, respectivamente. En las Figuras 9c y 9d se muestran el gel de las muestras de ARN y la placa revelada que estuvo en contacto con la membrana, respectivamente.

En las autorradiografías obtenidas con ambas sondas, se observa el mismo patrón de señales, donde la banda que representa al ARNm del gen *cdh* de *C. lindemuthianum*, aparece desde el segundo día (carril 1 de las Figuras 9b y 9d) y cuya intensidad aumenta con respecto al tiempo de incubación en presencia del inductor. Las señales se observan a la altura de las 2 a 3 Kpb, lo que indica el tamaño del transcrito. En la Figura 10 se presenta la gráfica obtenida de un análisis densitométrico realizado con las placas de las hibridaciones homóloga y heteróloga. Se tomó como base la señal del tiempo uno (dos días de incubación con inductor).

Se realizaron ensayos de RT-PCR con 1 µg/µL de ARN de *C. lindemuthianum* obtenidos a los tiempos ya indicados. Además se incluyó un tiempo cero, correspondiente a ARN de *C. lindemuthianum* recuperado al segundo día sin inducción, además de ARN de *N. crassa*, el cual fue el control positivo.

En la Figura 11a se muestra el análisis electroforético del ensayo de RT-PCR. En la Figura 11b se muestra la gráfica del análisis densitométrico, para este análisis, la densidad de la banda obtenida para las condiciones sin inducción, se tomó como base para cada uno de los tiempos.

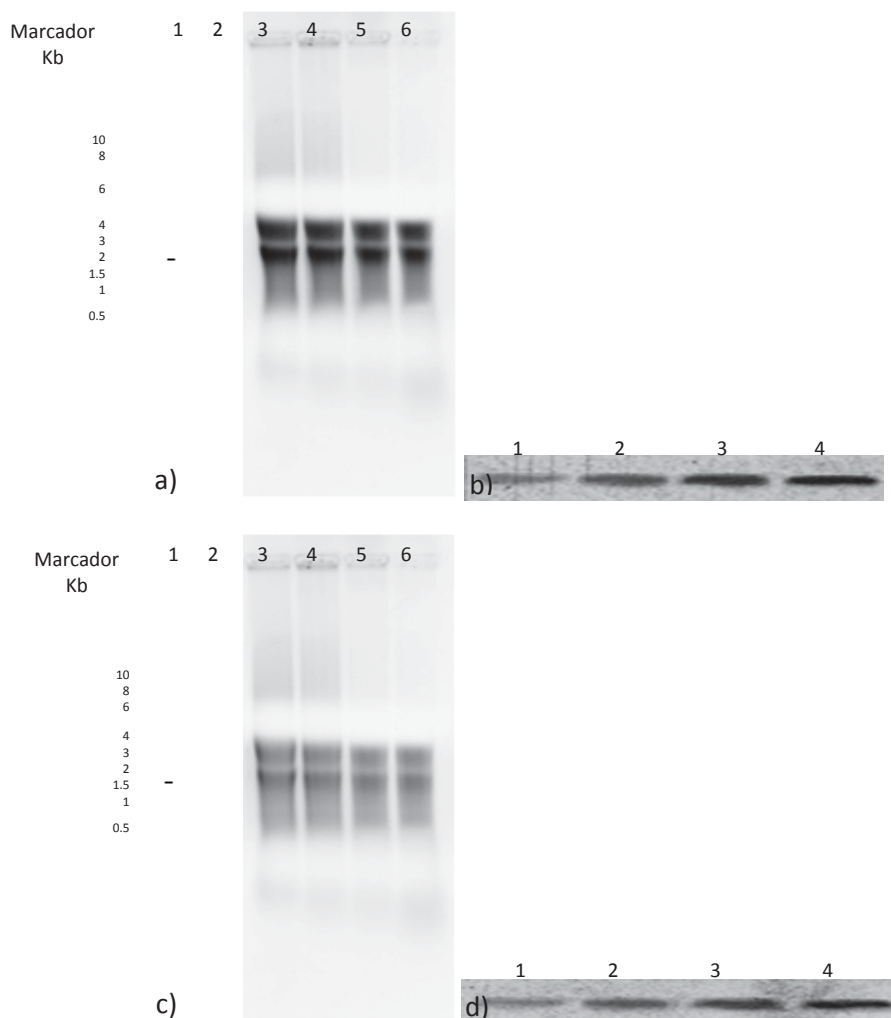


Figura 9. Análisis de expresión del gen *cdh* de *C. lindemuthianum*. En a) y c) se muestran los geles desnaturalizantes de los ARN de *C. lindemuthianum* obtenidos de micelio a los 2, 4, 6 y 8 días de incubación en condiciones de inducción. (Carriles 3, 4, 5 y 6, respectivamente). Carril 1: Marcador de tamaño (0.5 a 10 Kb). Autoradiografía de las membranas de la hibridación usando una sonda heteróloga b) y una sonda homóloga d).

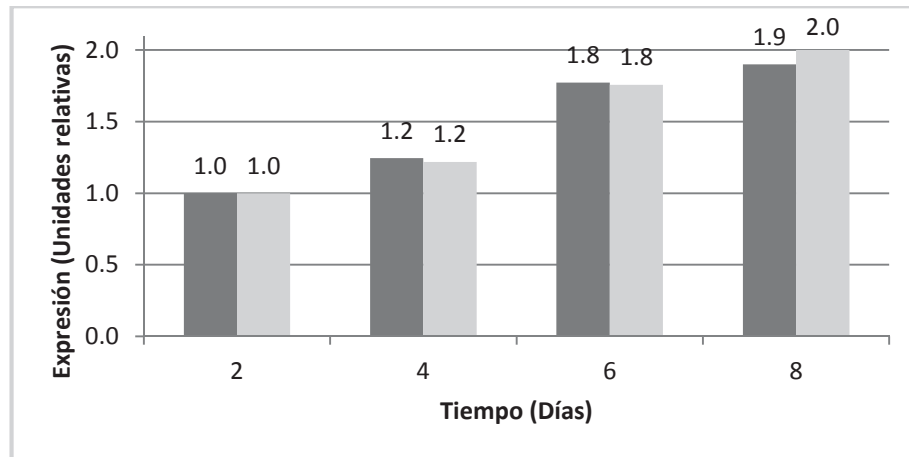


Figura 10. Análisis densitométrico de la expresión del gen *cdh* de *C. lindemuthianum*. Aumento de los niveles de expresión del gen *cdh* de *C. lindemuthianum* cuando es crecido con dextrosa al 5%. Se grafican las densidades de las bandas obtenidas con la sonda homóloga y con la sonda heteróloga. Se usó como base uno la expresión obtenida al tiempo uno (micelio de dos días en presencia del inductor). Las barras gris oscuro corresponden a la sonda homóloga y las barras gris claro a la homóloga.

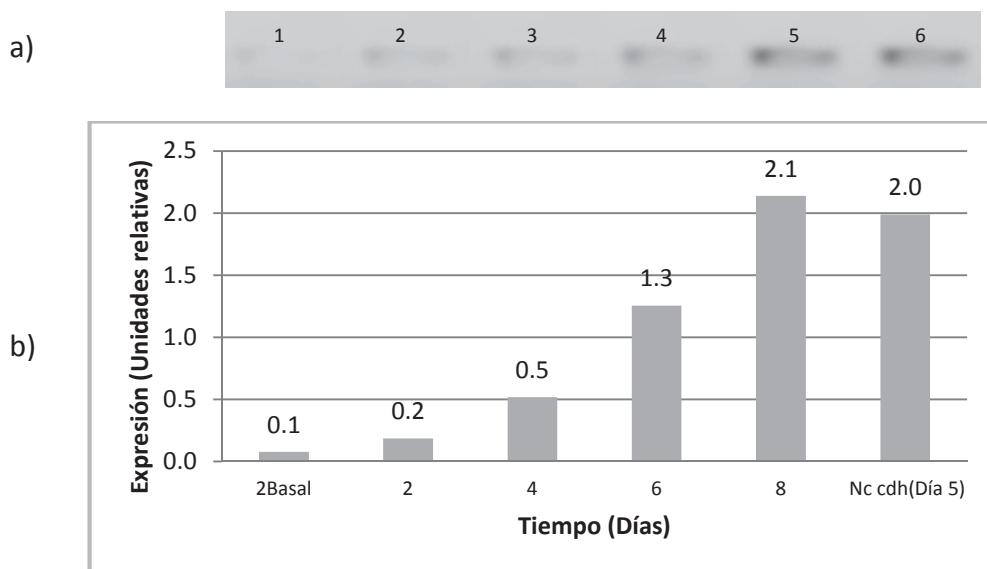


Figura 11. Análisis semicuantitativo de expresión del gen *cdh* de *C. lindemuthianum*. a) Ensayo de RT-PCR con muestras de ARN recuperado de micelio de *C. lindemuthianum* a los tiempos 2, 4, 6 y 8 días de incubación con dextrosa al 5% como inductor (carriles 2 al 5, respectivamente); RT-PCR del gen *cdh* de *C. lindemuthianum* con muestra de ARN recuperado de micelio al segundo día sin inducción (carril 1). RT-PCR del gen *cdh* de *N. crassa* usando ARN recuperado al quinto día de incubación (carril 6). b) Análisis densitométrico de los niveles de expresión del gen *cdh* en condiciones de inducción, sin inducción y del gen *cdh* I de *N. crassa*. Se usó como base uno la expresión obtenida al tiempo uno (dos días de incubación con dextrosa al 2%).

VIII. DISCUSIÓN

El estudio de la CDH ha aumentado continuamente debido a sus múltiples aplicaciones industriales (De Luca y col., 2000, Henriksson y col., 2000). Se sugieren dos áreas principales: uso analítico como biosensor y en ensayos enzimáticos para la detección y cuantificación de sustratos y moléculas análogas, así como usos biotecnológicos en la industria del papel o alimenticia, en biorremediación/biodegradación y biocatálisis (Zámocký y col., 2006). La mayoría de las investigaciones se han enfocado en la enzima de *Phanerochaete chrysosporium* (Bao y col., 1993; Henriksson y col., 2000), pero actualmente, la identificación de microorganismos productores de CDH sobre medios simples ha ido en aumento, con el fin de disminuir costos a escala industrial, además de encontrar una CDH con las mejores características de producción y de actividad (Ghahfarokhi y col., 2004).

La actividad CDH fue reportada por primera vez en 1974 por Westermark y Erikson y dos décadas más tarde, se reportó la secuencia del primer gen *cdh* (Raíces y col., 1995), lo cual dio la pauta para que se empezaran a elucidar características bioquímicas y moleculares de la proteína y el gen. La CDH es una enzima extracelular secretada por hongos ascomicetos y basidiomicetos. Un amplio número de enzimas degradadoras de lignocelulosa han sido descritas para ambos organismos, pero la producción y actividad enzimática de la CDH de ascomicetos ha sido menos investigada y es poco entendida comparada con la de los basidiomicetos.

Hasta el 2006, se habían identificado aproximadamente 40 organismos que poseen el gen *cdh*, aunque gran parte de ellos son hipotéticos. La mayoría de estos genes son de basidiomicetos, destacando los estudiados realizados en *P. chrysosporium* y en *T. versicolor* (Raíces y col., 1995; Li y col., 1996; Dumonceaux y col., 1998). En ascomicetos el estudio ha sido menor, contando sólo con 3 secuencias totalmente caracterizadas, y 15 reportadas como hipotéticas.

Al considerar que se conoce poco acerca del gen *cdh* de ascomicetos y teniendo el antecedente de que en el hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum* se detectó actividad tipo CDH (Calderón Oropeza y col., 2011), se planteó determinar si la actividad enzimática correlaciona con la presencia y expresión del gen *cdh* del organismo. Para ello, primeramente se realizó una búsqueda de proteínas CDH homólogas en otros organismos ya que el genoma de *C. lindemuthianum* no se encuentra secuenciado; y a partir de ahí

se realizó el diseño de oligonucleótidos degenerados. Fijando este primer criterio, al realizar la búsqueda de CDH homólogas, en la base de datos del NCBI se encontraron reportadas cerca de 300 secuencias, por lo que se estableció otro criterio: realizar el análisis con las proteínas CDH reportadas que tuvieran una longitud de 740 a 860 aminoácidos; lo que nos permitió elegir únicamente 18 secuencias. Las secuencias restantes, cuyas longitudes iban de los 150 a 650 aminoácidos, se descartaron, pues correspondieron a una parte de la proteína. De los organismos donde se ha descrito que contienen al gen *cdh*, puede observarse una gran variedad de hábitos: *P. chrysosporium*, que degrada madera, *N. crassa*, un organismo ampliamente usado como modelo de estudio o incluso en organismos patógenos como *A. fumigatus*; lo que indica que la CDH está ampliamente distribuida en los hongos y que en cada uno de ellos pudiera tener una función biológica distinta, sin embargo, poco se conoce al respecto.

Como el porcentaje de similitud es bajo entre las CDH de ascomicetos y basidiomicetos, se decidió seguir trabajando únicamente con las proteínas de ascomicetos. Para ello se realizaron alineamientos de las secuencias de los ascomicetos; para el dominio de unión al grupo *hemo* el análisis mostró de un 33 a 66% de similitud, y de un 54 al 79% para el dominio de unión al grupo FAD. No obstante la gran similitud que mostraron los dominios de unión al grupo FAD, para el diseño de oligonucleótidos se eligió la región del dominio de unión al grupo *hemo*, ya que el primer dominio es compartido por la familia de enzimas glucosa metanol colina óxido-reductasas (GMC).

La gran divergencia que se encontró en el análisis realizado con las diferentes CDH descritas, ya había sido mostrada por Zámocký y col. (2004). En este trabajo se clasifica a las CDH descritas en dos grupos: uno corresponde a las enzimas de los basidiomicetos con relaciones filogenéticas cercanas; en un segundo grupo coloca a las CDH de los ascomicetos con una mayor divergencia. En un trabajo posterior del mismo grupo (Zámocký y col., 2008), se adiciona un tercer grupo que contiene a las enzimas de ascomicetos no caracterizadas, y de las cuales indican los autores las relaciones filogenéticas muestran un mayor alejamiento. Estos datos y los obtenidos en el análisis realizado durante este trabajo, apoyan la idea de que el estudio de las CDH, aún entre los ascomicetos, es complejo.

Cabe señalar que al realizar nuevamente una búsqueda de secuencias homólogas CDH, se ha reportado 17 secuencias más, entre las que se destaca el número de CDH de

ascomicetos, que son 14. Sin embargo, más de la mitad de las CDH reportadas son hipotéticas.

Se diseñaron nueve pares de oligonucleótidos, para los cuales se realizaron pruebas de PCR en gradiente de temperatura. Los resultados obtenidos con los primeros oligonucleótidos diseñados, en los que las bandas obtenidas no coincidían con lo esperado, o las secuencias no correspondían a las de una CDH, fueron debidos probablemente al elevado grado de degeneración de los oligonucleótidos usados para la amplificación (por arriba del 70%), además de que cuando se obtuvo la secuencia del fragmento homólogo (ver más adelante) y se realizaron nuevas comparaciones, los porcentajes de similitud entre estas secuencias y las de las CDHs de *H. insolens* o con la de *A. clavatus* mostraron poca similitud. También Kellner y col. (2010), en un estudio de la identificación de transcrito de enzimas lignocelulíticas y del gen *cdh*, indican que la detección del gen *cdh* de ascomicetos no es fácil y falla cuando los oligonucleótidos no son optimizados.

Con los pares de oligonucleótidos diseñados a partir de los genes *cdh* de *N. crassa*, denominados gen I (No. acceso NCU05923) y gen II (No. acceso NUC00206) en este trabajo, se logró amplificar un fragmento heterólogo al gen I, que se usó como control positivo (con ADN molde de *N. crassa*) y un fragmento homólogo (con ADN de *C. lindemuthianum*). Para el gen II sólo se logró una amplificación del control positivo.

Este mismo resultado se obtuvo en los ensayos de RT-PCR para amplificar los transcritos de los gen (es) *cdh*, sólo se logró identificar el transcrito del gen I de *N. crassa* y un fragmento similar en *C. lindemuthianum*, no amplificando para el gen II, aún en el control positivo. En el trabajo de Zhang y col. (2011), indican que en *N. crassa* el gen amplificado fue el gen II (NUC00206), sin embargo, se realizarán análisis posteriores para descartar que realmente se estuviera trabajando con el gen *cdh* II (NUC00206) de *N. crassa*.

Los resultados obtenidos hasta este punto, sugieren que en el genoma de *C. lindemuthianum* existe al menos una copia del gen *cdh* el cual es homólogo al gen *cdh* (NUC05923) descrito para *N. crassa*.

La secuencia del ADNc del gen *cdh* de *N. crassa* presentó un 99% de identidad con la reportada y tomada como base para su amplificación. El fragmento del gen *cdh* de *C. lindemuthianum* presentó un 87% de similitud al gen *cdh* I (NUC05923) de *N. crassa*. En conjunto, los datos obtenidos indicaron que los fragmentos que se amplificaron

correspondían a genes *cdh*. El grado de similitud mostrado por el gen *cdh* de *C. lindemuthianum* (87%) con el gen *cdh* I de *N. crassa* es de los más elevados en los diferentes análisis realizados, pues como ya se había indicado este porcentaje llegaba a niveles menores al 66%. También el análisis de la secuencia mostró que el fragmento del gen *cdh* de *C. lindemuthianum* compartía un 86% de similitud con el gen *cdh* de *S. macrospora*, 55% con el de *H. insolens*, 36% con el de *A. clavatus* y un 16% con el de *S. bisbyi*. En este análisis también se mostraron porcentajes de similitud menores al 10% con proteínas de *H. vulgare* (cebada) y de *M. musculus* (ratón). Considerando que el gen *cdh* presenta un porcentaje de similitud del 87% con el gen I de *N. crassa*, se sugiere que el gen *cdh* de *C. lindemuthianum* estaría agrupado en la clase II de los genes *cdh*, de acuerdo a lo descrito por Zámocký y col. (2008). Este análisis de secuencia para determinar el grado de similitud apoya el hecho de que el fragmento obtenido por RT-PCR pertenece al gen *cdh* de *C. lindemuthianum*.

Los dos fragmentos del gen *cdh* se usaron como sondas en análisis tipo Southern, para determinar el número de copias en el genoma de *C. lindemuthianum*; y en análisis tipo Northern para determinar el patrón de expresión de los mensajeros en micelio obtenido en condiciones de inducción. Los resultados del análisis tipo Southern sugieren que hay una doble copia del gen *cdh* en el genoma de *C. lindemuthianum*. Cabe señalar que para cada enzima usada en el análisis, una señal muestra una mayor intensidad que la otra, debido probablemente a que una de las copias de los genes *cdh* detectados, contiene secuencias idénticas a las de las sondas y las otras tienen secuencias con similitud, pero no elevada.

La existencia de varias copias del gen *cdh* lo había descrito, Zámocký y col. (2006) cuando realizó un análisis con varios genomas fúngicos. Dos copias del gen *cdh* se han reportado para los basidiomicetos *P. chrysosporium*, los cuales comparten un 98% de identidad, (Li y col., 1996) y para *P. cinnabarinus* (Moukha y col., 1999), aunque para *T. versicolor* sólo se ha descrito la presencia de una copia (Dumonceaux y col., 1998).

En el caso de los ascomicetos, los trabajos de Zámocký y col. (2011), indica la presencia de una doble copia del gen *cdh* en *N. crassa*, con una similitud menor al 60% entre ellos. Análisis del genoma de *A. fumigatus* y *G. zeae* también indican que presentan una doble copia del gen *cdh*, sin que hayan sido caracterizados hasta la fecha. En *H. insolens* y *A. nidulans* se reporta una única copia del gen *cdh*. También mediante un estudio filogenético, se reporta que algunas especies de ascomicetos parecen contener

genes que codifican para CDHs agrupados en clados diferentes, lo que indica que en general la diversidad en las secuencias CDH de ascomicetos es mucho mayor, en comparación con las de basidiomicetos (Zámocký y col., 2008; Harreither y col., 2011).

Los resultados obtenidos de los ensayos tipo Southern, no permiten concluir si las dos señales obtenidas corresponden a variantes alélicas del mismo gen o si son dos genes distintos que codifican para diferentes isoenzimas. Para conocer estas inquietudes, será necesario tener todo el marco de lectura de cada gen y realizar una serie de análisis *in silico* para obtener las respuestas.

Se considera una ventaja evolutiva el tener varias copias de un gen. También es probable que estos genes tuvieran promotores distintos, lo que les permitiría expresarse en condiciones distintas y posiblemente influiría en el desarrollo de *C. lindemuthianum*. Un ensayo preliminar de los niveles de expresión de ambos genes, con diferentes sustratos tales como celulosa, celobiosa, lactosa y glucosa a diferentes concentraciones, pudiera ayudar a elucidar el comportamiento de estos genes, mediante el análisis de los transcritos y bajo las condiciones en que preferentemente se expresan. Por otro lado, procesos de mutación pudieran llegar a afectar una de las copias del gen, pero al tener la otra, es probable que la actividad se compensara, por lo que el organismo no se afectaría. Tampoco se puede descartar la posibilidad de que alguna de las dos señales observadas en las hibridaciones tipo Southern correspondieran a un pseudogen y que la copia funcional fuera la responsable de la actividad enzimática CDH.

En *C. lindemuthianum* Calderón Oropeza en el 2009 reporta un máximo de actividad CDH a los 8 días de incubación en medio mínimo modificado. Estas condiciones experimentales fueron usadas para obtener ARN de *C. lindemuthianum* y analizar la expresión del gen *cdh*. En este análisis como control positivo de amplificación y de expresión se usó el gen *cdh1* de *N. crassa*.

El análisis de expresión del gen *cdh* bajo condiciones de inducción indicó que el transcrito es detectado al mismo tiempo que se reporta actividad de la CDH, es decir al segundo día y que este aumenta hasta llegar a un máximo al octavo día, además de que es inducible con glucosa al 5%. En este ensayo también se evaluó la expresión del gen *cdh* sin inducción, es decir con glucosa al 2%, con la que se ve una disminución del 50% con respecto a la expresión obtenida con glucosa al 5%. Sin embargo, como únicamente se obtuvo ARN del día dos sin inducción, lo conveniente es realizar toda la cinética de crecimiento, para así poder establecer que efectivamente hay una inducción en la

expresión con glucosa al 5%. Sin embargo, se determina que efectivamente uno de los genes *cdh* de *C. lindemuthianum* se expresa, por lo que se sugiere su correlación a la actividad CDH reportada (Calderón y col., 2011). Ahora bien, se maneja el término correlación de expresión del gen *cdh* y actividad específica enzimática CDH, debido a que se observa la expresión, la cual se sugiere sea la causa de la actividad enzimática. Para dejar fundamentado que efectivamente hay una relación expresión-proteína-actividad, se deben de realizar otro tipo de ensayos, como ensayos tipo Western, o bien, la caracterización de las proteínas recombinantes mediante herramientas de ingeniería genética para encontrar la causalidad de la correlación hipotetizada en este trabajo.

Al respecto, en *T. versicolor* se ha encontrado que a las 96 h el transcrito del gen *cdh* es reprimido cuando a medio de cultivo con celulosa se le adicionan galactosa, arabinosa y xilosa, resultando en una reducción de 19, 92 y 114 veces con respecto a la expresión observada cuando se crece únicamente con celulosa (Stapleton y col., 2004). En el caso del gen *cdh* de *P. cinnabarinus* es estimulado en condiciones celulolíticas, sin embargo, con celulosa, glucosa y celobiosa, los niveles de transcrito fueron poco visibles (Moukha y col., 1998). En *G. frondosa*, el transcrito fue detectado cuando el micelio es crecido en celobiosa y celulosa, sin embargo cuando se crece en glucosa, la expresión disminuye, lo que sugiere que su expresión es promovida en condiciones que favorecen la degradación de celulosa y es regulada por una represión catabólica de carbono (Yoshida y col., 2002).

El análisis tipo Northern además indicó que el tamaño del transcrito es de aproximadamente de 2500 pb (2404 pb) de acuerdo al marcador de tamaño de ARN utilizada. El tamaño se encuentra dentro del tamaño de las otras secuencias *cdh* reportadas, como las de *P. chrysosporium*, *H. insolens*, *T. versicolor* y *N. crassa*, con 2322, 2358, 2307 y 2490 pb, respectivamente, (Raíces y col., 1995; Dumonceaux y col., 1998; Xu y col., 2001; Zhang y col., 2011).

La información del tamaño del transcrito da una aproximación de cuál pudiera ser el tamaño esperado del gen *cdh*, considerando que en promedio los genes reportados de *C. lindemuthianum* presentan 3 o 4 intrones. Además, si se considera que en el caso del gen *cdh I* de *N. crassa* los intrones tienen una longitud de aproximadamente 50 pb, se puede proponer que la longitud del gen *cdh* es de entre 2600-2800 pb.

Los resultados obtenidos con el RT-PCR, avalan lo obtenido en el Northern blot: el gen *cdh* se expresa y aumentan sus niveles de expresión hasta llegar a un máximo al octavo día, después de lo cual, y guiándonos por los resultados obtenidos tanto de

expresión del gen, como de actividad de la CDH, se puede sugerir que al décimo día, la expresión se vería disminuida. El análisis al décimo día no se pudo llevar a cabo debido a que las muestras de ARN se degradaban constantemente. Posiblemente esto se deba a que se estaba trabajando con muestras de micelio que ya se consideran viejas y contenían gran cantidad de proteínas, lípidos y otras moléculas que estuvieron interfiriendo con la extracción del ARN.

Es interesante señalar que el gen *cdh* de *C. lindemuthianum* es inducido con glucosa, a diferencia de organismos como *M. thermophila*, *T. versicolor* y *C. puteana* donde es inducido principalmente por celobiosa y en menor cantidad por glucosa y otros oligosacáridos (Dumonceaux y col., 1998; Subramain y col., 1998; Kajisa y col., 2004). En *P. chrysosporium* y *G. frondosa* donde la inducción se da en condiciones celulolíticas (Li y col., 1996; Yoshida y col., 2002), lo cual pudiera sugerir una función distinta en este organismo con respecto a los demás, por lo cual, para determinar cuál es la función de la CDH en *C. lindemuthianum* se requieren estudios adicionales. Sin embargo, en cuanto al enfoque biotecnológico esto representa una ventaja para su producción, ya que la glucosa es una molécula más fácilmente procesable que la celulosa o la lignina, por lo que esta característica le da una ventaja en el manejo del cultivo fúngico sobre las ya reportadas.

Desafortunadamente no se logró obtener la secuencia completa del gen *cdh* de *C. lindemuthianum*, por lo que el siguiente paso es obtener el gen completo. Se ha iniciado la estrategia experimental para obtener un fragmento mayor, si no es que la secuencia total del gen *cdh*, para ello se ha construido un minibanco y se han analizado cerca de 200 clonas dentro de las cuales no se encuentra el fragmento esperado. Esto posiblemente se deba a que los fragmentos de ADN que se están ligando son tantos, que la probabilidad de encontrar el gen de interés se ve reducida.

Los resultados de este trabajo demuestran la identificación del gen *cdh* y su expresión correlacionada con la actividad enzimática de la CDH de *C. lindemuthianum* reportada por nuestro grupo de trabajo. Además, los datos sugieren la presencia de una doble copia del gen *cdh*, al igual que en otros ascomicetos. Por otra parte, para determinar la presencia del gen *cdh* en *C. lindemuthianum*, queda como perspectiva obtener la o las secuencias completas de las dos copias del gen *cdh* encontradas, para su posterior caracterización molecular y funcional y determinar si es la causa de la actividad enzimática de CDH.

IX. CONCLUSIÓN

El gen *cdh* está presente en el genoma de *C. lindemuthianum* y su expresión correlaciona con la actividad tipo CDH reportada.

X. PERSPECTIVAS

Se ha iniciado la construcción de un minibanco de ADN de *C. lindemuthianum* para el aislamiento total del (los) gen(es) *cdh*.

XI. REFERENCIAS

- ~ Ander P. 1994. The cellobiose-oxidizing enzymes CBQ and CBO as related to lignin and cellulose degradation – a review. *FEMS Microbiology Reviews*. 13: 297-312.
- ~ Anderson A.J. 1978. Extracellular enzymes produced by *Colletotrichum lindemuthianum* and *Helminthosporium maydis* during growth on isolated bean and corn walls. *Phytopathology*. 68: 1585-1590.
- ~ Anderson D.W., Nicholson R.L. 1996. Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Mycology*. 88: 996-1002.
- ~ Baminger U., Subramaniam S.S., Renganathan V., Haltrich D. 2001. Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase from the plant pathogen *Sclerotium (Athelia) rolfsii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 1766-1774.
- ~ Bao W., Lyman E., Renganathan V. 1994. Optimization of cellobiose dehydrogenase and β -glucosidase production by cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 42: 642–646.
- ~ Bao W., Usha S.N., Renganathan V. 1993. Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel extracellular hemoflavoenzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 300: 705–713.
- ~ Bartnicki G.S., Nickerson W.J. 1962. Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *Journal of Bacteriology*. 84: 841-858.
- ~ Bentley R. 1963. Glucose oxidase. In the enzymes, 2da. ed., Editores Boyer P. D., Lardy H., Myrback K. Academic Press: New York, capítulo 24, pag 567-586.
- ~ Berkessel A., M. Dousset S. B., K. Glaubitz. 2005. Combinatorial approaches to functional models for galactose oxidase. *Biol. Chem*. 386: 1035-1041.
- ~ Bimboim H.C. y Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 7: 1513-1523.
- ~ Calderón Oropeza M. A. 2009. Caracterización parcial de la celobiosa deshidrogenasa de *Colletotrichum lindemuthianum*. Tesis de maestría. Instituto de

- Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- ~ Calderón Oropeza M.A., Mendoza M.R., Reyna L.G., Santoyo G., Flores G.A., Martínez P.M. 2011. African Journal of Microbiology Research. 5: 3487-3492.
 - ~ Cameron M.D., Aust S. D. 2001. Cellobiose dehydrogenase—an extracellular fungal flavocytochrome. Enzyme and Microbial Technology. 28: 129–138.
 - ~ Centis S., Dumas B., Fournier J., Marolda M., Esquerré M.T. 1996. Isolation and sequence analysis of CLPG1, a gene coding for an endopolygalacturonase of the phytopathogenic *Colletotrichum lindemuthianum*. Gene. 170: 125-129.
 - ~ Centis S., Guillas I., Séjalon N., Esquerré M.T., Dumas B. 1997. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of CLPG2 and comparison of its expression to that of CLPG1 during saprophytic and parasitic growth of the fungus. The American Phytopathological Society. 6: 769-775.
 - ~ Chomczynski P. y Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156-159.
 - ~ Ciullini I., Tilli S., Scozzafava A., Briganti F. 2008. Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: Combined actions for the decolorization of different clases of textil dyes. Bioresource Technology. 99: 7003-7010.
 - ~ Cohen J.D., Bao W., Renganathan V., Subramaniam S.S., Loehr T.M. 1997. Resonance Raman spectroscopic studies of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 341: 321–328.
 - ~ Coirentin H., Jacquet C., Borel C., Esquerre M.T., Dumas B. 2002. A cis-acting sequence homologous to the yeast filamentation and invasion response element regulates expression of a pectinase gene from the bean pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. The Journal of Biological Chemistry. 277: 29125-31.
 - ~ Coudray M.R., Canevascini G., Meier H. 1982. Characterization of a cellobiose dehydrogenase on the cellulolytic fungus *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*. Biochemical Journal. 209 : 277-284.

- ~ Cox M.C., Rogers M.C., Cheesman M., Jones G.D. Thomson A.J., Wilson M.T., Moore G.R. 1992. Spectroscopic identification of the haem ligands of cellobiose oxidase. *FEBS Letters*. 307: 233–236.
- ~ De Luca N.G. y Wood P.M. 2000. Iron uptake by fungi: Contrasted mechanisms with internal or external reduction. *Advances in Microbial Physiology*. 43: 39-74.
- ~ Dekker R.F.H. 1980. Induction and characterization of a cellobiose dehydrogenase produced by a species of *Monilia*. *J. Gen. Microbiol.* 120: 309–316.
- ~ Dekker R.H.F., 1988. Cellobiose dehydrogenase produced by *Monilia* sp. *Methods Enzymol.* V. 160: 454 – 463.
- ~ Demarche P., Junghanns C., Nair R., Aghatos N. 2011. Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. *Biotechnol. Adv.* doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.013.
- ~ Dickman M.B., Patil S.S. 1986. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporoides* are nonpathogenic to papaya fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 28: 235-243.
- ~ Dufresne M., Bailey J. A., Dron M., Langin T. 1998. *ck1*, a serine/threonine protein kinase-encoding gene, is involved in pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2: 99-108.
- ~ Dufresne M., Perfect S., Pellier A.L., Bailey J.A., Langin T. 2000. A GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *The Plant Cell*. 12: 1579-1589.
- ~ Dumas B., Borel C., Hebert C., Maury J., Jaquet C., Balsse R., Esquerre M.T. 2001. Molecular characterization of CIPT1, a SEc-4 like Rab/GTPase of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum* which is regulated by the carbon source. *Gene*. 272: 219-225.
- ~ Dumonceaux T.J., Bartholomew K.A., Charles T.C., Moukha S.M., Archibald F.S. 1998. Cloning and sequencing of a gene encoding cellobiose dehydrogenase from *Trametes versicolor*. *Gene*. 210: 211-219.

- ~ Elmgren M., Lindquist S.E., Henriksson G. 1992. Cellobiose oxidase crosslinked in a redox polymer matrix at an electrode surface--a new biosensor. *J. Electroanal. Chem.* 341: 257-273.
- ~ Eriksson K.E., Habu N., Samejima M. 1993. Recent advances in fungal cellobiose oxidoreductases. *Enzyme and Microbial Technology.* 15: 1002-1008.
- ~ Flores García A. 2004. Capacidad celulolítica de *Colletotrichum lindemuthianum* en la fase saprofítica. Tesis de maestría en ciencias. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- ~ García S.M., Alfaro L.E., Rodríguez G.R., Simpson J. 2008. Analysis of the *MAT1-2-1* gene of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mycoscience.* 49: 312-317.
- ~ Ghahfarokhi M.S., Fazli A., Lotfi A., Abyaneh B.R. 2004. Cellobiose dehydrogenase production by the genus *Cladosporium*. *Iranian Biomedical Journal.* 8: 107-111.
- ~ Habu N., Igarashi K., Samejima M., Pettersson B., Eriksson K.E. 1997. Enhanced production of cellobiose dehydrogenase in cultures of *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with bovine calf serum. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 26: 97-102.
- ~ Harreither W., Sygmund C., Augustin M., Narciso M., Rabinovich M.L., Gorton L., Haltrich D., Ludwig R. 2011. Catalytic Properties and classification of cellobiose dehydrogenase from ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology.* 77: 1804-1815.
- ~ Henriksson G., Pettersson G., Johanson G., Ruiz A., Uzcategui E. 1991. Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* can be cleaved by papain into two domains. *European Journal of Biochemistry.* 196: 101-106.
- ~ Henriksson G. 1995. Structure, function and applications of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. Ph.D. Dissertation, Uppsala University, Sweden. Almquist and Wiksell International, Stockholm, Sweden ISBN 91-554-3503-3.
- ~ Henriksson G., Ander P., Pettersson B., Pettersson G. 1995. Cellobiose dehydrogenase (Cellobiose oxidase) as wood degrading enzymes. Studies on cellulose, xylan and synthetic lignin. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 42: 790-796.

- ~ Henriksson G., Johansson G., Petersson G. 2000. A critical review of cellobiose dehydrogenases. *Journal of Biotechnology*. 78: 93-113.
- ~ Hyde S.M., Wood P.M. 1997. A mechanism for production of hydroxylradicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe (III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe (II) oxidation at a distance from the hyphae. *Microbiology* 143: 259–266.
- ~ Igarashi K., Verhagen M.F., Samejima M., Schülein M., Eriksson K.E., Nishino T. 1999. Cellobiose dehydrogenase from the fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Humicola insolens*. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 3338–3344.
- ~ Janse B.J.H., Gaskell J., Akhtar M., Cullen D. 1998. Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases, and glyoxal oxidase in wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3536-3538.
- ~ Kajisa T., Yoshida M., Igarashi K., Katayama A., Nishino T., Samejima M. 2004. Characterization and molecular cloning of cellobiose dehydrogenase from the Brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 98: 57-63.
- ~ Karapetyana K.N., Fedorova T.V., Vasil'chenko L.G., Ludwig R., Haltrich D., Rabinovich M.L. 2006. Properties of neutral cellobiose dehydrogenase from the ascomycete *Chaetomium* sp. INBI 2-26(-) and comparison with basidiomycetous cellobiose dehydrogenases. *Journal of Biotechnology*. 121: 34–48.
- ~ Kellner H., Vandenbol M. 2010. Fungi unearthed: transcripts encoding lignocellulolytic and chitinolytic enzymes in forest soil. *PLoS One*. 5: e10971
- ~ Keon J.P., Wadsmann G., Bailey J.A. 1990. A comparative of the biochemical and physiological properties of polygalacturonase from two races of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 37: 193-199.
- ~ Kersten P.J. y Kirk T.K. 1987. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169: 2195-2201.
- ~ Kremer S.M., Wood P.M. 1992. Production of Fenton's reagent by cellobiose oxidase from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *European Journal of Biochemistry*. 208: 809-815.
- ~ Kremer S.M., Wood P.M. 1992. Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an iron (III) reductase: kinetic

- comparison with neutrophil NADPH oxidase and yeast flavocytochrome *b2*. European Journal of Biochemistry. 205: 133–138.
- ~ Leuthner B., Aichinger C., Oehmen E., Koopmann E., Müller O., Müller P., Kahmann R., Bölker M., Schreier P.H. 2005. A H₂O₂-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. Mol. Genet. Genomics 272: 639-650.
 - ~ Li B., Nagalla S.R., Renganathan V. 1996. Cloning of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase, a hemoflavoenzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology. 62: 1329–35.
 - ~ Li B., Nagalla S.R., Renganathan V. 1997. Cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* is encoded by two allelic variants. Appl. Environ. Microbiol. 63: 796–799.
 - ~ Linder M., Teeri T. 1997. The roles and function of cellulose-binding domains. Journal of Biotechnology. 57: 15-28.
 - ~ Lindgren A., Stoica L., Ruzgas T., Ciucu A., Gorton L. 1999. Cellobiose Dehydrogenase and Peroxidase Biosensors for Determination of Phenolic Compounds. Analyst, 124: 527-532.
 - ~ Ludwig R., Haltrich D. 2003. Optimisation of cellobiose dehydrogenase production by the fungus *Sclerotium (Athelia) rolfsii*. Applied Microbiology and Biotechnology. 61: 32-39.
 - ~ Martínez M.M., Saucedo L.J., Flores G.A., Martínez R.E., Campos G.J. 2009. *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. Is a potencial cellulases producer microorganism. Revista Latinoamericana de Microbiología. 51: 23-31.
 - ~ Morpeth F. 1991. Cellobiose oxidoreductases. F. Müller ed. Chemistry and biochemistry of flavoenzymes. CRC Press, Boca Raton, Fla. p. 337–348.
 - ~ Moukha S.M., Dumonceaux T.J., Record E., Archibald F.S. 1999. Cloning and analysis of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase. Gene. 234: 23-33.
 - ~ Nouaille R., Matuloya M., Pätöprstý V., Delort A.M., Forano E. 2009. Production of oligosaccharides and cellobionic acid by *Fibrobacter succinogenes* s85 growing on sugars, cellulose and wheat straw. Appl. Microbiol. Biotechnol. 83: 425-433.
 - ~ Nutt A., Salumets A., Henriksson G., Sild V., Johansson G. 1997. Conversion of oxygen species by cellobiose dehydrogenase (cellobiose oxidase) and glucose oxidase a comparison. Biotechnol. Lett. 19 (4): 379–383.

- ~ O 'Connell R.J., Pain N.A., Hutchinson K.A., Jones G.L., Green J.R. 1996. Ultrastructure and composition of the cells surfaces of infection structures formed by the fungal plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. Journal of Microscopy. 181: 204-212.
- ~ O'Sullivan D., Tosi P., Creusot F., Cooke B.M., Phan T.H., Dron M., Langin T. 1998. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Current Genetic. 33: 291-298.
- ~ Paritson D., Dufresne M., Veneault C., Laugé R., Langin T. 2002. *clap1*, a gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of infection by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Mol Genet Genomics. 268: 139-151.
- ~ Pellier A.L., Laugé R., Veneault C., Langin T. 2003. CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. Molecular Microbiology. 48: 639-655.
- ~ Perfect S.E., O'connell R.J., Green E.F., Doering-Saad C., Green J.R. 1998. Expression cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to the biotrophic interface formed in the *Colletotrichum* bean interaction. Plant Journal. 15: 273-279.
- ~ Raices M., Paifer E., Cremata J., Montesino R., Stahlberg J., Divne C., Szabo I.J., Henriksson G., Johansson G., Pettersson G. 1995. Cloning and characterization of a cDNA encoding a cellobiose dehydrogenase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Letters. 369: 233-238.
- ~ Reader U., Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Applied Microbiology. 1: 17-20.
- ~ Renganathan V., Bao W. 1994. Cellobiose dehydrogenase. American Chemical Society Symposium Series. 566: 179-187.
- ~ Roy B.P., Paice M.G., Archibald F.S., Misra S.K., Misiak L.E. 1994. Creation of metal-complexing agents, reduction of manganese dioxide, and promotion of manganese peroxidase-mediated Mn(III) production by cellobiose: quinone oxidoreductase from *Trametes versicolor*. Journal of Biological Chemistry. 269: 19745-19750.

- ~ Roy B.P., Dumonceaux T., Koukoulas A.A., Archibald F.S. 1996. Purification and characterization of cellobiose dehydrogenases from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4417-4427.
- ~ Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. 1V.
- ~ Samejima M., Eriksson K.E.L. 1992. A comparison of the catalytic properties of cellobiose:quinine oxidoreductase and cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *European Journal of Biochemistry*. 207: 103-107.
- ~ Schou C, Schülein M., Vollmond T. 1994. A novel cellobiose oxidase, an enzymatic agent and a process for treating paper pulp. *PCT International patent WO 94/01538 A1*.
- ~ Shou C., Christensen M.H., Schülein M. 1998. Characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Humicola insolens*. *Biochemical Journal*. 330: 565-571.
- ~ Shrestha B., Blondeau K., Stevens W.F., Hegarat F.L. 2004. Expression of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein Expression and Purification*. 38:196-204.
- ~ Stapleton P.C., O'Mahony J., Dobson A.D.W. 2004. Real-time PCR analysis on carbon catabolite repression of cellobiose dehydrogenase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Can. J. Microbiol.* 50: 113-119.
- ~ Sthal D.J., Shafer W. 1992. Cutinase is not required for fungal pathogenicity on pea. *The Plant Cell*. 4: 621-625.
- ~ Subramaniam S.S., Nagalla S.R., Renganathan V. 1998. Cloning and characterization of a thermostable cellobiose dehydrogenase from *Sporotrichum thermophile*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 365: 223-230.
- ~ Templeton M.D., Rikkerink E.H.A., Solon S.I., Crowhurst R.N. 1992. The cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene*. 122: 225-230.
- ~ Temp U., Eggert C. 1999. Novel Interaction between Laccase and Cellobiose Dehydrogenase during Pigment Synthesis in the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 389-395.

- ~ Tsigos T.Y., Bouriotis V. 1995. Purification and characterization of chitin desacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. Journal of Biological Chemistry. 270: 26286-26291.
- ~ Wattard C., Dobir D., Dinooor A., Prusky D. 1997. Pectate lyase of *Colletotrichum gloeosporoides* attacking avocado fruit: cloning and involvement in pathogenicity. Physiological and Molecular Plant Pathology. 50: 197-212.
- ~ Westermark U., Eriksson K.E. 1974. Cellobiose:quinine oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi. Acta Chemica Scandinavica. 28: 209-214.
- ~ Wijesundera R.L.C., Bailey J.A., Byrde R.J., Fielding A.H. 1989. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: Their role in the development of bean anthracnose. Physiological and Molecular Plant Pathology. 34 : 403-413.
- ~ Wilson M., Hogg N., Jones G. 1990. Reactions of reduced cellobiose oxidase with oxygen. Is cellobiose oxidase primarily an oxidase? Biochem. J. 270: 265-267.
- ~ Wong Sak Hoi J., Herbert C., Bacha N., O'Connell R., Lafitte C., Borderies G., Rossignol M., Rougé P., Dumas B. 2007. Regulation and role of a STE12-like transcription factor from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. Molecular Microbiology. 64 : 68-82.
- ~ Xu F., Wagner P. 1999. Methods for using dehydrogenases in baking. PCT International patent WO99/57986.
- ~ Xu F., Golightly E.J., Duke K.R., Lassen S.F., Knusen B., Christensen S., Brown K., Brown S.H., Schulein M. 2001. *Humicola insolens* cellobiose dehydrogenase: cloning, redox chemistry, and "logic gate"-like dual functionality. Enzyme and Microbial Technology. 28: 744-753.
- ~ Xu F. 2005. Applications of oxidoreductases: Recent Progress. Industrial Biotechnology. 8: 38-50.
- ~ Yoshida M., Igarashi K., Kawai R., Aida K., Samejima M. 2004. Differential transcription of β -glucosidase and cellobiose dehydrogenase genes in cellulose degradation by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiology Letters, 235: 177-182.
- ~ Yoshida M., Ohira T., Igarashi K., Nagasawa H., Samejima M. 2002. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase from

- the wood-rotting fungus *Grifola frondosa*. FEMS Microbiology Letters. 217: 225–230.
- ~ Zámocký M., Hallberg M., Roland L., Divne C., Haltrich D. 2004. Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenase reflects a specific evolution of GMC oxidoreductases in fungi. Gene. 338: 1-14.
 - ~ Zámocký M., Ludwig R., Peterbauer C., Hallberg B. M., Divne C., Nicholls P., Haltrich D. 2006. Cellobiose dehydrogenase: A flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotrophic fungi. Current Protein and Peptide Science. 7: 255-280.
 - ~ Zámocký M., Schumann C., Sygmund C., O'Callaghan J., Dobson A.D.W., Ludwig R., Haltrich D., Peterbauer K. 2008. Cloning, sequence analysis and heterologous expression in *Pichia pastoris* of a gene encoding a thermostable cellobiose dehydrogenase from *Myriococcum thermophilum*. Protein Expression and Purification. 59: 258-265.
 - ~ Zhang R., Fan Z., Kasuga T. 2011. Expression of cellobiose dehydrogenase from *Neurospora crassa* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. Protein Expression and Purification. 75: 63-69.

PAGINAS ELECTRÓNICAS CONSULTADAS

- ~ Fungal Genetic Stock Center. Fecha de consulta: 4 de octubre del 2010. www.fgsc.net
- ~ Nomenclature of EC 1 Oxidoreductases. Fecha de consulta: 12 de febrero del 2010. <http://enzymes.me.uk/enzyme/ec>