



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

OFICIO: ITV/DEPI/No.110/2020

A QUIEN CORRESPONDA PRESENTE

Por medio de la presente el que suscribe Dr. Benigno Ortiz Muñiz, Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Veracruz me permito hacer **CONSTAR** que, de acuerdo a los archivos de esta División de Estudios, el (la) **Dra. Carolina Peña Montes** fungió como **Director(a)** de la Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada: **"Clonación y expresión de una cutinasa fúngica"** desarrollada por el (la) **C. Laura del Carmen Vázquez Alcántara**, número de control **M16020030**.

Se extiende la presente a la Ciudad de Veracruz, Veracruz a los cinco días del mes de marzo del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Antorcha y Luz de Fuego Permanentes




BENIGNO ORTIZ MUÑIZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

~~C/c. Archivo~~





Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Veracruz

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE CUTINASAS

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.B. Laura del Carmen Vázquez Alcántara

Asesores:

Dra. Carolina Peña Montes

Dra. Rosa maría Oliart Ros

Dr. Vladimir Sánchez López

Veracruz Ver.

Agosto 2018

INDICE	Pag
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Organismos productores de cutinasas	2
2.2 Identificación molecular de hongos fitopatógenos.....	3
2.1.2 <i>Moniliophthora roreri</i>	4
2.1.2 <i>Alternaria Alternata</i>	5
2.2 Cutícula de las plantas.....	5
2.3 Estructura y mecanismo catalítico de las cutinasas.....	7
2.4 Aplicaciones de cutinasas.....	8
2.5 Sistema de expresión.....	9
2.6 Vectores	11
2.6.1 Vector pPICZalfa.....	11
2.6.2 Vector pJET1.2/blunt	12
2.6.3 Vector pET-22.....	13
2.7 Métodos de transformación	15
3. Justificación.....	16
4. Hipótesis	16
5. Objetivos.....	17
5.1 Objetivos generales.....	17
5.2 Objetivos específicos.....	17
6. Metodología.....	18
6.1 Análisis bioinformático	18
6.1.1 Obtención de secuencias de genes de cutinasas de <i>M. roreri</i> y <i>A. alternata</i>	18
6.1.2 Árbol filogenético de cutinasas de <i>M. roreri</i> , <i>A. alternata</i>	18
6.1.3 Análisis bioinformático de genes putativos de cutinasas	18
6.1.4 Diseño y elaboración de cebadores	18
6.2 Obtención del gen de cutinasa	19
6.2.1 Obtención de micelio de <i>M. roreri</i> y de <i>A. alternata</i>	19
6.2.2 Extracción de ARN.....	19

6.2.3 Electroforesis de ARN.....	20
6.2.4 Síntesis de cDNA.....	20
6.2.5 Amplificación por PCR.....	20
6.2.6 Purificación y secuenciación de productos de PCR	21
6.3 Clonación del gen de cutinasa.....	21
6.3.1 Extracción del plásmido	21
6.3.2 Construcción de plásmido pJETCUT	22
6.3.3 Construcción de plásmido pPICZCUT	22
6.3.4 Construcción de plásmido pET-22(+).....	23
6.3.5 Preparación de células competentes	23
6.3.6 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α	23
6.3.7 Selección de colonias	24
6.3.8 PCR de colonia	24
6.3.9 Extracción de plásmido PET22	24
6.3.10 Transformación de <i>E. coli</i> BL21 con el plásmido PET22	24
6.4 Análisis de proteínas.....	24
6.4.1 Crecimiento de la clona BL21 con PET22CUT1M.....	24
6.4.2 Inducción de la enzima CUT1M con IPTG	24
6.4.3 Prueba cualitativa de actividad.....	25
6.4.3 Medición de actividad	25
6.4.4 Medición de proteína.....	25
6.5 Electroforesis	25
6.5.1 Perfil electroforético	25
6.5.2 Zimograma (actividad “in situ”).....	26
6.6 Obtención de enzima pura.....	26
6.6.1 Concentración de enzima.....	26
6.6.2 Purificación de la enzima	26
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1 Análisis bioinformático	28
7.1.1 Obtención de secuencias de cutinasas de <i>M. royeri</i> y <i>A. alternata</i>	28
7.1.2 Árbol filogenético de genes de cutinasas.....	34
7.1.3 Análisis bioinformático de genes de cutinasas.....	36

7.1.4	Análisis de restricción de genes	40
7.1.5	Análisis de cebadores	40
7.2	Aislamiento del gen de cutinasa	41
7.2.1	Extracción de cutícula de manzana	41
7.2.2	Extracción de ARN	41
7.2.3	Amplificación de los genes por PCR	42
7.2.4	Secuenciación de genes	43
7.3	Clonación de genes de cutinasas	45
7.3.1	Clonación de genes de cutinasas en el vector de clonación pJET	45
7.3.2	Clonación de genes de cutinasas en el vector pPICZ	46
7.3.3	Clonación del gen de cutinasa en el vector pET-22	48
<u>7.4</u>	<u>Expresión de la enzima CUT1MR</u>	<u>49</u>
<u>7.4.1</u>	<u>Análisis de proteínas</u>	<u>50</u>
<u>7.4.1.1</u>	<u>Perfiles de proteínas en gel de SDS-PAGE</u>	<u>50</u>
<u>7.4.1.2</u>	<u>Actividad “in situ”</u>	<u>51</u>
<u>7.4.1.3</u>	<u>Identificación de MRCUT1 con Western Blot</u>	<u>51</u>
<u>7.5</u>	<u>Purificación de MRCUT1</u>	<u>52</u>
7.6	Conclusiones	53
7.7	APENDICES	59
	APENDICE A	59
	APENDICE B	60
	APENDICE C	63
	APENDICE D	64

INDICE DE IMÁGENES

figura 1. Penetración y colonización de <i>m. roreri</i>	5
figura 3. Unidad básica de la estructura de la cutina.....	7
figura 4. Mecanismo catalítico de las serín-hidrolasas.....	8
figura 6. Vector ppicz α a, b y c.....	12
figura 8. Vector pet-22b(+)	14
figura 11. Árbol filogenético de genes cutinasas de <i>m. roreri</i> y <i>a. alternata</i>	35
figura 12. Alineamiento de secuencia de dna y rna de la cut1 de <i>a. alternata</i>	37
figura 14. Alineamiento de secuencia de dna y rna de la cuti3 de <i>a. alternata</i>	38
figura 16. Alineamiento de secuencia de dna y rna de la cutinas 2 de <i>m. roreri</i>	39
figura 18. ARN de hongos fitopatógenos.....	42
figura 20. Vector pjet1.2	46
figura 22. PCR de colonias.....	48
figura 24. Actividad cualitativa.....	50
figura 26. Geles de poliacrilamida.....	51
figura 27. Western blot	52

INDICE DE TABLAS

tabla 1. Microorganismos productores de cutinasas.....	3
tabla 2. Características generales de los métodos de transformación de <i>P. pastoris</i>	15
tabla 3. Resultados del análisis de genes.....	36
tabla 4. Resultados del análisis de cebadores.....	40
tabla 5. Resultado de alineamiento de las secuencias de <i>M. roreri</i> y <i>A. alternata</i>	44

1. INTRODUCCIÓN

Las cutinasas (EC. 3.1.1.74) son enzimas que llevan a cabo la hidrólisis del polímero lipídico llamado cutina, el cual es un componente estructural de las plantas.

Estas enzimas son clasificadas como hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos (Carvalho *et al.*, 1998). Son enzimas producidas por bacterias como *Bacillus subtilis*, *Citrobacter*, *Enterobacter* levaduras como *Candida tropicalis*) y hongos fitopatógenos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Moniliophthora* (Basurto *et al.*, 2010; Panizo *et al.*, 2005; Akira Yoshimi *et al.*, 2016).

Cada microorganismo presenta en su genoma diferentes genes de cutinasas. *Fusarium solani* presenta 2 genes de cutinasas, *Monilia fructicola* tiene 4 genes de cutinasas), *Penicillium citrinum* contiene un gen y *M. roreri* presenta tres cutinasas putativas en su genoma (Lin y kolattukudy 1980; Lee *et al.*, 2010; Liebminger *et al.*, 2007). También se ha encontrado que *Aspergillus nidulans* presenta 4 cutinasas en el genoma, sin embargo sólo se ha visto la expresión de 2 cutinasas; ANCUT1 la cual presenta actividad de esterasa y ANCUT2 que presenta actividad de esterasa y cutinasa (Castro-Ochoa *et al.*, 2012).

M. roreri es un hongo fitopatógeno el cual ataca al cultivo de cacao provocando la enfermedad de moniliasis, este microorganismo cuenta con dos formas de ataque, por medio de esporas, al llegar al fruto para contaminarlo (biotrófica) y cuando se encuentra dentro del fruto secreta varias enzimas y toxinas, las cuales se degradan el tejido y causan la necrosis del fruto (hemibiotrófica). Recientemente se ha reportado al parecer la expresión de una esterasa en un medio con cutícula de cacao como inductor. Es importante mencionar que en su genoma, *M. roreri* contiene tres cutinasas. (Torres-Palacios C. *et al.*, 2016).

Las cutinasas tienen diferentes aplicaciones en la industria de alimentos entre las más importantes están la industria de aceites, grasas y de agentes saborizantes y aromatizantes. Además, se han usado en otras industrias como en la de detergentes y peletería. También se ha visto que pueden ser útiles para la degradación de compuestos contaminantes como PET y pesticidas (Castro *et al.*, 2010). Debido a lo anterior, se ha optado por expresar estas enzimas en hospederos heterólogos los cual ayudará a obtener una mayor cantidad de enzima en condiciones más

controladas. El sistema de expresión de las proteínas recombinantes depende de las propiedades de la proteína para poder seleccionar un hospedero adecuado.

Uno de los sistemas eucariontes más utilizados es *P. pastoris*, una levadura unicelular de crecimiento rápido y cultivo fácil. *P. pastoris* tiene ventajas sobre otros hospederos ya que puede procesar y plegar las proteínas adecuadamente, además los costos de producción son menores comparados con otros sistemas de expresión. Esta levadura es metilotrófica, es decir es capaz de metabolizar metanol como única fuente de carbono, *P. pastoris* oxida el metanol a formaldehído y genera peróxido de hidrógeno. La enzima alcohol oxidasa muestra una baja afinidad por el oxígeno y genera grandes cantidades de enzima. Esta levadura presenta dos genes de alcohol oxidasa AOX1 y AOX2 (Cereghino y Cregg, 2000).

Otro sistema, ampliamente utilizado es la bacteria *Escherichia coli*, del cual existen varios vectores que por ejemplo permiten expresar la enzima recombinante en el periplasma utilizando IPTG como inductor.

Dadas las aplicaciones e importancia de las cutinasas el propósito general del presente trabajo es expresar en un sistema heterólogo y caracterizar la cutinasa recombinante del hongo fitopatógeno *M. royeri*.

2. ANTECEDENTES

Las cutinasas (EC. 3.1.1.74) son proteínas pertenecientes al grupo de las hidrolasas, este tipo de enzimas pueden degradar la cutina que de forma natural, el cual es un polímero natural que se encuentra en las plantas que le sirve como una barrera de protección contra los organismos patógenos (Castro-Ochoa et al., 2010; Purdy y Kolattukudy, 1975).

2.1 Organismos productores de cutinasas

Las cutinasas fueron descritas por primera vez en hongos patógenos, uno de los más estudiadas es la de *Fusarium*, se han encontrado recientemente también en bacterias y levaduras (Dutta et al., 2009). En el 2012 Torres y Ramírez estudiaron la presencia de enzimas con actividad de esterasa en condiciones de inducción con cutina de cacao, se describe la presencia de una enzima con actividad de esterasa

que pudiera ser una cutinasa, sin embargo, la enzima no fue identificada ni se evaluó la actividad sobre cutina. En 1988 Kentaro Tanabe, estudiaron la actividad de una cutinasa de *Alternaria alternata* en la patogenicidad de la pera.

Tabla 1. Microorganismos productores de cutinasas.

Organismos	Cutinastas putativas	Referencia
Hongos		
<i>Aspergillus nidulans</i>	4	Castro-Ochoa <i>et al.</i> (2012)
<i>Fusarium solani pisi,</i>	2	Lin and Kolattukudy (1980)
<i>Fusarium oxysporum,</i>	1	Purdy y Kolattukudy (1975)
<i>Alternaria brassicicola</i>	4	Koschorreck <i>et al.</i> (2013)
<i>Penicillium citrinum</i>	1	Liebminger <i>et al</i> (2007)
<i>Aspergillus oryzae</i>	2	Liu <i>et al.</i> (2009)
Bacteria		
<i>Streptomyces scabies</i>	1	Lin and Kolattukudy (1980)
<i>Thermobifida fusca</i>	2	Chen <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudomonas mendocina</i>	2	Sebastian <i>et al.</i> (1987)
Levadura		
<i>Cryptococcus sp.</i>	1	Masala <i>et al</i> (2005)

2.2 Identificación molecular de hongos fitopatógenos

Para la identificación de los aislamientos de hongos fitopatógenos productores de cutinasas como *Moniliophthora roreri*, *Alternaria alternata* y *Colletotrichum* se han utilizado métodos moleculares tales como RFLP (Polimorfismo de longitud fragmentos de restricción), RAPD (polimorfismo de ADN amplificado al azar) y AFLP (Amplificación de fragmentos de longitud polimórficos) (Vos et al., 1995). Así mismo se puede identificar por análisis de secuencias del ADN que incluye los genes:

región espaciadora transcritora interna (ITS), espaciador intergénico (IGS), factor de elongación 1-a (*tef1*), actina (*act*) y calmodulina (*cal*) (Bachmann 1994).

2.1.2 *Moniliophthora roreri*

M. roreri es un hongo fitopatógeno el cual es el causante de moniliasis del cacao, es un hongo de la clase Basidiomiceto y del orden Moniliales, su reproducción se realiza solo asexualmente por conidios (Evans *et al.*, 2003). Este microorganismo ha sido encontrado infectando los frutos de los géneros *Theobroma* y *Herrania*.

Es un hongo hemibiotrófico el cual empieza cuando los conidios de *M. roreri* llegan a la superficie de las mazorcas, ahí germinan y penetran la mazorca directamente desde la epidermis, causando daños internos en las primeras etapas de la enfermedad (biotrofismo), esta esta es seguida por la segregación de toxinas, enzimas y factores de necrosis, estos se encargan de matar a la planta para que el hongo obtenga sus nutrientes por absorción (hemibiotrofico) (Torto-Alalibo, 2009 y Tiburcio *et al.*, 2010).

Las enzimas que participan en esta etapa son quitinasas, quitosanasas, glucanasas, proteasas, lipasas y cutinasas (Torres y Ramírez., 2016). Estas enzimas en conjunto degradan la pared celular atacando la cutícula de las plantas.

Moniliphthora roreri en su genoma cuenta con tres secuencias de cutinasas putativas, las cuales hasta el momento solo una parecer ser expresada en medio inductor con cacao (Torres y Ramírez., 2016).

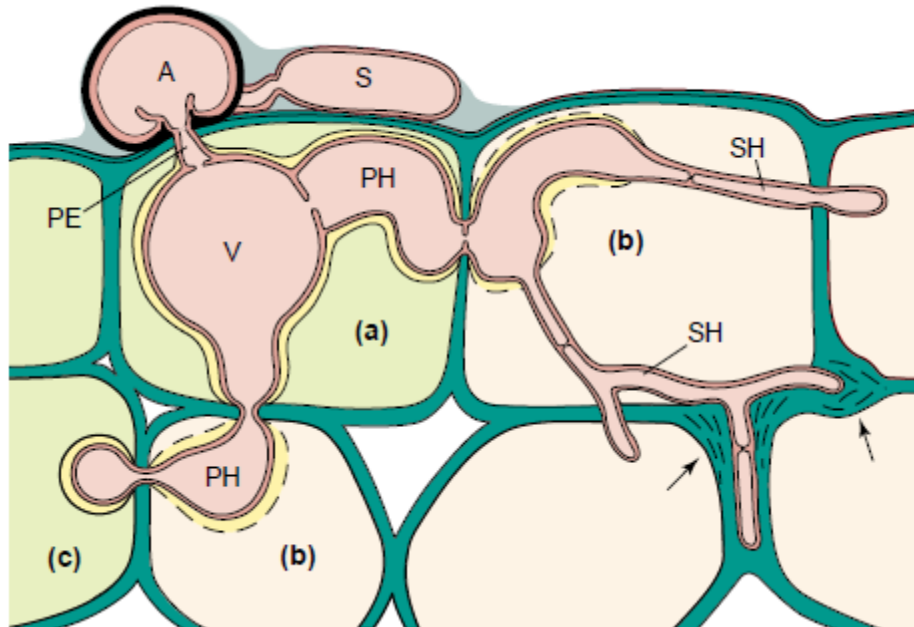


Figura 1. Penetración y colonización de *M. royeri* (Sánchez, D y Garcés, R. 2012)

2.1.2 *Alternaria Alternata*

A. alternata es un hongo filamentosos con conidióforos simples, pertenece a la familia Pleosporaceae del orden pleosporales. *A. alternata* se encuentra principalmente en abonos, madera podrida, cultivos de fresas, tomates y espárragos, es conocida como la causa de mancha foliar y otras enfermedades en más de 100 especies de plantas hospedadoras (Rotem, 1994).

En estudios realizados por Ruiz y colaboradores, se reportó la producción de celulasas, pectinasas y ligninasa por *A. alternata* (Ruíz, *et al*; 2012).

A. alternata es un fitopatógeno causante de la mancha negra en la pera japonesa, en 1988 se estudió una cutinasa la cual se indujo con cutina de pomela, su peso fue de 32,000 Daltons en SDS-PAGE, la actividad que presentó fue de 2836 h/mL. (Tanabe, *et al*; 1988).

2.2 Cutícula de las plantas

Las plantas tienen una capa extracelular llamada cutícula la cual se encarga de proteger a las células epidérmicas y evita la pérdida de agua así como también, las protege de agresiones físicas, químicas y biológicas como la invasión de patógenos (Skamnioti *et al.*, 2008).

El componente principal de la cutícula es la cutina la cual está formada por ácidos grasos de cadena larga principalmente palmítico (C16) y esteárico (C18), estos pueden estar hidroxilados o epoxilados en la parte media de la cadena o cercano a un doble enlace, están unidos unos a otros por uniones éster formando una red tridimensional, también pueden estar presentes los puentes peróxidos y enlaces éter. La cutina es formada y segregada por las células de la epidermis (Kolattukudy, 1980; Purdy y Kolattukudy, 1973).

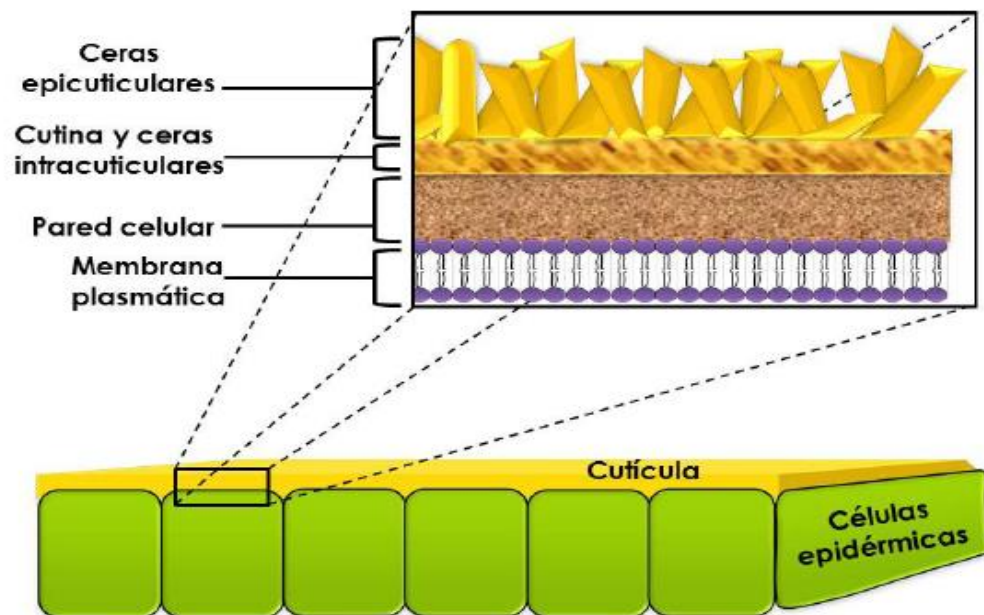


Figura 2. Composición de cutícula (Masala et al, 2005)

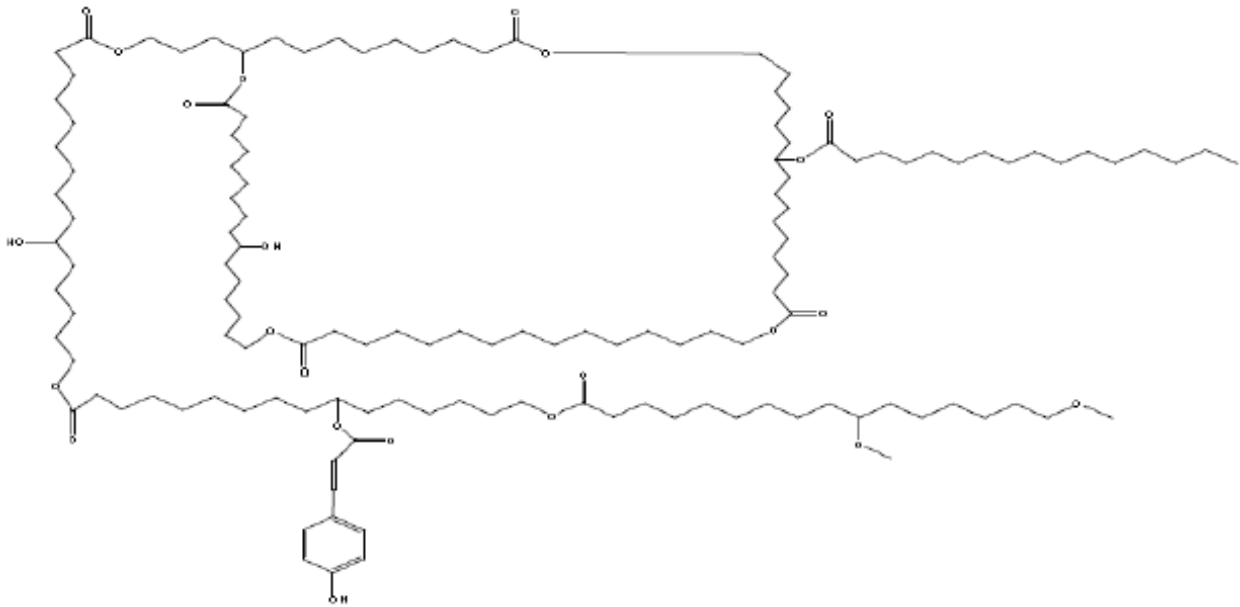


Figura 3. Unidad básica de la estructura de la cutina (Kolattukudy, 1980).

2.3 Estructura y mecanismo catalítico de las cutinasas

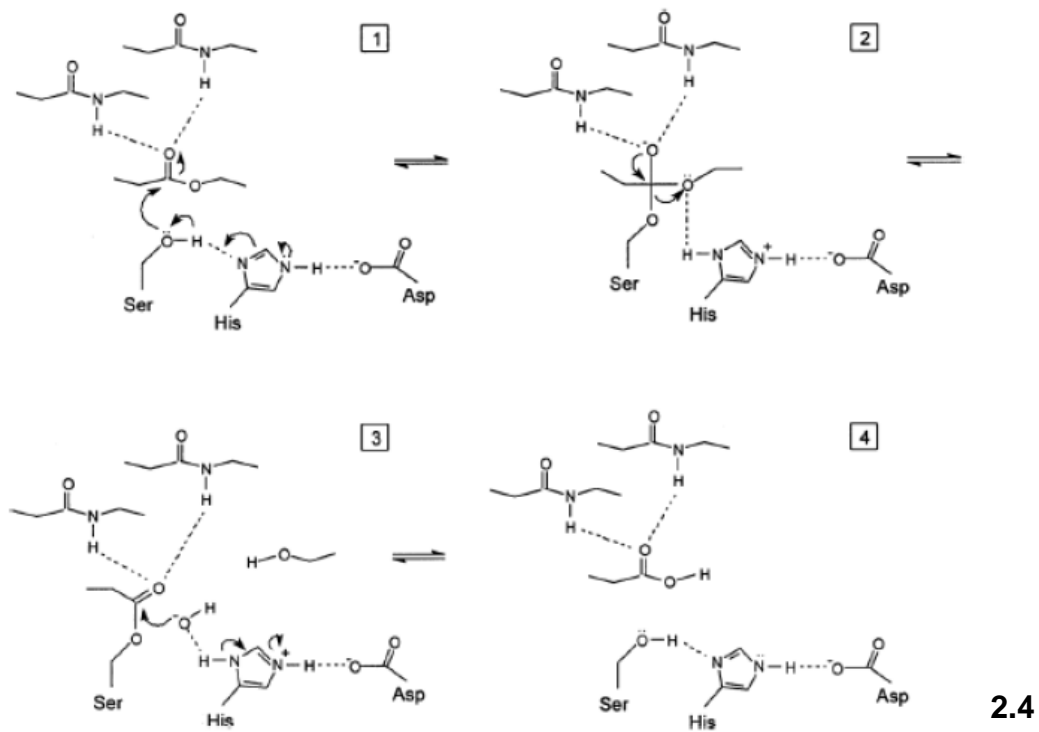
Las cutinasas presentan un plegamiento α - β hidrolasa, el cual consiste en una hoja β central paralela a ocho hebras ($\beta 3$ a $\beta 8$), estas están conectadas por α hélices que rodean por ambos lados a la hoja β central (Jaeger *et al.*, 1999).

El sitio activo de las enzimas con plegamiento α - β hidrolasa consiste en 3 residuos catalíticos: un residuo nucleofílico, un residuo ácido catalítico y un residuo de histidina. La tríada catalítica está conformada por los residuos His, Asp y Ser, este se encuentra en el extremo carboxílico de la $\beta 5$ (Jaeger *et al.*, 1999).

Las cutinasas son parecidas con las lipasas en el plegamiento, pero la diferencia entre estas dos es que la serina catalítica en las cutinasas es accesible al solvente y sustrato, debido a la ausencia de la tapa que cubre la serina del sitio activo. Es por esto por lo que las cutinasas no requieren un reordenamiento de la cadena principal, solo una reorientación de algunas cadenas laterales lipofílicas. La cavidad oxianiónica de las cutinasas se preforma en lugar de ser inducida por la unión de un ligando y esta se estabiliza por el residuo Ser42 (Carvalho *et al.*, 1998).

El mecanismo de hidrólisis se basa en el residuo de His funcionando como una base y el oxígeno de Ser que es quien realiza el ataque nucleofílico al carbonilo del enlace éster del sustrato, que da como resultado un intermediario tetraédrico, estabilizado por medio de puentes de hidrógeno que se forman con los residuos de la cavidad

oxianiónica. La histidina sigue actuando como base y provoca la ruptura del enlace éster causando la liberación del alcohol y la formación de la enzima acilada. Se realiza la hidrólisis de la enzima acilada, la cual genera como productos un ácido graso y la enzima libre (Neves-Petersen *et al.*, 2001).



4Figura 4. Mecanismo catalítico de las serín-hidrolasas

Aplicaciones de cutinasas

Las reacciones y síntesis catalizadas por estas enzimas tienen usos en procesos industriales. Un ejemplo es en la industria de los alimentos para la modificación de grasas y aceites mediante una hidrogenación la cual es la modificación química de ácidos grasos, ruptura del enlace éster (hidrólisis) o síntesis como interesterificación y transesterificación, en la cual se lleva a cabo una reorganización de ácidos grasos (Castro-Ochoa *et al.*, 2010). Otro ejemplo es la obtención de sabores mediante la síntesis enzimática como es la obtención de acetato de hexilo, un éster de cadena corta con sabor frutal que se genera mediante la alcoholisis de butil acetato con hexano (Carvalho *et al.*, 1998).

Otra aplicación de las cutinasas es la síntesis de biocombustibles como biodiesel, en donde ha sido utilizada una cutinasa de *Fusarium solani* como catalizador para la transesterificación de la mezcla de triglicéridos y metanol en micelas inversas de Bis- (2- etilhexil)- sulfosuccinato de sodio (AOT) en Iso-octano (Badanes *et al.*, 2010). En el 2012 se demostró que modifican la superficie y degradación de poliéster como es el politereftalato de etileno (PET) (Sulaiman *et al.*, 2012)

2.5 Sistema de expresión

Todas las bacterias pueden ser usadas para la producción de proteínas heterólogas, pero se desconoce la información acerca de la regulación y mecanismos (Terpe, 2006). Las levaduras son utilizadas como un sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes para fines de investigación básica e industriales, porque han sido ampliamente estudiadas, por su fácil manipulación genética y además tienen altos niveles de producción tanto intra como extracelular de la proteína de interés.

Las proteínas eucariotas tienen más probabilidades de ser correctamente procesadas, dobladas y ensambladas en moléculas funcionales cuando se sintetizan en otro sistema eucariota como una levadura.

P. pastoris no fermenta preferentemente azúcares u otras fuentes de carbono. La preferencia de esta levadura por el crecimiento respiratorio facilita enormemente su cultivo a altas densidades celulares porque no genera cantidades significativas del producto fermentativo tóxico. *P. pastoris* puede crecer en presencia de metanol como única fuente de carbono y energía.

Al igual que muchas vías alternativas de fuente de carbono, el crecimiento en metanol requiere la inducción de un conjunto específico de enzimas metabólicas. Dos de estas enzimas, la alcohol oxidasa (AOX) y la dihidroxiacetona sintasa (DHAS), aunque ausentes de células cultivadas en glucosa u otras fuentes de carbono, pueden constituir aproximadamente 30% de la proteína total en células cultivadas con metanol.

Varios informes sobre la expresión en *P. pastoris* han sugerido que el cambio de codones en un gen extraño a los de codones más frecuentemente usados por la levadura (según se juzga a partir de las secuencias de aminoácidos predichas de

genes altamente expresados de *P. pastoris*) mejora significativamente los niveles de expresión de genes heterólogos.

Una diferencia importante entre el sistema de *P. pastoris* y *E. coli* es el nivel de proteína recombinante típicamente observado en fases tempranas de desarrollo. En el caso de *E. coli*, típicamente se puede contar con un 10% o más de proteína total que es producto recombinante. Como consecuencia, se puede observar el producto como una banda intensa y gruesa sobre un gel teñido con coomasie. Esto típicamente no es cierto para *P. pastoris*, especialmente en las fases tempranas de desarrollo donde los rendimientos de proteína intracelular de menos del 1% de la proteína total son comunes para las proteínas secretadas y donde las proteinasas nativas pueden degradar inicialmente la mayoría del producto antes de que pueda ser visualizado.

Por otro lado, *P. pastoris* ofrece el potencial de secreción de un producto de proteína recombinante, una ventaja significativa cuando es posible, ya que la levadura secreta sólo niveles bajos de sus propias proteínas. De este modo, la proteína recombinante es a menudo la única proteína en el medio de cultivo y la etapa de purificación principal es simplemente la eliminación de las células gastadas del medio.

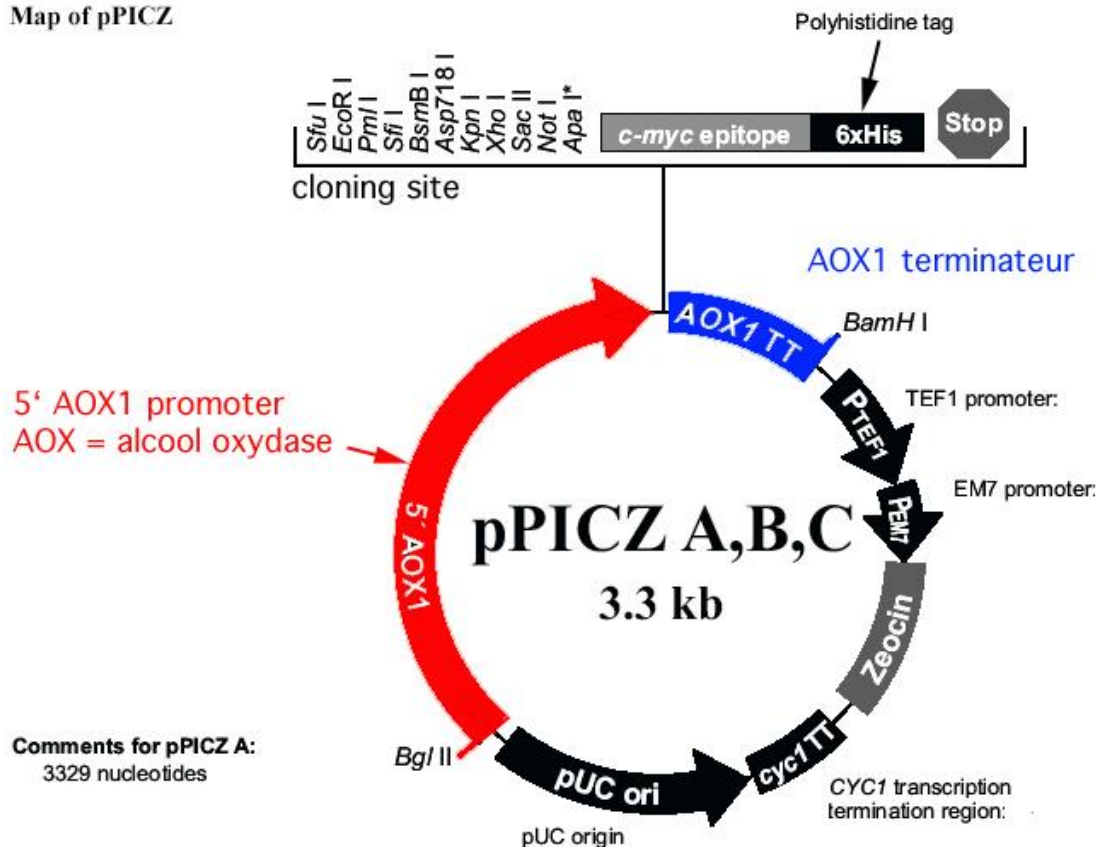
Por otra parte, el sistema de expresión PET de *Escherichia coli* es utilizado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Los genes diana se clonan en plásmidos pET bajo el control de la transcripción fuerte del bacteriófago T7 y las señales de traducción; la expresión se induce proporcionando una fuente de ARN polimerasa T7 en la célula huésped. La ARN polimerasa de T7 es selectiva que al inducir completamente, casi todos los recursos de la célula se convierten a la expresión del gen diana; el producto deseado puede comprender más del 50% de la proteína celular total unas pocas horas después de la inducción.

2.6 Vectores

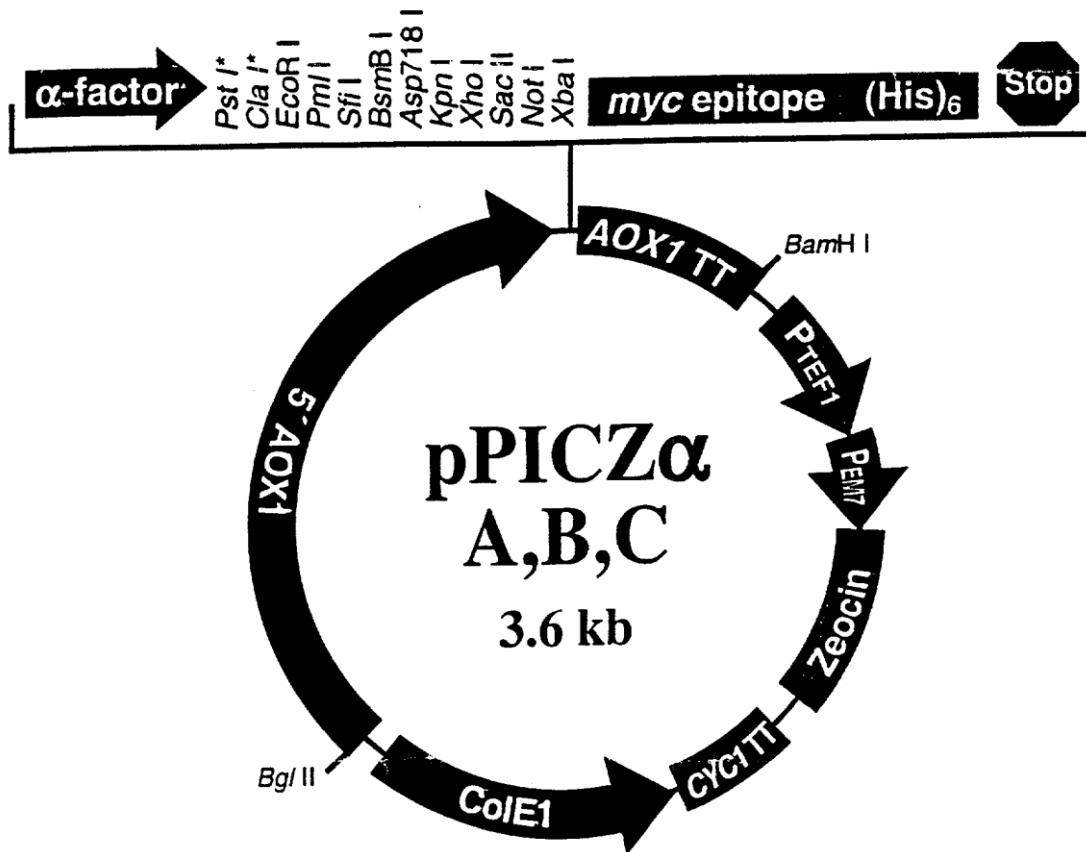
2.6.1 Vector pPICZalfa

Estos vectores permiten una regulación fuerte, contienen el marcador de resistencia a zeocina, el cual le permite seleccionar de manera directa a células recombinantes e integrantes de copias múltiples sin el uso de un medio de eliminación. Además tienen un promotor AOX1 que permite altos niveles de expresión de la proteína heteróloga por inducción con metanol, contiene un C- terminal epítoto *myc* y secuencia de polihistidina (6xHis) para la detección eficiente y purificación rápida de proteínas recombinantes. También contiene una señal de secreción, el α -factor, el cual tiene 135 aa y contiene el gen 5'AOX1 el cual permite que su integración sea dirigida en el genoma de *P. pastoris* (Bitter *et al.*, 1984). A continuación, se muestran ejemplos de vectores del sistema de expresión de *P. pastoris*.

Map of pPICZ



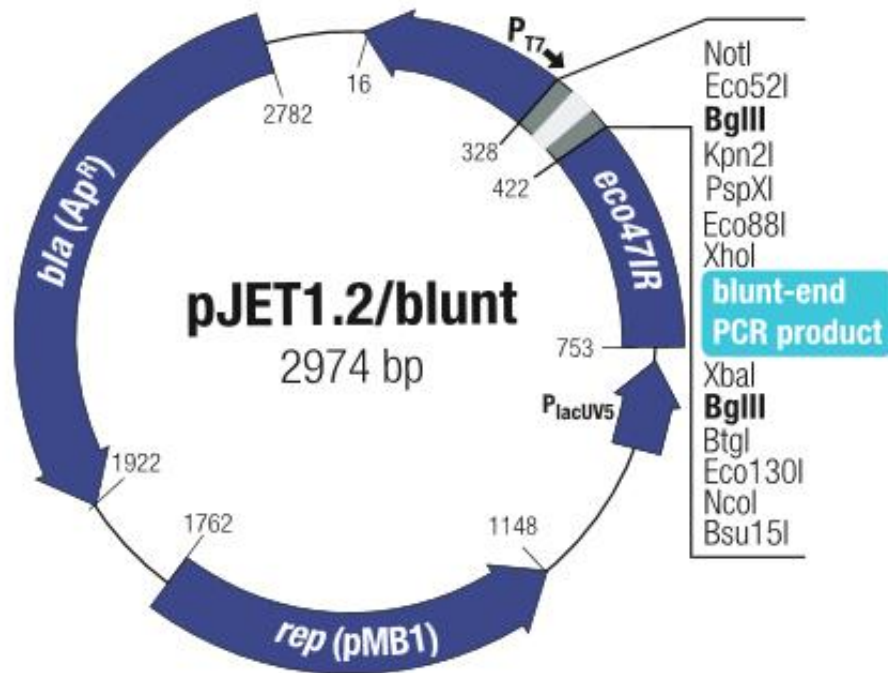
5Figura 5. Vector pPICZ A, B y C.



6Figura 6. Vector pPICZ α A, B y C.

2.6.2 Vector pJET1.2/blunt

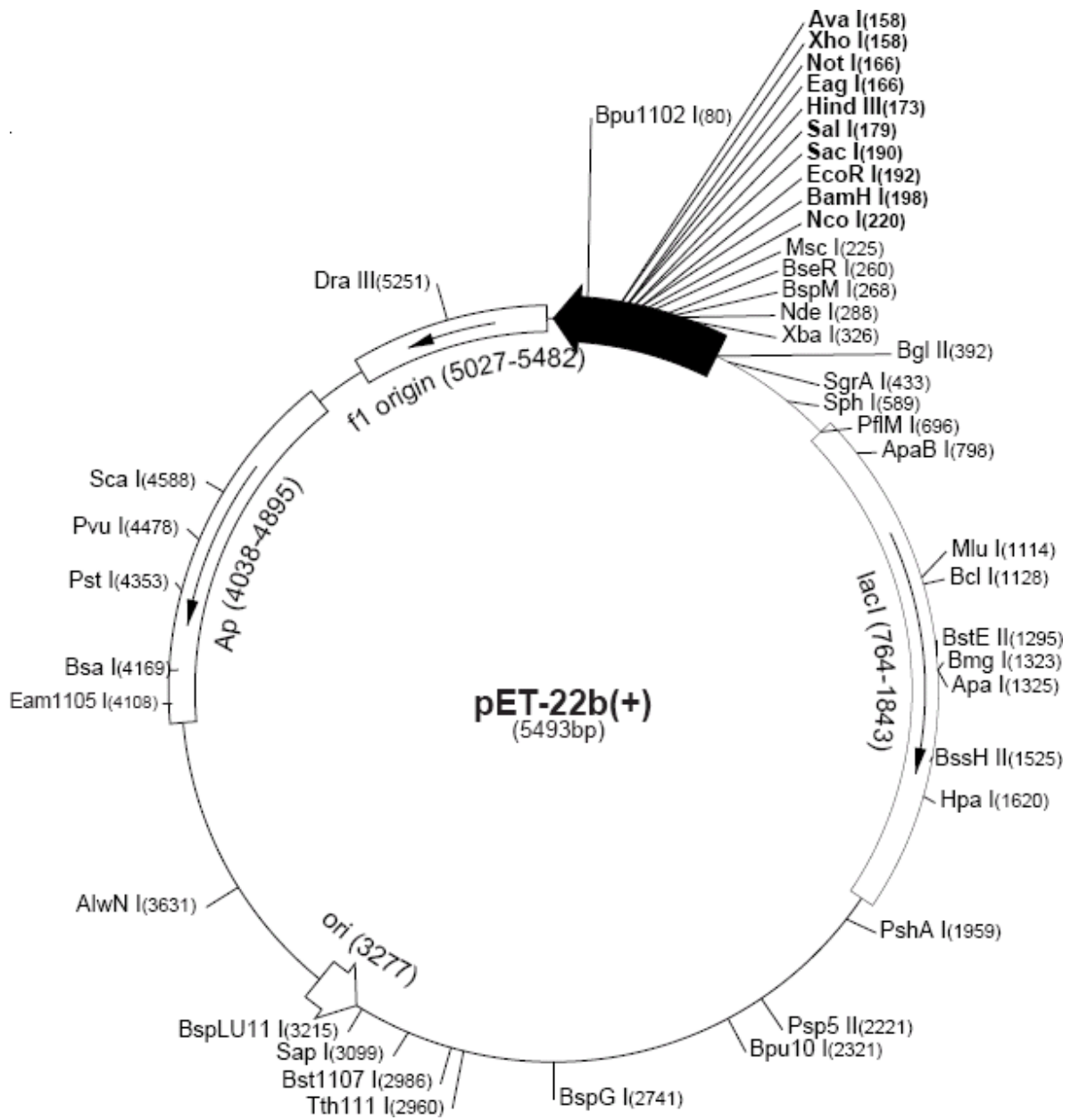
El vector contiene un gen de enzima de restricción letal que se rompe por ligación de un inserto de ADN en el sitio de clonación. Como resultado, solo las células bacterianas con plásmidos recombinantes pueden formar colonias. El vector pJET1.2 / que carece de un inserto puede expresar una enzima de restricción letal, que mata a la célula de *E. coli* del huésped después de la transformación.



7Figura 7. Vector pJET1.2/blunt.

2.6.3 Vector pET-22

El vector pET-22b porta una secuencia de señal pelB N-terminal para la localización periplásmica potencial de la proteína recombinante, más la secuencia de His-Tag en la región C-terminal. Este vector contiene además el gen de resistencia a ampicilina.



8Figura 8. Vector PET-22b(+)

2.7 Métodos de transformación

Con cualquiera de los cuatro procedimientos de transformación de la tabla 2, es posible introducir vectores como elementos autónomos o integrarlos en el genoma de *P. pastoris* o *E. coli*. El método de generación de esferoplastos-polietilenglicol-CaCl₂ (esferoplastos) es el mejor caracterizado de las técnicas y produce una alta frecuencia de transformantes en el caso de levaduras (~ 10⁵ / μg) pero es laborioso y da lugar a colonias transformadas que deben ser recuperadas de la incorporación de agar. Los otros tres métodos utilizan células intactas o enteras (es decir, no implican esferoplastos) y, por lo tanto, son más convenientes y dan lugar a transformantes en la superficie de placas de agar que se recogen fácilmente o se replican para un análisis posterior. De los métodos de células enteras, la electroporación produce transformantes a frecuencias comparables con las de esferoplastia y es el método de elección para la mayoría de los investigadores.

2Tabla 2. Características generales de los métodos de transformación de *P. pastoris*

Method	Transformation frequency (per μg)	Convenience factor	Multicopy integration?
Spheroplast	10 ⁵	Low	Yes
Electroporation	10 ⁵	High	Yes
PEG ₁₀₀₀ *	10 ³	High	No
LiCl*	10 ²	High	No

3. Justificación

Las cutinasas tienen diversas aplicaciones importantes, por lo cual se necesita producir industrialmente con altas concentraciones estas enzimas, mediante la sobreexpresión en organismos hospederos ya estudiados.

Además, no hay estudios sobre la caracterización bioquímica y la expresión heteróloga de cutinasas de hongos fitopatógenos como *M. royeri* y *A. alternata*.

4. Hipótesis

La cepa de *Pichia pastoris* ó *E.coli* que expresa el gen de cutinasa presentará mayor producción de cutinasa que la cepa nativa, dicha enzima recombinante presentará las mismas propiedades bioquímicas que la enzima silvestre.

5. Objetivos

5.1 Objetivos generales

Expresar y caracterizar una cutinasa de un hongo fitopatógeno en un sistema heterólogo.

5.2 Objetivos específicos

1. Inducir la expresión de las cutinasas de *M. roleri* y *A. alternata* en diferentes medios.
2. Identificar la expresión de los genes de cutinasas a partir del micelio crecido en condiciones de inducción.
3. Aislar los genes de cutinasas de *M. roleri* y *A. alternata*
4. Seleccionar y expresar uno de los genes de cutinasas en *P. pastoris* y *E. coli*.

6. Metodología

6.1 Análisis bioinformático

6.1.1 Obtención de secuencias de cutinasas de *M. roreri* y *A. alternata*,

Las secuencias de los genes de cutinasas se obtuvieron de las páginas de la base de datos del genoma de cada uno de los hongos (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=mrr, <https://genome.jgi.doe.gov/Altal1/Altal1.home.html>, y del NCBI (Resource Coordinators, 2016).

6.1.2 Árbol filogenético de cutinasas de *M. roreri*, *A. alternata* y *Colletotrichum*

Se realizó un árbol filogenético con las secuencias obtenidas de acuerdo a la sección 6.1.1 con el software MEGA 7. Se utilizaron secuencias de otros genes de cutinasas de hongos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* (Kumar et al; 2015).

6.1.3 Análisis bioinformático de genes de cutinasas

Se verificó si las secuencias de genes de cutinasas contenían intrones, secuencias de glicosilación y secuenciaseñal. Se determinó el peso molecular y punto isoeléctrico teóricos de la proteína, así como el modelo estructural. Para lo anterior se utilizaron diferentes softwares: Clustal W, signalP, ExPASy tools, ESyPred3D; NetNglyc respectivamente (Corpet, 1988; Thomas Nordahl, et al; 2011. Lambert C, et al; 2002). Además, se realizó el análisis de restricción utilizando el software Ncb cutter (Vincze, et al; 2003).

6.1.4 Diseño y elaboración de cebadores

Se diseñaron los cebadores utilizando las secuencias de cutinasas de las bases de datos del genoma. Una vez diseñados se analizaron con el software Oligoanalyzer (Owczarzy, et al; 2008). Finalmente se mandaron a sintetizar al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

6.2 Obtención del gen de cutinasa

6.2.1 Obtención de micelio de *M. royeri* y de *A. alternata*

En el caso de *M. royeri*, se inoculó e incubó por 20 días en medio mínimo de inducción que contiene sales (KNO₃ 6 g/L, K₂HPO₄ 1.5g/L, MgSO₄ 7H₂O 0.5 g/L, FeSO₄ 7 H₂O 0.002 g/L, ZnSO₄ 7 H₂O 0.002 g/L, MgCl₂ 7 H₂O 0.002 g/L) y la fuente de carbono e inducción, las cuales fueron variadas (cutícula de manzana, cutícula de cacao, cutícula de papa, cutícula de tomate y aceite de oliva). Para *Alternaria alternata* se utilizó el medio de inducción que contiene: urea 0.3g, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄ 7H₂O, CaCl₂, FeSO₄ ZnSO₄ 7H₂O, CaCl₂, MgSO₄, más cutícula.

Para ambos casos, se colocaron 100 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 500 ml y se incubaron a 27°C por 20 días. Posteriormente, se extrajo el micelio del medio líquido con una aguja de disección y se secó con papel absorbente, finalmente se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó hasta la extracción de ARN.

6.2.2 Extracción de ARN

Se trituró el tejido congelado con nitrógeno líquido, para lo cual se agregaron 25 mg de micelio con 600 µl de Trizol y se trituró en un mortero. Después se colocaron en un microtubo y se centrifugaron a 8,000 g por 15 min. El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo. Se añadió un volumen igual de etanol (95-100%) al sobrenadante y se mezcló. Se transfirió a una columna insertada en un tubo de colección, se centrifugó a 8,000 g por 30 segundos y se descartó el flujo. Se aplica el tratamiento con DNase 1 en columna. Para esto, en un tubo libre de RNAsa, se añadieron 5 µl DNAsa1, 75 µl buffer de digestión ADN y se mezcló, se añadió la mezcla directamente a la matriz de columna, se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Se añadieron 400 µl trizol ARN a la columna y se centrifugó en las condiciones anteriores y se descartó el flujo, se repitió este pasó. Después se añadieron 700 µl de "ARN Wash Buffer" a la columna y se centrifugó durante 2 min para asegurar la eliminación completa del tampón de lavado. Finalmente, se transfirió la columna a un tubo libre de RNasa para por último eluir el ARN, para lo cual se añadieron 50 µl de agua libre de DNasa/RNasa directamente a la matriz de

columna y se centrifugó, para coleccionar el ARN en el microtubo después de retirar la columna.

6.2.3 Electroforesis de ARN

Se realizó una electroforesis con gel de agarosa en el cual se observó la integridad del ARN extraído del hongo como se describe a continuación:

En un matraz Erlenmeyer se mezclaron 1% de agarosa con buffer TAE 1X, después se calentó en un horno de microondas hasta que se disolvió la agarosa. La mezcla se enfrió un poco a 37°C sin dejar que solidifique y se agregaron 2 µl de bromuro de etidio. La mezcla se vació en un molde, se colocó un peine para formar los pozos y se dejó solidificar. El gel se colocó en una cámara de electroforesis que contenía una solución amortiguadora TAE 1X y en cada pozo del gel se pusieron 10 µl de la mezcla que contenía 2 µl de muestra con ADN y 8 µl de buffer de carga. La fuente de poder se programó para una corrida del gel durante 40 min a 80 V. Después del corrimiento, el gel se observó con un transluminador MiniBIs Pro.

6.2.4 Síntesis de cDNA

En un tubo libre de nucleasas se añadieron 1 µg de ARN total, 1 µL de oligos y agua libre de nucleasa hasta completar un volumen final de 12 µL. Posteriormente se añaden los siguientes componentes en el orden citado: buffer de reacción 5X(4 µl), RNase inhibidor (1 µl), 10 mM dNTP Mix (2 µl), transcriptasa reversa (1 µl), dando un volumen total de 20 µl. Todo se mezcló y centrifugó. Para síntesis de cDNA, se incubó por 5 min la reacción a 25°C, seguido por 60 min a 42°C y 70°C por 5 min.

6.2.5 Amplificación por PCR

Se amplificó por PCR el gen de cada cutinasa siguiendo el protocolo del proveedor de Taq PCR polimerasa con los cebadores diseñados, por ejemplo MCUT1F y MCUT1R para *M. roreri*; así como, ACUT2F y ACUT2R para *A. alternata*. La mezcla de reacción para PCR contenía: 19.5 µl de agua libre de nucleasas, 2.5 µl de Buffer 10x, 0.5 µl de dNTPs (10 mM), 0.5 µl del cebador directo (10 µM), 0.5 µl del cebador reverso (10 µM), 1 µl de cDNA obtenido de acuerdo a lo descrito en el paso anterior y por último se agregaron 0.5 µl de Taq DNA polimerasa. Se utilizó un termociclador

(Lancyclergenius) con el siguiente programa: 1 ciclo a 94°C por 4 min seguido por 35 ciclos de 94°C 40 s, 55°C por 40 s, 72°C por 1 min y el 3 ciclo de 72°C por 10 min y por último se almacenó a 12°C.

6.2.6 Purificación y secuenciación de productos de PCR

Purificación

Se extrajo el fragmento de ADN del gel de agarosa usando un bisturí y se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, se le añadieron 3 volúmenes de buffer contenido en el kit de recuperación de ADN de gel (Zymoclean) a cada volumen de agarosa escindido del gel. Se incubó a 37°C durante 10 min hasta que el fragmento de gel se disolvió completamente.

Se transfirió la solución de agarosa fundida a una columna en un tubo de colección y se centrifugó por 30-60 s, se desechó el flujo y se añadieron 200 µl de buffer de lavado a la columna y se centrifugó durante 30 s. Se desechó el flujo y se repitió la etapa de lavado. Se agregaron 6 µl Buffer de elución, se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL y se centrifugó durante 30-60 seg para eluir el ADN.

6.2.7 Secuenciación y análisis de genes amplificados

Cada producto de PCR que fue purificado se envió para su secuenciación al Instituto de Biotecnología de la UNAM. Una vez obtenidos los electroferogramas, se obtuvo la secuencia y se analizó con el programa Chromas 2.6.4 (Leo Goodstadt, et al 2001). Las secuencias fueron posteriormente alineadas contra la base de datos del NCBI (NCBI Resource Coordinators, 2016) y contra las secuencias obtenidas de las bases de datos de los genomas de cada hongo para su identificación.

6.3 Clonación del gen de cutinasa

6.3.1 Extracción del plásmido

El plásmido se obtuvo de la cepa *E. coli* DH5α que lo contenía, para lo cual, se incubaron 2 mL de medio LB con zeocina con las células transformadas a 37 °C durante 12 h. Posteriormente se pasaron a un microtubo y se centrifugaron a 4°C a máxima velocidad por 30 s. Se desechó el sobrenadante con cuidado utilizando una

micropipeta. Se resuspendió el pellet en 100 µl de solución de lisis alcalina del kit de extracción de plásmido y se mezcló en vortex. Se le añadieron 200 µL de solución de lisis alcalina II recién preparada y se mezcló por inversión 5 veces. Se colocaron los tubos sobre hielo, se añadieron 150 µL de solución de lisis alcalina III y se mezcló por inversión 20 veces, los tubos se pusieron en hielo por 3 min. Se centrifugó a 8,000 g por 5 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadieron 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente, se mezcló la solución por vortex y se dejó reposar por 2 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 8000 g por 5 min a 4°C, se removió el sobrenadante con una micropipeta y se puso el tubo en posición invertida sobre una toalla de papel hasta que el fluido se secó por completo. Se añadió 1 ml de alcohol al 70%, se invirtió el tubo 20 veces y se recuperó el ADN centrifugando 2 min a 4°C a máxima velocidad.

Se removió el sobrenadante con micropipeta y se dejó el microtubo 15 minutos con la tapa abierta para dejar evaporar el alcohol. Por último se disuelve el pellet de ADN en 50 µL de TE (pH de 8) se mezcla unos segundos en Vortex y se almacena a -20 °C.

6.3.2 Construcción de plásmido pJETCUT

Con el fin de tener los genes insertados en un plásmido para su secuenciación, los genes amplificados se insertaron en el plásmido pJET (Thermo Scientific) de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor del kit de clonación. Para insertar el gen en el vector se agregó buffer 2X de reacción 10 µL, 1 mg de producto de PCR purificado, 6 µL de agua, DNA enzimas de restricción, se incubó a 70 °C por 5 min y se agregó pJET 1.2/ ligase, incubar a 22 °C por 5 min para ligación.

6.3.3 Construcción de plásmido pPICZCUT

A los fragmentos amplificados y purificados de cada uno de los genes se les realizaron digestiones con las enzimas de restricción correspondientes. Se insertaron en el plásmido pPiCZ, el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas, utilizando la ligasa T4 (Thermofisher) para obtener el vector pPICZCUT.

6.3.4 Construcción de plásmido pET-22(+)

A los fragmentos amplificados y purificados de cada uno de los genes se les realizaron digestiones con las enzimas de restricción correspondientes. Se insertaron en el plásmido pET-22b, el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas, utilizando la ligasa T4 (Thermofisher) para obtener el vector pET-22CUT.

6.3.5 Preparación de células competentes

Se realizó medio de cultivo LB (ver apéndice A) en cajas Petri, se creció la cepa DH5 α y se picaron las colonias con ayuda de un palillo de madera esterilizado. Se inoculó con el palillo y se dejaron creciendo las colonias en 1 mL de caldo LB durante toda la noche a 100 rpm 37 °C. De la solución de células crecidas se tomaron 100 μ L, los cuales fueron crecidos en 1 mL de LB estéril y se dejó incubando durante 2 h aproximadamente a 100 rpm, se decantó el contenido en un tubo eppendorf de 2 mL, se centrifugó a 7000 rpm por 7 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1.5 mL de CaCl₂. Se incubaron en hielo por 30 min a (4°C), se centrifugaron a 7000 rpm a 4°C por 7 min y se decantó el sobrenadante. Se resuspendieron en 50 μ L de CaCl₂ y se incubaron por 7 h a 24°C. Se almacenaron en glicerol a -70°C.

6.3.6 Transformación de *E. coli* DH5 α

A las células de *E.coli* competentes se le insertó el vector pPICZCUT construido. Se mezclaron y se incubaron por 30 min en hielo, seguido de 1 min a 42°C y se enfriaron en hielo por 2 min, la mezcla se agregó a un tubo con medio líquido LB el cual se dejó por 45 min a 37 °C. La mezcla se decantó a un tubo eppendorf y se centrifugó a 5000 rpm a 4°C por 30 s, se decantó el líquido del tubo y solo se dejó la gota del fondo, donde se resuspendieron las células que fueron inoculadas en una caja Petri con medio LB con agar y zeocina. Este método se aplicó para los vectores pPICZCUT, pET-22(+), pJETCUT.

6.3.7 Selección de colonias

Las células de *E. coli* transformadas se seleccionaron primero en medio LB con ampicilina, las colonias que crecieron en las cajas Petri que contenían el plásmido PET22CUT1M, se les realizó una PCR de colonia.

6.3.8 PCR de colonia

Se tomaron 100 µL del cultivo crecido en LB durante 12 h y se lisaron las células por calentamiento a 98°C. Se tomaron 5 µL del lisado para utilizarlo como templado para una reacción de PCR de 25 µL siguiendo el mismo protocolo utilizado para la amplificación del gen de cutinasa. Se seleccionaron las clonas que dieron positivo para esta prueba y se usaron para extracción de plásmido.

6.3.9 Extracción de plásmido PET22

Se obtuvo de la cepa de *E. coli* DH5α transformada con PET22CUT1M. Se incubaron 2 mL de medio LB con ampicilina con las células transformadas a 37 °C durante 12 h. Se pasaron a un microtubo y se centrifugaron a 4°C a máxima velocidad por 30 s. Se desechó el sobrenadante con cuidado utilizando una micropipeta. Se utilizó el kit Zyppy Plasmid Miniprep, para realizar la transformación en *E. coli* BL21

6.3.10 Transformación de *E. coli* BL21 con el plásmido PET22

Se prepararon las células competentes de *E. coli* BL21 como se menciona en el apartado 6.3.4 y se realizó la transformación siguiendo el protocolo del punto 6.3.5.

6.4 Análisis de proteínas

6.4.1 Crecimiento de la clona BL21 con PET22CUT1M

Se tomaron 10 µl de la clonada *E. coli* BL21 que contiene el gen CUT1M en 25 mL de LB con ampicilina y se incubó durante 12 h a 37 °C.

6.4.2 Inducción de la enzima CUT1M con IPTG

Se incubó la clona a 37°C hasta una OD_{600 nm} de 0.6 - 0.9, a la cual se le agregó el IPTG con una concentración de 0.4 mM y se tomó una alícuota de 10 mL cada hora durante el tiempo de inducción.

6.4.3 Prueba cualitativa de actividad

Se colocaron 75 μ L de una solución A de acetato de α -naftilo (0.005 M en buffer de fosfatos 50 mM pH 7, 25 % acetona), 75 μ L de extracto crudo durante 15 min, se agregó 75 μ L de una solución B con Fast Red (0.008 M en buffer de fosfatos 50 mM pH 7 con 0.05% de triton X-100). Se utilizó como blanco el buffer de fosfatos pH 7 (sin enzima). La actividad se observó con el cambio a color rojo marrón.

6.4.3 Medición de actividad

Se determinó la actividad con ésteres de *p*-nitrofenil (*p*-NP), se realizaron soluciones de 1 mM en etanol, se colocaron en la celda 200 μ L de buffer de fosfatos 50 mM pH 7, 25 μ L de enzima pura o extracto crudo, y antes de medir la absorbancia a 405 nm en el espectrofotómetro, se agregaron 20 μ L de la solución con el sustrato (*p*-NP éster), se homogenizó y se midió la absorbancia durante 15 min cada 5 min. Se tomó como blanco el buffer de fosfatos utilizado. Se elaboró una curva patrón de *p*-nitrofenol con un rango de 25 a 200 μ g para determinar la actividad enzimática (anexo C). Una unidad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato por minuto. La cantidad de acetato de *p*-nitrofenilo se interpola en una curva patrón de *p*-nitrofenol.

6.4.4 Medición de proteína

Se realizó por el método de Bradford, se agregaron 20 μ L de muestra y 250 μ L de Bradford, se homogenizó y se incubó por 5 minutos. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro (SmartSpec Plus) a 595 nm. Se elaboró un blanco con buffer de fosfatos pH 7. Se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) con un rango de 0.01 mg a 0.1 mg (anexo D).

6.5 Electroforesis

6.5.1 Perfil electroforético

Se realizaron geles desnaturalizantes discontinuos, utilizando 4 % de poliacrilamida para concentrar la muestra y un separador al 14 % de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Las muestras se hirvieron a 95°C por 5 min y se cargaron en cada pozo, se corrió a 80 y 120 mV en una cámara vertical y los geles se revelaron con comassie

incubando durante la noche. Se tiñen y destiñen los geles de acuerdo al protocolo descrito por Segrest y Jackson, 1972 hasta observar la presencia de bandas.

6.5.2 Zimograma (actividad “in situ”)

Para la detección de actividad se utilizó como sustrato el MUF-butirato (4-metilumbeliferona), realizando primero una renaturalización, con un lavado por 30 min con agitación en una solución de 5% de Triton X-100 y posterior intercambio por un buffer de fosfatos 50 mM pH 7. Se le agregó MUF-butirato y se dejó a temperatura ambiente por 10 min. Las bandas se observaron con luz UV.

6.5.3 Análisis de Western blot

Las proteínas que fueron separadas utilizando un gel de SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF (polyvinylidene fluoride) mediante una segunda electroforesis de 1 h a 20 V constantes. Se utilizó el anticuerpo His

6.6 Obtención de enzima pura

6.6.1 Concentración de enzima

Se filtraron los sobrenadantes de los cultivos y se colocaron en hielo con agitación. Se añadió lentamente sulfato de amonio hasta una concentración de 65%. Se centrifugó la solución a 8500 rpm durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 volúmenes de regulador pH 7. Para eliminar el sulfato de amonio se dializó la enzima precipitada utilizando una membrana de corte de 14 KDa y se ultrafiltró con una membrana de 1 KDa.

6.6.2 Purificación de la enzima

Se realizó una cromatografía de afinidad con una columna de cobalto (Co) (Clontech), por la presencia de la cola de histidina que se adicionó a la enzima en el carboxilo terminal. Se siguió el protocolo descrito por el proveedor. Se realizaron 5 lavados de la columna con 1 mL de agua desionizada cada uno, seguido de 10 lavados de 1 mL con buffer de equilibrio, se agregaron 5 mL de ultrafiltrado obtenido, adicionando 1 mL del mismo 5 veces, posteriormente se realizarón 8 lavados de 1 mL con buffer de equilibrio, 7 lavados con buffer de lavado y por ultimo

10 lavados de 1 mL de buffer de elución. Se recolectaron las fracciones a partir de la adición del buffer de elución en alíquotas de 1 mL.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis bioinformático

7.1.1 Obtención de secuencias de cutinasas de *M. roreri* y *A. alternata*

Las secuencias de aminoácidos de las cutinasas de *M. roreri* y *A. alternata* fueron obtenidas de las bases de datos del genoma de cada microorganismo http://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=mrr, <https://genome.jgi.doe.gov/Altal1/Altal1.home.html>, y del NCBI (Resource Coordinators, 2016).

Las secuencias de ADN y de ARN de las cutinasas, fueron alineadas y se observó la cantidad de intrones que contenían. En las figuras 9A, 9B y 9C se muestran los resultados del análisis de secuencias de cutinasas de *M. roreri* y *A. alternata*, se analizaron también las secuencias anteriores y posteriores al codón de inicio y terminación con el fin de encontrar las secuencias regulatorias, la caja TATA la cual suele ser un sitio de unión de factores de transcripción, al igual en las figuras 9 y 10 se subrayó la región CAT la cual señala el sitio de unión de los factores de transcripción de ARN (Yang C, et al. 2007).

A)

```
GCAAGTGCCTCGAGTGTGAACGACCACTGATCCAATGAAGGTCACCACTCCATCTCGTCTTCCGAGGTTCTCTGT -219
AAGTTTGTACAGCGGACGATCGATTGTTATACGGTAGTGTATACCTGGGAAGAAAGTTAAATACTCGGAAGATG -146
TTCGCCATCTAGAATGGCATCACCGAGCCTCATCACCATCATACTTACTTCCAAGGTTCCCTTTGCCTGAGCCT -73
TCCAGCTCGACAGACCATCAAGATGAAGTTTTTTTACCCTTTCCATGATGACTGCTCTTGTAGCAGCGTCGCCT -1
```

CUTI-F Primer

```
ATGTCTCCGGCAGCAAAGTTCTCAGAGAACGAGATTCAAGCTCGCCAGTTTGGATTCCGGCAGCAGCACTAGGA 73
M S P A A K F S E N E I Q A R Q F G F G T T T R
ACGAACTCGAGAACGGAAGCGCTGAAGCTTGTCCAAAGGCGATCTTTATCTTTGCCCCGCGCATCCACAGAAAC 146
N E L E N G S A E A C P K A I F I F A R A S T E T
TGGCAACATGGtacgttgcgtagatcgcaattcactggaagcgcaagactgatatgtcgctaggGAGCTTCTACC 219
G N M G A S T
GGCCCTGCTGTAGCTAGCGCTCTTGAACGTAACACTACGGCGCAAGTGGTGTCTGGGTACAGGGCGTTGGTGGCC 292
G P A V A S A L E R N Y G A S G V W V Q G V G G
CATATTCGGCTGATCTAGGCTCGAATGCTCTACCTGGTGGTACATCACAAGCTGCTATTAATGAGGCCGTTGG 365
P Y S A D L G S N A L P G G T S Q A A I N E A V G
ACTCTTTCAACAAGCAAATCAGAAGTGCCCTGATACTCCCATCGTTGCTGGTGGCTACAGgtgtagtattttgt 438
L F Q Q A N Q K C P D T P I V A G G Y S
ctttgtaccttccatcttgagctctcgtactaacgctcgtagcagTCAAGGTACAGCGGTTATAGCGGGAGCTA 511
Q G T A V I A G A
```

TTCCCAAGCTGTCTACTACCATTTCGCGATCAGGTCAAGGGCGTCGTCCTCTTTGGTTATACTCGAAACGCCCA 584
 I P K L S T T I R D Q V K G V V L F G Y T R N A Q
 GAACCGTGGTGGTATTCCCAGCTACCCCAGTGATGACTTGGAAGTATACTGTGCTACAGGCGACCTAGTTTGC 675
 N R G G I P S Y P S D D L E V Y C A T G D L V C
 GTCGGAACGCTGACAATCCCTGCCGCGCACTTCTCTTACGCGGATGAGGCTGCTGGGCCTGCTCCAAGGTTTC 730
 V G T L T I P A A H F S Y A D E A A G P A P R F

CUT1-R Primer

TGCAAAGCAAGATTGATGGAAACTGAAGTTCTGATGAATTGAAACTAGAAAGAGTTAGACGGGAGAAAATGAGC 803
 L Q S K I D G N
 GATTATTTCGGAACCTTTTCGGATGATAGTAGATTGATTGGTTGGAGATTGACCAATAAGAGAATTGCCACTGA 876
 TACAGATTTGTGATTGGCTGAGCACCACAATCCCTTGACAATAGTCAATGCCCTCCAACCGACGAACCTCATC 949
 TTCAGGAGCTCAATAACACCATCTCATGAACACTTTATTTGATTGATCGTCAGGCATTCGGACTAGACCCATG 1022

Figura 9 A. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la cutinasa 1 de *A. alternata* (AACUT1), los aminoácidos de cada codón se encuentran debajo, están numerados de lado derecho ambas secuencias. La caja TATA, el codón de inicio y de terminación y la secuencia CAT se encuentran subrayados. La secuencia de los intrones se encuentra en minúscula cursiva. Los cebadores se encuentran en negrita

B)

CGCCGCCACACCAACATCGGTATCCTGGAATCGTTCGTACGATGCAAATAACCTCGACGTCAT -438
 GCCGTTGAAGACACAGCAAGCTCCAGTCAAACCACCTATACCTTCCTTTTCCGTTGTTGGTCTCCAAATTGAA -365
 GGGAAACCAAACGTTTATGCGGGTAAGACGGTGACAGTTCGATTGAGCATGGCGTCGATCAAGAGACTACGGGAC -292
 AGATGCCTACGACCATCTCTAGTGCTCCGAGCGCATGTATGTTCTACCCCTTCAGGTATAGAGAGATGCCTGG -219
 GGATCGGCCAGTGAAACGCGCTAAGAATCTCTGCCGAGGTGACATGGCATATCGACAGTGCTTTTTTCTTTACC -146
 CACACGGCATGGTAACAGATGTGAACTGGATATATAAGGGAGTCTGGATCCTCGTTGATATATATGATCACCA -73
 CCTTGACAATACGGTAACTCAATACAGTCGCTCTACTTCTACTTCTATACACATCTTCTTACCACCTTCAAC -1

CUT2-F Primer

ATGCGTTTTCTCAGCCATCGTTTCCTGCCACTCTTTTCGCCTTGGCTTCCGCCGCTCCAGTAGAGGAAGTCAAGC 73
 .M R F S A I V P A T L F A L A S A A P V E E V K
 GTGCCGCTCTTCGTCTTGGCCCTCATACTATCATCAACACCCGCGGTACTGGCGAGCTCCAAGGCGAATC 146
 R A A S S S C P S Y T I I N T R G T G E L Q G E S
 TGCTGGTTTTCCGTACAATCAACTCCCGCGTCCGCGCTGCTGTCTCCGGAGGCAAGACCTACAACACTGTTTAC 219
 A G F R T I N S R V R A A V S G G K T Y N T V Y
 ACTGCCGACTTCTCCAAAACAGTGCCGCGGGTACACGAGACATTGTCAACAAGATCACTACCACACTGGCCT 292
 T A D F S Q N S A A G T R D I V N K I T T T L A
 CTTACCAAAGGAATGCTTCATCCTTGAGGGTACTCTCAGGGTGTCTCAGGCCACCGTGAACGCCATGTCTCA 365
 S S P K E C F I L E G Y S Q G A Q A T V N A M S Q
 GTTGACTGGCGCCAAGTTCGACGCTGTAAAGGGTGTCTTCTCATCGGTGACCCAGCACACAAGTCTGGATTG 427
 L T G A K F D A V K G V F L I G D P A H K S G L
 GCGTGCAACGTGGATAACAACGGTGGCACCACCACCAAGAACGTCAATGGACTTTCCGCAGCACTCGGAGGAG 500
 A C N V D N N G G T T T K N V N G L S A A L G G
 GCATCCCATCCAAGTGGGTTGCCAAGACGCTCGATGTTTGCATCTTTgtatgtatcctggttcatgtcatg 573
 G I P S N W V A K T L D V C I F
 ttacaaaattactaacgcatttgtcagGGTGACGGTGTATGCGACACTACACACGGTGCGGGTATTAACGCTC 646
 G D G V C D T T H G A G I N A

CUT2-R Primer

AGCATCTTCAGTACCCCAACGATGCCCTTACCCAGAAACTGGGTACTGACTACATTAC**CAAGGCGCTTGGTGC** 719
 Q H L Q Y P N D A P T Q K L G T D Y I T K A L G A 792

TTAGGGTGAATGTATCGGAATGAGATGAGTGTGCGTTACATTTTCGGTTATTGTTCCGTGTATGGGCTTACGGA 865
CACTCTTTCTAAATGTATATATTTTATTCGAATGACATAAGGTGCAAATGCTCAGTTACTGAGAACCAAACGCT 938
 GGAATATGCTTGTGTGAACGTCGCGGATACTCGCCACTGCTGTGCGCGTTCTCAGTCCCCCAAGTCTAAATCT 1011
 ATCGGAGCTGACGTACGCGTGCATTGAACCTTTACAGCCATCATAGTCATCTCTACAGGCCCTGCTCTTC

Figura 9 B. Secuencia de nucleótidos de AACUT2, los aminoácidos de cada codón se encuentran debajo, están numerados de lado derecho, la caja TATA, el codón de inicio y fin, CAT, están subrayado. La secuencia de los intrones se encuentra en minúscula cursiva. Los cebadores se encuentran en negrita

C)

TGGGCTACGGCAATAATCCCTGTCCGATCTTCATCACAGGACTGTTTACAGATAAAATTGCGACGACGGATGAAAG -219
 GACCATCTGTGCACCAAGACAAAGCAAACATTACTTTGTACCCCACTGATAGGACATAATGTATAGACGAGG -146
 CAATTGATTCTGCCTAAAGGACAGCTGCAGTGGATACATGAAACTTTCTTTATAAACACATCGCCCCGCTGCC -73
 AGACTTGATCATCACAACCTCCTTGACATCTCAACTCAATCCGAAGCACAGTATCCACTTCCCTCAAAGTCAAC -1

CUT3-F Primer

ATGAAGTTTTCCGCAGCAGCAGCTCTCTTTGTTGGTCTCGCCGCCGCCGGCCCTGTTGAGATCGCTGAGCGTC 73
 M K F S A A A A L F V G L A A A G P V E I A E R
 AGAGCTGCCCCAAGGTCTACATCTTCGGAGCTCGTGAGACCACACAACCCCAAAGCAATGGCTACGGTACCGC 146
 Q S C P K V Y I F G A R E T T Q P Q S N G Y G T A
 TGCCGGGCTTGTAAACTCGGTCAAGTCCGCCTACCCTGGTGCGGGCTCCGAAGCCATCGTGTACCCAGCTTGC 219
 A G L V N S V K S A Y P G A G S E A I V Y P A C

GGTGGAGGCTCTTCCCTGCGGAGGCGTATCCTACGACAACCTCTGCTTCCCAAGGAACCGCAGCGGTTGTCAAGG 292
 G G G S S C G G V S Y D N S A S Q G T A A V V K
 CCGTTACTGCCTACAACCAGAAGTGCCCTAGCACTCAGATCGTCCTTATTGGATACTCTCAGGtatggatggt 365
 A V T A Y N Q K C P S T Q I V L I G Y S Q
 gtcataaaccgaacgacgccaatgctaacagttttagtagGAGGTCAAATCATGGACAACGCCATCTGCGGC 438
 G G Q I M D N A I C G

GGTGCTGGTTCCACTTTGACAGGCAACGCCCTCAAGGCCGTCAAGGCCGGCGATCTTCATGGGTGACCCACACA 511
 G A G S T L T G N A L K A V K A A I F M G D P H
 ACCGCAACGGTCTTCCCTACAACGTCGGTACTTGCAAGGCCCAAGGCgtaagtccactatcttccaactctt 584
 N R N G L P Y N V G T C K A Q G

ggatttcttactaactgagtagtctttagTTCGCCGCCGCCCTGCTGGATTACCTGCGCACCTGCCAGCAGCAG 657
 F A A R P A G F T C A P A S S S

CATCATCCAGAGCTACTGCGACTCTCAGGACCCATACTGCTGCAATGGAAACGACGCCAACCCACCACCAGCAG 730
 I I Q S Y C D S Q D P Y C C N G N D A N H H Q Q

CUT3-R Primer

TACGTCAACATCTACGGCAACCAGGCTCTCACCTTTCATCAAGAGCAAGGTCACTGCTTAAAGTGCATCTTTGGC 876
 Y V N I Y G N Q A L T F I K S K V T A
 ACGAACAGTGGAAATCAAAGCTGGCCGGCACCTATCGCAGGTGCCATTCTTCGATGTAAATATGAATCAAAT 949
 GAACATGTATATGCCTTAAAGTTCTAAATCGCTTGTCTCGCCACTTCTCGGATTGCTATGTGGTGTCTAGC
 ATTCACAGGTCTATATCAGGCAGTGTCTCTCCGTTGATGTCCCCGGTGCCAGGTTCTTATCGATATCACTCG 1022
 TCCAGTGTAACACTTGTTCACACACCGACATCATTCTCGCCGATTCAATCGGTAGTACTGTCTGTCTGCTACGG 1095

Figura 9 C. Secuencia de nucleótidos de AACUT3, los aminoácidos de cada codón se encuentran debajo, están numerados de lado derecho, la caja TATA, el codón de inicio y fin, CAT, están

subrayado. La secuencia de los intrones se encuentra en minúscula cursiva. Los cebadores se encuentran en negrita.

TTGGCAAGCAGTATGATTCATTTCCAGTGCAATGCGGTTTCGACACAATACGACCATCACCAAGGAGTACG	438
GACGTGCAGCAGGCGGGTACGCGAACTAAGCCCCGGCAGTCTTCGAAGACCAAGGCCATAAGGTTGGT	365
TACCAGGACAAGAGAGATGTTCCCCCACCGAAGGTGATCCTCTCCGAGCGGCCCCGAAAAGGTAGGTCAT	292
TTTGACATTAATGGCTGGATAATGTTGCCAGGCCGCACTAAAAGC <u>CAAT</u> CCTTGTCCCTGGAGACCATATG	219
TCGTTTTCGACGCGCACGGACTGAAAGAACCTGAGCGCCAAGTTCGACGTCCCCTATGCACGCTGTAGAGCT	146
ATCCCATGATCAAATCTTTCACAGGACTGCATCCTTACGATAGGATCTTTATAGCTGCTGACCGGAGGTC	73
CATACTAAAAGCTCCAGCTTTCAGCGAGTTGTTTTTCATCATCCAAGGTTCCCTTCCAGATCCACTCTACC	-1
CUTI-F Primer	
ATGGTTCGCGTCTTTGGCCTCACGCTCCTC GCTCTCCTCGTCCCTGCTTTGGCGGCTCCTGTTCCAGAGG	73
M V R V F G L T L A L L V P A L A A P V P E	
ACCTTGAGGCGCTCAGTCAGGATGTGCAGACGTATGGTcggtctaaaggtgcatattctactcttgag	146
D L E A R Q S G C A D V M V	
ctgacacgcgctcttcaaaggtTGTCTACGCCCGTGGCACCGATCAAGATTCCCCCATCGGTGACCCCGCA	219
V Y A R G T D Q D S P I G D P A	
AGCGTCGGGCTACTCTTCCGAGACAACATCAAGAGCCTCCTCGGTAGCCGCACCTTTTTCTTTCCAGGGCG	292
S V G V L F R D N I K S L L G S R T F S F Q G	
TCAACTACGCCCAACGTCATTGGCTTCTTGCAAGGTGGTGACCCAGCAGGCTCCCGTCAGATGACTAC	365
V N Y A A N V I G F L Q G G D P A G S R Q M T T	
TGACgtaagaagcgctttacctcggtttcatctatgcacgcccgttctgatgaaccactctgctttttgaa	438
D	
atagTTGACCAACGTTGCAAACCTCTTGCCCTAACGtaagtagctaatacttcttgaatgtttcggccggt	511
L T N V A N S C P N	
cattgatcggacggtgacaggCCAAGATCGTCTCCGCGGGATACAGCCAAGGCGGACAGCTCGTCCACAA	584
A K I V S A G Y S Q G G Q L V H N	
CTCTGCTGCTCAGCTCACGGCTGCTGTTTCGCAACCGTATCAACGCTGTTGTCATCTTTCGtgagtagtactgcc	657
S A A Q L T A A V R N R I N A V V I F	
cagcttgatcatgttcgaataactaatcacacatatattttctctcattcaggGCGACCCAAAGAGCGACC	730
G D P K S D	
AAGCCGTTACTGGCATCCCCCTCCAGCAACGTGAAAATCATTGTCACGACGGTGACAACATATGCGAAGG	803
Q A V T G I P S S N V K I I C H D G D N I C E G	
TGGTTTTCATTTACTTCTCAGCACACgtaagtggtcacggcgcttcttggcagaaaatagaactgacgg	876
G F I V T S Q H T	
CUTI-F Primer	
tatgaacacaacagCAACTAC CAGCAAGACGCTCCTGCAGCTGCCCAATTCGTTCTTTCCAAGGTT TAAC	949
N Y Q Q D A P A A A Q F V L S K V	
CGATTGGATCACGGAAAACGATACTAGACTGATACCCTGATTGTATTTTCTGCGTAAAAGAATGCCAGCA	1022
AGCTATATTTCTGCTATCGAGCTATTGGCGATGCAACGTGCGATCTTTCAGTCTAATCATGTGAGCTACA	1095
AGCAAGAAAACCTATCATGCAAAATTATCAACGTGCCTATAGATAACAATTAAGATACTACCAATAATCCC	1148
TTCTTCTATATGGTACAACATATCCCTCATCTTTCGTCACCTCCTTCCCTCCTCTCTCCTTCCCACCTCTT	1221
CACCCAAACATCCATCTTACCCCTACTCTTTTCACTCCCTACATTAACCGTCGCAATAATCCTTCCCCAC	1294
TCCACCGACATTGCAAAAACACGTCAACTCAAAAAAGCTCGAATGTTCCGAATACGGGACTGGGTAAACCT	1367
CTACTTCTTTTCGTACTCTGCCTTGAAGGCTGTAAATCAACATATGTGTAATTGGTTTTCTGTGCTTTGGT	1440
GATGACAGAG	

Figura 10 A. Secuencia de nucleótidos de MRCUT1, los aminoácidos de cada codón se encuentran debajo, están numerados de lado derecho, la caja TATA, el codón de inicio y fin, CAT, están subrayado. La secuencia de los intrones se encuentra en minúscula cursiva. Los cebadores se encuentran en negrita.

TTGTGAGGAGGGCACAGAGCTCTTCCGTACAATCTCTTTGACCTAGTCCTTCAAAATCGAGTAGTAAGCA	-438
TTCAATCAGTCTCGATGGAAACCCCTCTAAATACATTTTCGGCTAAATGTGCTTGGAAACACAATCATTCTG	-365
GCTATCACGTTGGATCCCCTACAAGGGATGAGCAGGTTGAACCATGCTACACCCATGGCACGGGTGCAAT	-292
TTGATGCAGACGGTCTGGATACGTTATCCTGCTCTTTCTGTGCAATCCATGTCAGCAACCGGGGGGGGCT	-219
TAAGTCTTATGCTGGACAACGTTCATGGGCGGGTGAATTCAGACATACGGTTTTCTGTGTTCTGCT	-146
TGTGTATAAAAAAAGCAAATGTCGCGACCGTACCAGCATTCTCCTCTGTCTCTGCCTCCTGTGCTACTGG	-73
TAGCTCCTCTTACATGTTATTCACCTACGCTTCGATTGTTGTTCTTCACTGGGCTGGTCCCAGGGATCATG	
<u>ATGGCTCCCGTTGAGCGCAGAGCCACCGTGCAGTGC</u> CGGACGTTATGGTt	-1
<u>cg</u> ccctcttgcccgagt	
M A P V E R R A T V Q C A D V M V	
ctttgagccattaaagacaatgatttacaggtATTCTTCGCGCGGGGA	73
ACTACGGAACCTGCCCGATC	
F F A R G T T E P A P I	
GGCACTATCGTCGGCCCTCCGCTCAAGGCGGCTCTGCAGCGAGAGCTCGGGTCACAGACCATGTCTTTC	146
G T I V G P P L K A A L Q R E L G S Q T M S F	
CAGGGAGTAGACTATTCTGCAAATGTTGCAGGCTTCCTCCAAGGAGGTGATAAGCAAGGGTCTCGTACT	219
Q G V D Y S A N V A G F L Q G G D K Q G S R T	
ATGGCGGATGACgtaggggagtactaaccgtagcttaaacccttgcttacgcacctcccagATTACCAAC	292
M A D D	
I T N	
GCAGCTAATTCGTGCCCGAATGt	365
cggtccttttcattctccattccatttccactgacagagaaat	
A A N S C P N	
atcaggCGAAAATAGTGACAGCAGGTTACAGCCAGGGTGGGCAGCTGGTTCACAATTCTGCCGAAC	438
T T T	
A K I V T A G Y S Q G G Q L V H N S A E L	
TGTCGCCAGACGTGGTGTCTCGCATTAAACGCCGCTGTGATTTTTGTAGGTTGAACCCAGAAACAATG	511
L S P D V V S R I N A A V I F V	
G	
AGAATATACTGATCTCGGGGTTATCTCTAGGGTGACCCAGACAACGGACAGCCTGTAGCAGGAGTTTCTG	584
CTGATAGGACAAAAGTAACTTGTGCAAAGGGTGATAATATTTGCGATGGGGGTAACCTGGTATTGGCACC	657
TCATCTGTGAGAGTCGTTCTTGTGCATCCTAAATATCGTGGTTCGTTGAACTTTGAACGATAGGGCTTACG	730
GACGGGATACGCCGGGTAGTGCAGCTTCATAGCTTCGAAAGTTTAGTGACCCTAGTAGGCACCCCGTTT	803
GATACCGCTGTATTGTCAACCTGTGCCAAATAGTTTGTATGTACGAATGAAGTGGACTCGCTGGACTCAC	876
TGTTAGTGTAGAGTCAAACCATTGCTTGGGACTGATTTTTTTTTTTTGGCCTGTTATGGGCGTCATAAGAAA	949
AGAAGCGTTGGTGGCTGTGACGACATGGTTAGCTCAACCGCTCAGACTCGGACCGTGACACTCACT	1015

Figura 10 B. Secuencia de nucleótidos de MRCUT2, los aminoácidos de cada codón se encuentran debajo, están numerados de lado derecho, la caja TATA, el codón de inicio y fin, CAT, están subrayado. La secuencia de los intrones se encuentra en minúscula cursiva. Los cebadores se encuentran en negrita.

GCAC
TCCTCCGGCATCCGCAAATAGTGCTGTAGGAAGCAAGTCTTCAAGACACAAGGTGCATTTCATTACGGAAGT
CATAGGACTATGGTGTACAGCACTAGCCTTATTTACGCATACAAATGAATTCTCCTGCAGGCTACTGACT
CTGTTGCAGTTATAGTGCTGTGGTTATGCCGAATCAACTTTCCACGCTCAACCTGGCAACCTGGGCGAGTC
CCGGATGCAATTTCTTCTCTTGATTAAGTTGAGTCGTATTCAAAAACCTCTAGGTTGGAAGTCTTCGAGAC
AGCAGGTGACCTTGTCTCTGCTCTGCGAGTACCTTGTCAAAGCTTCTCAATTGTGTAGCCCGGTCGGTCTGA
GAGCCGGCATGCAAATAAACCACTTGTGAGTAGGAAAACACAAGGAAGAAGGTATACTAGACTCCTATAA
ATTGTGAATCTCAAGCTCTTGTGCACCTCGTCCCCAGCGACAATCCAGCACAGTTCAGTACCTAACAAAG
ATGTTCACATCTGTTGCGCGCCTCGTCCCTCCTCCTTGGGATCTTGACCCCTGCTTTTGCAGCCCCCTTGGC
M F T S V A R L V L L L G I L T P A F A A P L A
TGAACGAGCAGAATGCGCAGAAGTGATGGTGAgtagacaagtcctaataactaacagtataacttgtctaacac
E R A E C A E V M V
gtcgatccgaaaggtgaTATTTGCGCGAGGCCACCACGGAAACGCCACCCATTGGTATCTTCGTGCGACCGC
I F A R G T T E T P P I G I F V G P
CCTTTGAGGACGCAGTACTAGTTTCTCAGCTTGGAGGGAGGTCCTTGTCAATCCAAGGCGTCGATTATGCCGCA
P F E D A L V S Q L G G R S L S F Q G V D Y A A
GATATTGCGGGGTTCTTGGCAGGGGGTGACCCAGCGGGTTCACGGCAAATGGCGATCGACggttggttctct
D I A G F L A G G D P A G S R Q M A I D
tttctggtttcttgcatacttcacccgaactttcttgccagATCACTAACACGGCTAATGCCTGCCCAAAC
I T N T A N A C P N
GtgagtcaaggcgatgtattcaagctggtattaatcttatatctttgacaggCTAGAATCGTGTCTCAGG
A R I V S S G
CTACAGTCAGGGTGGTTCAGCTCGTGCACAACCTCAGCCGCGTTACTTTCTCGAGACATAGCTGCACGTATCA
Y S Q G G Q L V H N S A A L L S R D I A A R I
ACGCTGTTGTTCATCTTTGtcagtcgcctctcctatgcctcgcttcgctactggattgacaataactcaaggG
N A V V I F
TGATCCGAAACGGGGACAGCCAATCTCCGGCGTTGACTCGAGTAAGGTGAAGGTCTTCTGTACAGATGGAG
G D P K R G Q P I S G V D S S K V K V F C H D G
ATAACATTTGCGATGGAGGCATTCTCGTTCTGCCGCTCATTTGtaagtgatttccttacagaccgtgacc
D N I C D G G I L V L P P H

tttgggtccggtggctcaacttcctgcctcaggAATTACGTGGTTAATGTTGTTGACGCGGCAAATTCGTTGT
L N Y V V N V D A A K F V
GTCAAAGTTGAGAACTCGAAATTGATTTGA
K F V K S J V S K L

CGTCCTGGTTACTAACTGTACTATATGCTGTCATCTCCTTTTTATTCCGTTATCGTGTATGAATTCTGCTAC
TACCGAATCTAAATTGTTTGTGTTTGTAGATTCTATTGGCCCACTGAGCATTAGAGGGGGTATAGACAGATAG
TTGTGTGGGCATCAAGTGGGGGCTTGAAGAGTGTGGCGCTGGTCAAGCGCCAACAAGTTGGAAGTCAAGT
TCCCCCCCACGCGCTTGACTTCACATCTGTGGTGGGCTCCGTACCTCAAGCTCCTGGAATCGTTGTGATA
GTTTCAATTTAGCTCAAGGTTGTACACTACTGCTTCATGTAGTCAACGCTCTTTCTTCTGGCGCACGCTA
GTCACTACTCCAGCAGATTTGCCTGCCATGACAATTACCGTTGAAGTTCATGAATAGGCCGTCGTAGATAG
TAATAATATTCGATGATTCTACTATTGATATATGAGGGACAGCCGTAAGATATGT

Figura 10 C. Secuencia de nucleótidos de MRCUT3, los aminoácidos de cada codón se encuentran debajo, están numerados de lado derecho, la caja TATA, el codón de inicio y fin, CAT, están subrayado. La secuencia de los intrones se encuentra en minúscula cursiva. Los cebadores se encuentran en negrita

7.1.2 Árbol filogenético de genes de cutinasas

Se realizó un árbol filogenético (Figura 11) basado en la secuencia de los genes de cutinasas de diferentes aislamientos de hongos, muestra que las 3 secuencias de cutinasas de *M. roreri* la MRCUT1 y la MRCUT2, los cuales muestran una similitud de 55 % con la medida de bootstrap, en comparación con la MRCUT3, esta se agrupa en el mismo taxón que las de otras dos de cutinasas de *M. roreri*, la similitud con la medida de bootstrap es de 99% para esta última. Las cutinasas de *M. roreri* se unen al clado donde se encuentra las cutinasas de *A. nidulans*, las cuales ya fueron estudiadas por Castro Ochoa *et al.* 2012.

En el árbol filogenético se encuentran las cutinasas putativas de *A. Alternata*, sus secuencias fueron obtenidas directamente del genoma de esta. Por el contrario de las cutinasa de *M. roreri* estas cutinasas se encuentran en diferentes clados, en el caso de la AACUT1 presenta una similitud de 71 % de bootstrat con la cutinasa de *Purpureocillium lilacinum*, (quien la estudio),

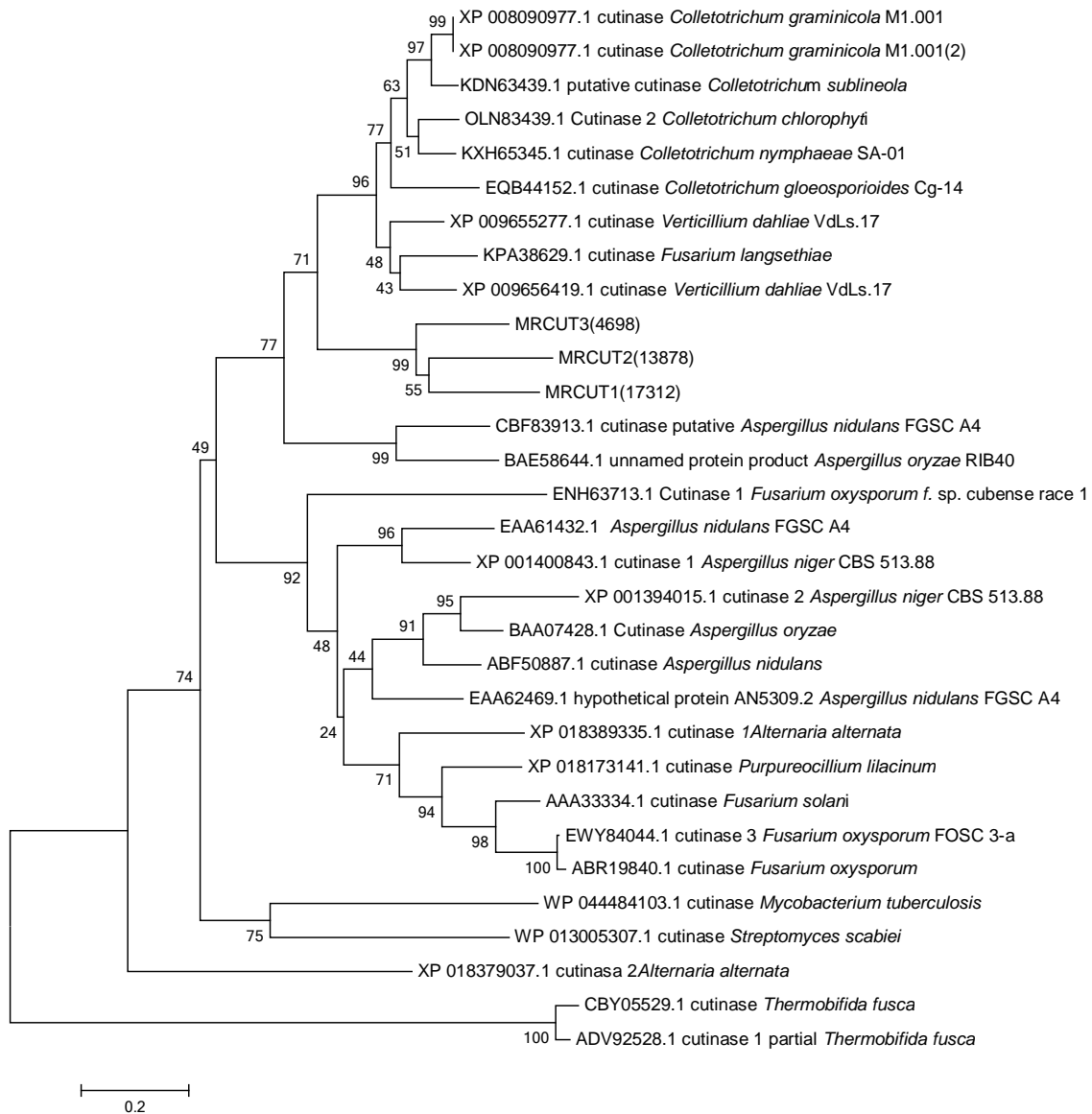


Figura 11. Árbol filogenético de genes cutinasas de *M. roleri* y *A. alternata*

La historia evolutiva se infiere el método Neighbor-Joining [1]. El árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 9.31922869. El porcentaje de repetición en la que los taxones asociados se agrupan en la prueba bootstrap (10000 repeticiones) de árboles se muestran junto a las ramas [2]. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon mediante el método basado en la matriz JTT [3] y en las unidades del número de sustituciones del aminoácido por sitio. El análisis implicó 29 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen lagunas y faltan datos. Hubo un total de 108 posiciones en el conjunto de datos final. Se realizaron análisis evolutivos en MEGA7 [4].

7.1.3 Análisis bioinformático de genes de cutinasas

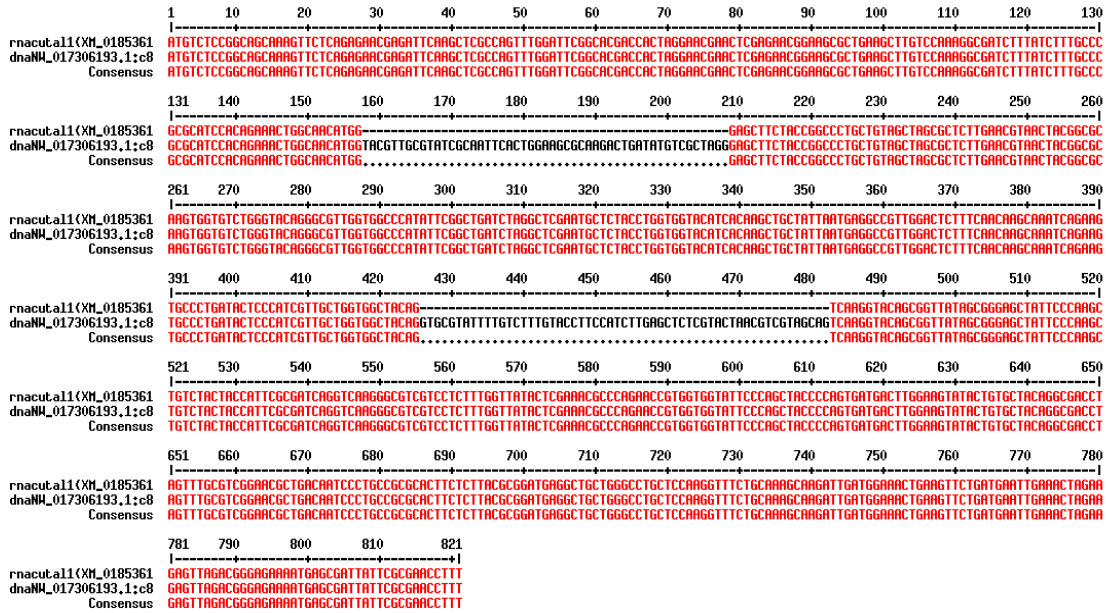
Los resultados del análisis bioinformático se muestran en la tabla 2.

Tabla 3. Resultados del análisis de genes

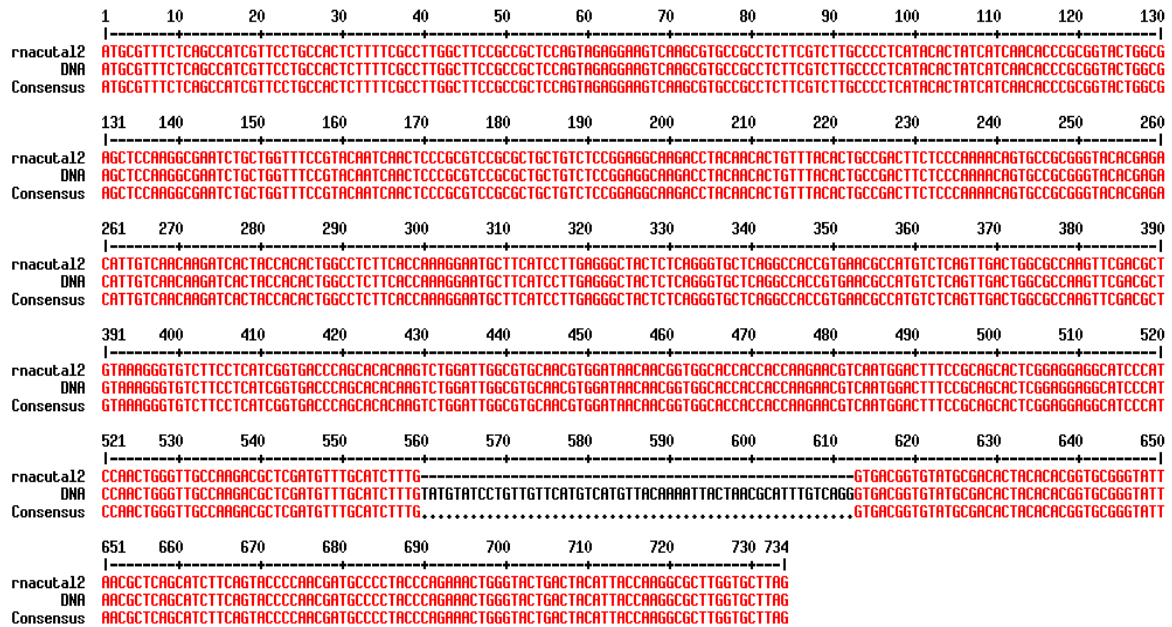
	M.rorcut 1	M.rorcut2	M.rorcut3	AACUT1	AACUT2	AACUT3
Intrones	5	3	5	2	1	2
Peso molecular teórico (kDa)	19.42	13.17	20.55	22.08	21.59	21.69
pl teórico	5.17	5.67	5.52	4.99	7.82	8.32

Las cutinasas muestran pesos moleculares en el rango de 13 a 25 kDa lo cual se ha observado para otras cutinasas de origen fungal (de 20 a 40 kDa), con excepción de la M. rorcut2 que presenta un peso molecular muy bajo (Castro-Ochoa et al. 2010).

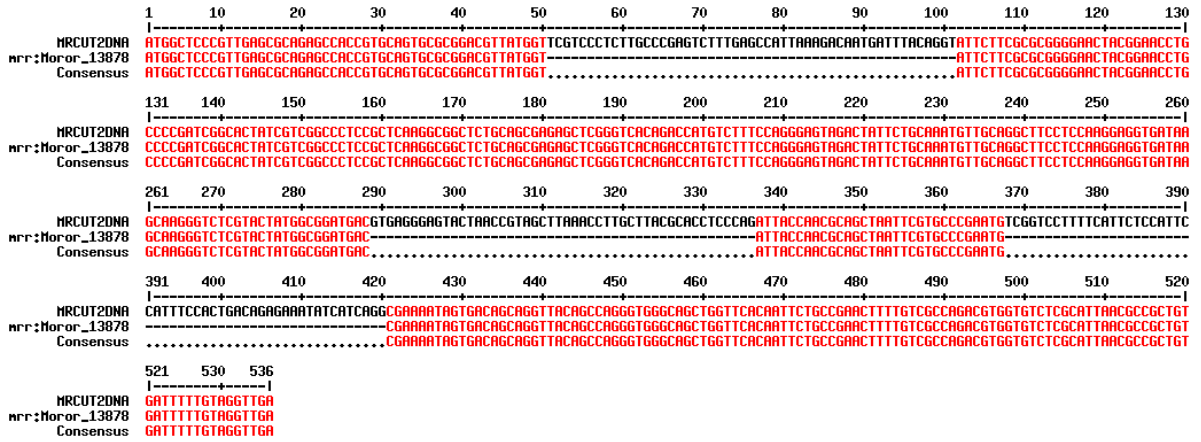
En las siguientes figuras (5-10) se muestran los alineamientos entre DNA y RNA de las cutinasas en estudio, donde se observa la presencia de intrones en todos los genes analizados.



10Figura 12. Alineamiento de secuencia de DNA y RNA de la cutinasa 1 de *A. alternata*.



11Figura 13. Alineamiento de secuencia de DNA y RNA de la cutinasa 2 de *A. alternata*.



14figura 16. Alineamiento de secuencia de DNA y RNA de la cutinas 2 de *M. royeri*.

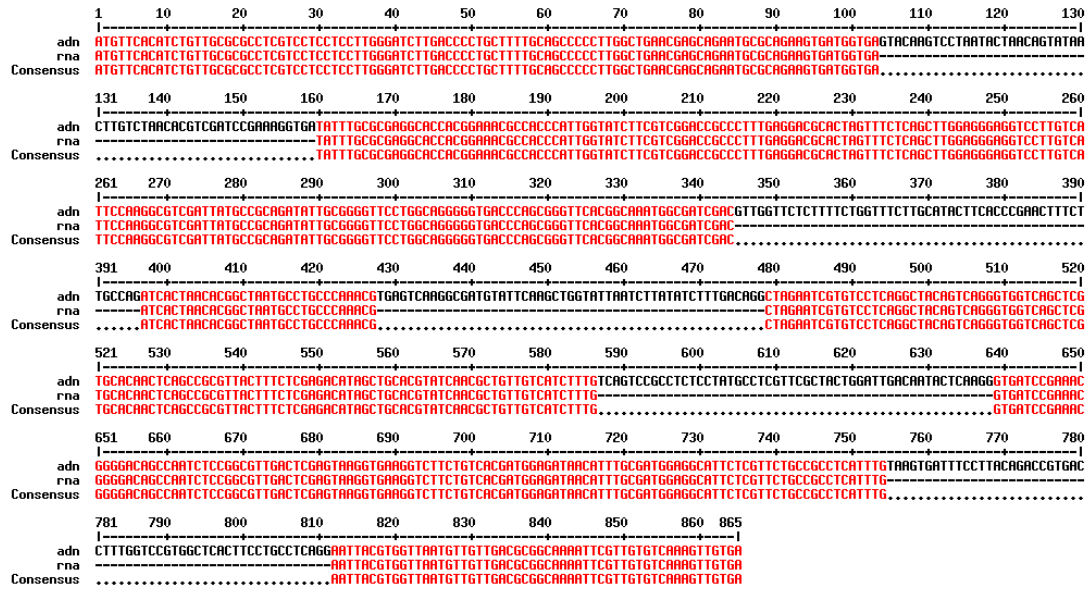


Figura 17. Alineamiento de secuencia de DNA y RNA de la cutinasa 3 de *M. royeri*

7.1.4 Análisis de restricción de genes

Se realizó un análisis de restricción teórico en el cual se verificó que enzimas de restricción no cortaban el gen o parte de él para la selección adecuada de enzimas de restricción que se usaron para la clonación de cada gen. A continuación, se muestra un ejemplo con una de las cutinasas de *A. alternata*.

Enzimas que no cortan el gen *aacut1*:

AarI, AbsI, AflII, AflIII, AgeI, AgsI, AjuI, Aloi, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApeI, Arsi, AscI, AsuII, Aval, AvrII, BaeI, Ball, BamHI, BarI, BbvCI, BcgI, BclI, BfiI, BglI, BglII, BpI, Bpu10I, BsaAI, BsaBI, BsaXI, BsePI, BseSI, BsmI, Bsp1407I, BspHI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BstXI, BtgZI, BtrI, BtsI, CfrI, Cfr10I, ClaI, CspCI, DraIII, DrdI, Eco31I, Eco47III, Eco57I, EcoNI, EcoRI, EcoRV, Fall, FseI, FspAI, HaeII, HindIII, HpaI, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, MmeI, NaeI, NarI, NcoI, NheI, NmeAIII, NotI, NruI, NspI, PacI, PaeI, PfiMI, PfoI, PflI, PmaCI, PmeI, PpiI, PshAI, PsiI, PspI, PspXI, PstI, PvuI, RsrII, SacI, SalI, SanDI, SapI, Scal, P1-Scel, SduI, SexAI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmaI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, SspI, StuI, SwaI, TaqII, TatI, TsoI, TspGWI, TspRI, TstI, Tth111I, VspI, XbaI, XhoI, XhoII, XmnI.

7.1.5 Análisis de cebadores

Se diseñaron los cebadores específicos con ayuda de las secuencias encontradas en el genoma de cada microorganismo y en el banco de genes del NCBI. Los cebadores ya contienen el sitio de corte de las enzimas de restricción que ayudaron a clonar en el vector pPICZ y pET22.

4Tabla 4. Resultados del análisis de cebadores, temperatura media, cantidad de guaninas y citosinas, F: forward, R: reverse

CUTINASA DE	TM DE CEBADOR FORWARD	TM DE CEBADOR REVERSO	CONTENIDO DE GC (%) DE CEBADOR FORWARD	CONTENIDO DE GC (%) DE CEBADOR REVERSO
A. <i>Alternata</i>				
1	66.3	67.4	52.8	51.4
2	63.3	70.4	50	57.1
3	67	69.2	50	56.2

CUT <i>M. Roreri</i>				
1	68.4	69.6	58.3	57.6
2	72.6	69.2	66.7	57.6
3	70.3	67.7	58.3	54.5

7.2 Aislamiento del gen de cutinasa

7.2.1 Extracción de cutícula de manzana

Se retiró la cáscara de 3 Kg de manzana, la cáscara fue tratada con ácido oxalacético como se menciona en la metodología, el rendimiento es de (19.7 g de cutina de manzana / 3 Kg de manzana).

7.2.2 Extracción de ARN

En el genoma de *M. roreri* se observó que se encontraban 3 secuencias de cutinasas putativas. Se evaluó la expresión a nivel transcripcional de los genes de cutinasa a partir de micelio obtenido de tres diferentes medios que contenían alguno de los siguientes inductores aceite de olivo, cutina de cacao y de manzana. Se separó el micelio por filtración, el cual se trituró con nitrógeno líquido y se realizó la extracción de ARN. En la figura 11, se observa el ARN ribosomal extraído. Posteriormente, se sintetizó cDNA a partir del RNA que se extrajo y se usó como templado para la PCR.

En cada uno de los carriles se aprecian las bandas de ARN, en el primer carril se observa el marcador de 1 Kb.

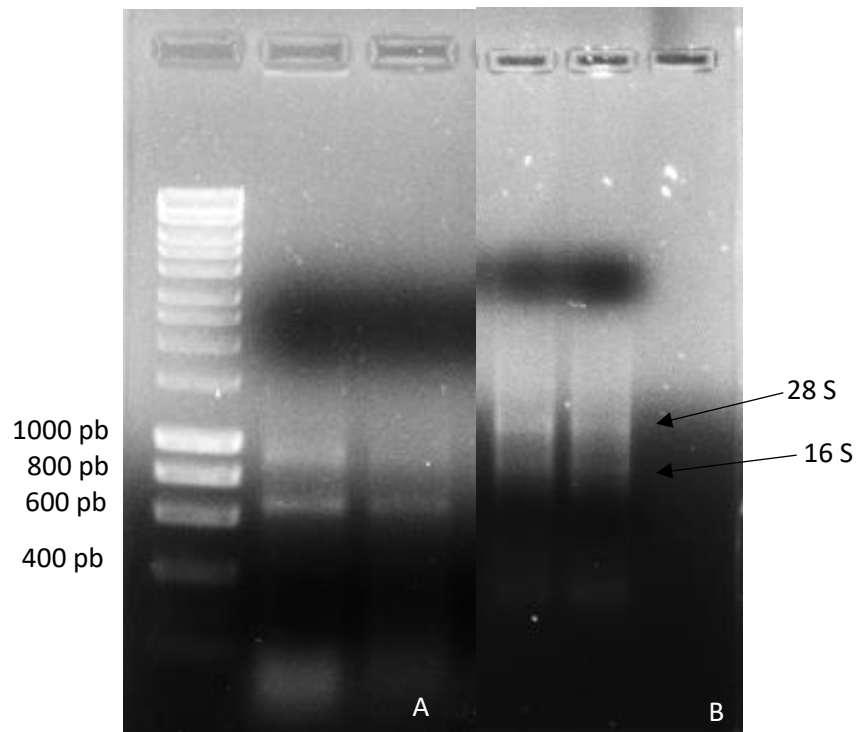


Figura 18. ARN de hongos fitopatógenos. A) ARN de *M. royeri* y B) ARN de *A. alternata* en gel de agarosa al 1%.

7.2.3 Amplificación de los genes por PCR

En el caso de *M. royeri*, la cutinasa CUT1(17312) se expresó en el medio mínimo que contenía como inductor cacao mientras que las enzimas CUT2 (13878) y CUT3 (4698) se encontraron en el medio mínimo con cutícula manzana (Figura 12, panel A). No se encontró expresión en el medio con aceite de olivo, a diferencia de lo observado con otros hongos como *A. nidulans* (Castro-Ochoa *et al.* 2012).

De igual forma se obtuvieron los cDNA de los genes de las 3 cutinasas de *A. alternata* con los cebadores específicos. La expresión a nivel transcripcional de las tres cutinasas fue encontrada en medio mínimo con cutícula de manzana (Figura 12, panel B). En 1988, Kentaro estudió una cutinasa de *A. alternata* donde utilizó cutícula de toronja para inducirla.

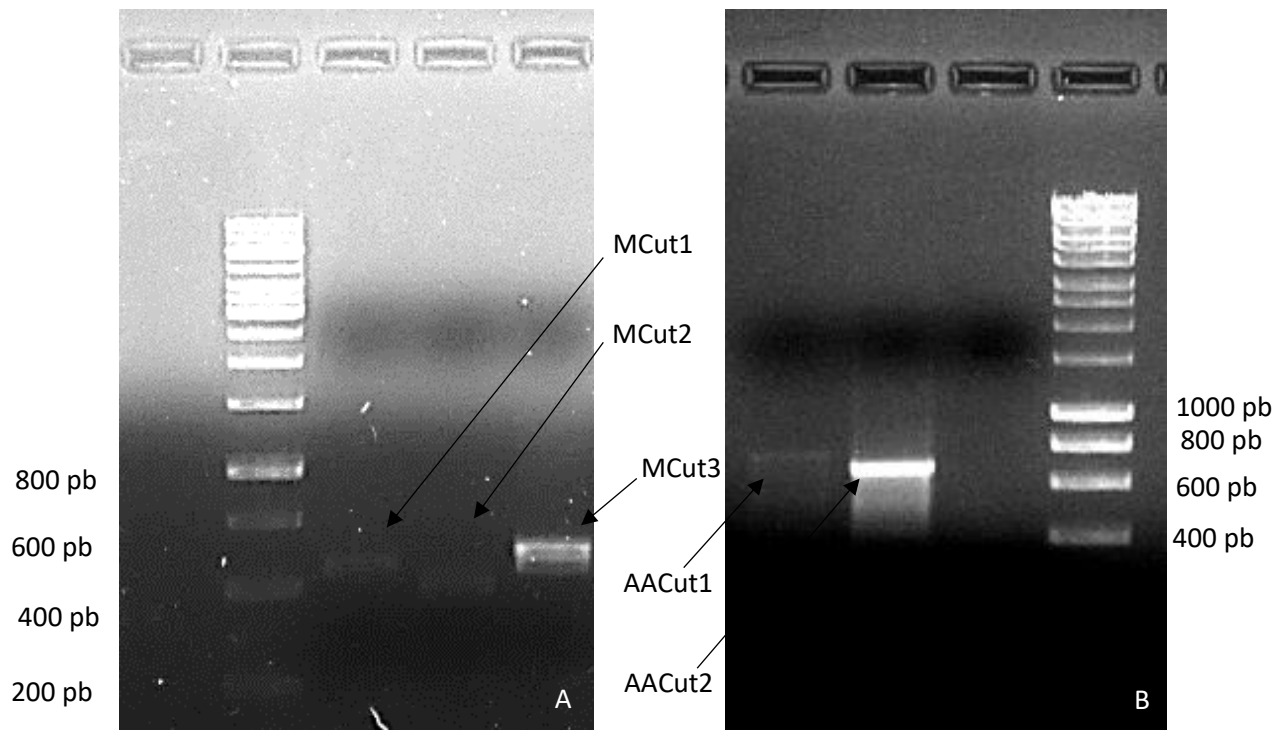


Figura 19. Amplificación de genes.

En el panel A se muestran las amplificaciones de genes de cutinasas de *M. roreri* 1, 2, 3 de izquierda a derecha. En el panel B se muestra la amplificación de los genes de Cutinasa de *A. alternata* CUT1 y CUT2 de izquierda a derecha y en el último el marcador de 1 Kb.

Los pesos moleculares experimentales coinciden con los pesos teóricos esperados para cada una de las cutinasas, los cuales se encuentran en un rango de (600 a 800 bp).

7.2.4 Secuenciación de genes

Los genes obtenidos con la amplificación por PCR fueron secuenciados, donde cada secuencia fue evaluada y comparada con secuencias que se encontraban en el banco de genes del NCBI. La homología y valor de expectancia (E) se muestra en la siguiente tabla 4. Las secuencias de las cutinasas en los electroferogramas enviadas por el Instituto de Biotecnología (IBT) se encuentran en el apéndice 1. En la Tabla 5 se muestran los resultados de similitud con las secuencias del NCBI.

Tabla 5. Resultado de alineamiento de las secuencias obtenidas de los genes aislados con la base de datos del NCBI de cutinasas de *M. roreri* y *A. alternata*.

Cutinasas	Secuencia con la que presentó similitud	% de similitud	Valor de E
<i>mrcut1</i>	M_007850245.1 <i>Moniliophthora roreri</i> MCA 2997 cutinase partial mRNA	98	0.0
<i>mrcut2</i>	XM_007844694.1 <i>Moniliophthora roreri</i> MCA 2997 cutinase partial mRNA	95	2e-73
<i>mrcut3</i>	XM_007847403.1 <i>Moniliophthora roreri</i> MCA 2997 cutinase partial mRNA	99	3e-124
<i>aacut1</i>	XM_018536129.1 <i>Alternaria alternata</i> cutinase partial mRNA	96	9e-44
<i>aacut2</i>	XM_018536129.1 <i>Alternaria alternata</i> cutinase partial mRNA	98	0.0
<i>aacut3</i>	XM_018535090.1 <i>Alternaria alternata</i> cutinase partial mRNA	96	2e-43

Valores se obtienen al comparar con la base de datos del NCBI.

Las secuencias obtenidas de la amplificación con los primers específicos se les realizó un alineamiento con las secuencias que se encuentran en el ncbi utilizando la herramienta blast, presentando una mayor similitud la secuencia CUT3 con un 99% en comparación de la cutinasa parcial que se encuentra en el NCBI, en el caso de la CUT1 de *M. roreri* presentó una similitud del 98% en comparación con la secuencia *Moniliophthora roreri* MCA 2997 cutinase partial mRNA.

De las secuencias obtenidas de los genes de cutinasas la Mr.cut1 no presento intrones, las Mr.cut2 presento un fragmento de intron de 60pb. En el caso de las cutinasas obtenidas de *A. alternata* dos de estas presentaron intrones, por lo cual no se pudo seguir trabajando con estas secuencias.

7.3 Clonación de genes de cutinasas

7.3.1 Clonación de genes de cutinasas en el vector de clonación pJET

Los genes de *A. alternata* y *M. roreri* fueron insertados en el vector de clonación pJET. Se transformó *E. coli* con estos vectores con el fin de obtener plásmido suficiente que contenga el gen de interés para su posterior secuenciación. Los resultados de secuenciación mostraron que el gen de la cutinasa 1 de *M. roreri* no contenía intrones ni diferencias con la secuencia reportada en el genoma de *M. roreri* en el NCBI, por lo que se decidió trabajar con este gen para la clonación y su expresión.

En la figura 13 se muestra la construcción con el vector pJET con el gen Mr.cut1 en el panel A, en el panel B se muestra el gen Mr.cut1 obtenido de una PCR de colonia.

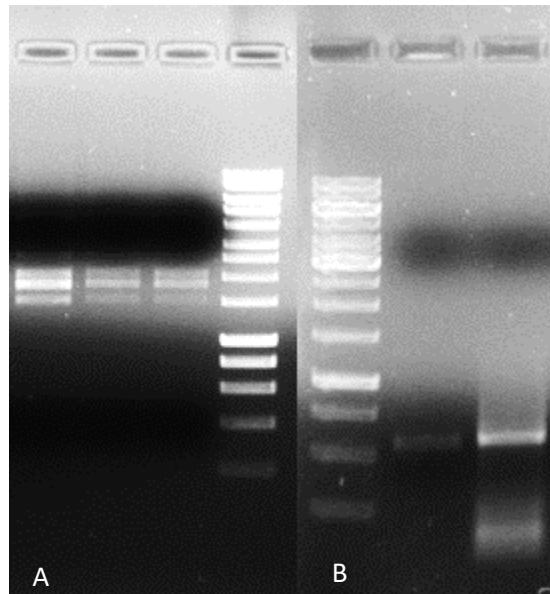


Figura 20. Vector pJET1.2

En el panel A se muestra el vector pJET1.2/blunt. En el panel B se muestra la amplificación del gen de la Cut1 de *M. royeri* utilizando como templado el vector pJETmrcut1.

7.3.2 Clonación de genes de cutinasas en el vector pPICZ

Se extrajo el vector pPICZ con el kit de extracción de plásmido de la cepa *E. coli* que lo contenía (Fig 13a). Los genes de cutinasas y el plásmido pPICZ se cortaron con dos enzimas de restricción. En la figura 13B se muestra de izquierda a derecha, el plásmido sin digerir seguido del plásmido digerido con las dos enzimas de restricción, el gen de cutinasa 1 de *M. royeri* sin digerir y digerido. En los últimos tres carriles se encuentran las ligaciones del plásmido con el gen de cutinasa 2 en diferentes proporciones de vector-inserto.

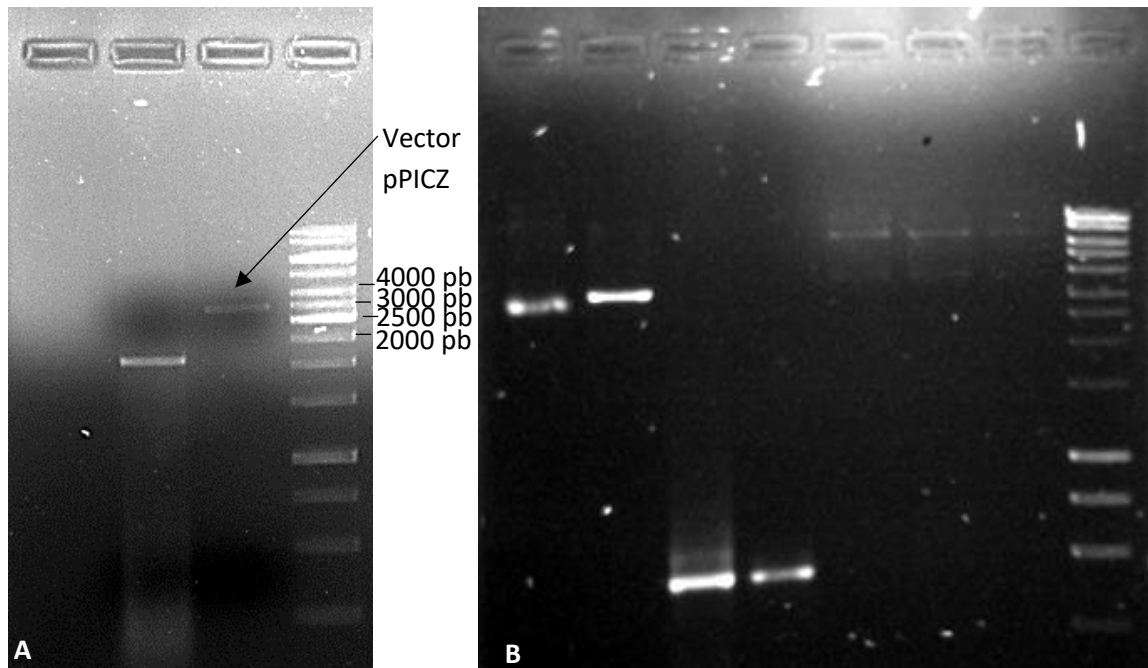


Figura 21. Plásmido pPICZ

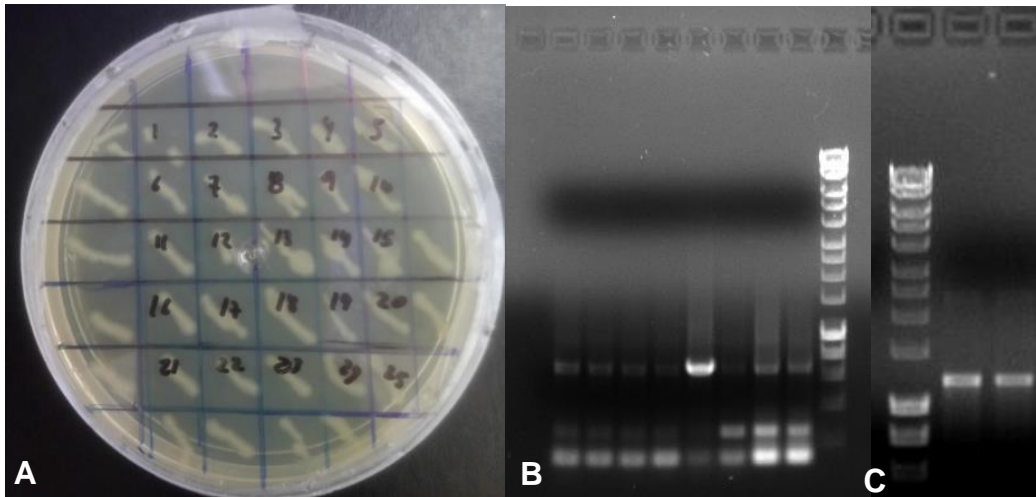
Obtención del plásmido pPICZ en el panel A. En la figura B se observa de izquierda a derecha el vector sin digerir, el vector digerido, gen de cutinasa 1 y gen de cutinasa digerido y las ligaciones del vector con el gen de cutinasa 1.

Las ligaciones fueron insertadas en *E. coli* DH5 α mediante el método químico, con cloruro de calcio. El vector con el gen ligado (pPICZ MrCUT1) se extrajo con una concentración necesaria de plásmido para la posterior transformación en *P. pastoris* (X-33).

Las células que contenían el vector con el gen de interés fueron seleccionadas por crecimiento en presencia de zeocina, un antibiótico que contiene cobre el cual se reduce y se elimina por la célula. Al eliminar el cobre, la molécula de zeocina es activada para atacar el ADN, las células seleccionadas tienen un vector el cual contiene el gen de bleomicina *Streptoalloteichus hindustanus* (Sh ble) la cual se une al Zeocina e inhibe su actividad de escisión de la cadena de ADN y por tanto tienen la capacidad de crecer en presencia de este antibiótico (Calmels et al., 1991, Drocourt et al., 1990, Gatignol et al., 1988).

En la figura 14A se observan las células resistentes a zeocina, las cuales contienen el vector que da resistencia, este vector también contiene el gen de la cutinasa de

M. royeri. Adicionalmente, se realizó una PCR de colonia, con los cebadores específicos para la cutinasa 1 de *M. royeri* (Fig 14B). También se realizó una PCR con el plásmido que se extrajo y con los cebadores universales de AOX contenidos en el plásmido para verificar la correcta inserción del gen de la cutinasa 1 de *M. royeri* en el plásmido (Fig 14C).



20 **Figura 22.** PCR de colonias.

A) Colonias de *E. coli* DH5 α con MrCUT1 en caja Petri con medio sólido LB + zeocin. B) PCR de colonia con cebadores específicos para la cutinasa. C) Amplificaciones con los cebadores universales AOX.

Se observa que la amplificación con los cebadores específicos da el peso molecular esperado de amplicon para todas las colonias evaluadas. Se observa una banda más intensa para la colonia 5 (carril 5 de izq. A derecha).

La amplificación con los cebadores universales AOX dió un amplicon con el peso molecular esperado al añadir las secuencias contenidas en el vector al gen insertado (aprox. 1200 bp).

Estos amplicones también se secuenciaron y se verificó que corresponden al gen de la cutinasa 1 esperado.

7.3.3 Clonación del gen de cutinasa en el vector pET-22

Se extrajo el vector pET-22 con el kit de extracción de plásmidos de la cepa *E. coli* que lo contenía (Fig 15A). El gen de cutinasa y el plásmido pET-22 se cortaron con dos enzimas de restricción y fueron ligados con la ligasa T4, se dejaron crecer por

12 h, después de su crecimiento se pasaron a una caja Petri con LB más ampicilina para aislarlas(Fig15B), a estas colonias aisladas se les realizó la extracción de plásmido y se observó que de las 10 colonias obtenidas 7 de estas presentaban un plásmido con un tamaño de ~6000pb, que es el tamaño esperado con el gen de 513 pb+el vector con 5493 pb (Fig15C).

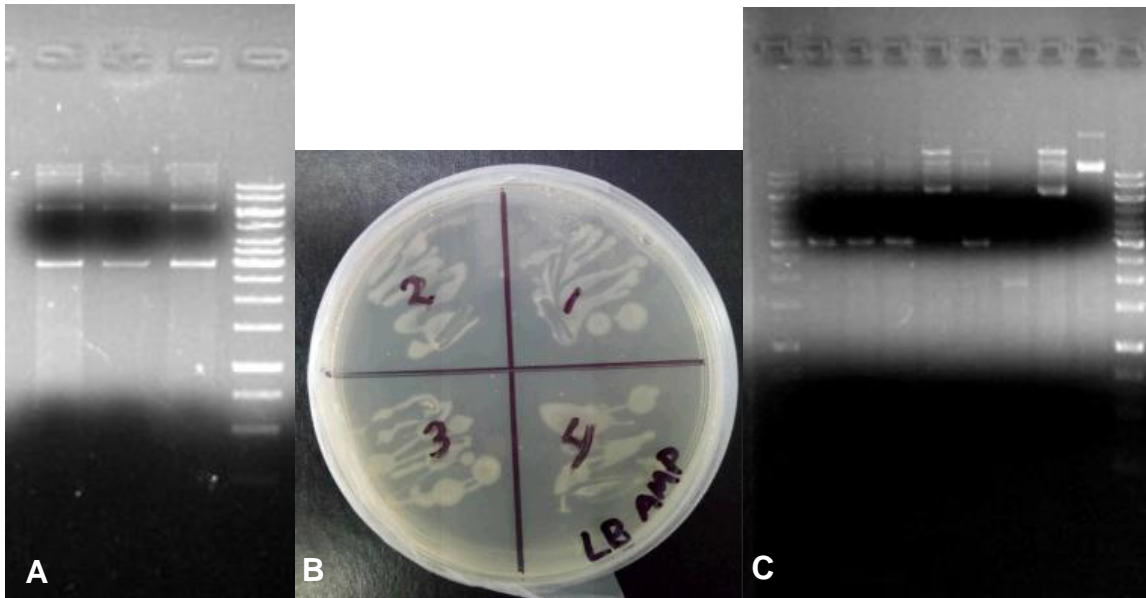


Figura 23. Clonación en PET22

A) Obtención de plásmido de pET22 para hacer la transformación de colonias de *E. coli* BL21 con petMrCUT1 en caja Petri con medio solido LB + ampicilina. B) *E. coli* con el vector de expresión C) Extracción de plásmido de las colonias obtenidas después de la transformación.

7.4 Expresión de la enzima CUT1MR

La cepa BL21 con el vector CUT1MR se creció en 2 mL de LB por 12 h, se pasó a un matraz de 1000 mL con 400 mL de LB y se incubó por 4 h, se le agregó una concentración de 0.4mM de IPTG, se centrifugó el medio a 10000 rpm por 20 min, el pelet celular se sonó utilizando el equipo (----) a 65% por lapsos de 20 s, el sobrenadante obtenido se ultrafiltró con membranas de 10 KDa.

Mediante la prueba de actividad cualitativa sobre acetato de α -naftilo como sustrato y fast red como revelador se comprobó que las fracciones de los diferentes tiempos de inducción mostraron actividad de esterasa, debido a la presencia de coloración rojo/marrón que se observó por causa de la hidrólisis de acetato de α -naftilo

liberando el α -naftol que forma un compuesto cromógeno de color/marrón al reaccionar con Fast Red.

Se puso un control negativo, el cual contenía el buffer donde se encontraba la enzima y la cepa BL21 nativa, en donde se comprobó la ausencia de actividad esterasa desde la hora 0 hasta las 6 horas de inducción, ya que a partir de las 2 horas se observó una coloración tenue que se puede atribuir a la presencia de proteínas que la cepa *E. coli* nativa produce.

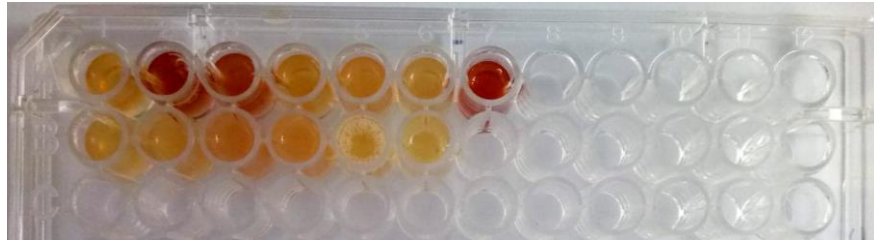


Figura 24. Actividad cualitativa.

Actividad cualitativa de esterasas durante la inducción de ANCUT1. La primera hilera muestra 2, 3, 4, 5, 6, 7 h de actividad y control +, la segunda hilera muestra el control - y la primera hora de actividad.

7.4.1 Análisis de proteínas

7.4.1.1 Perfiles de proteínas en gel de SDS-PAGE

Se determinó el perfil de proteínas en geles desnaturizantes para observar la presencia de las enzimas de interés a lo largo de la inducción en el extracto crudo después del rompimiento de la célula.

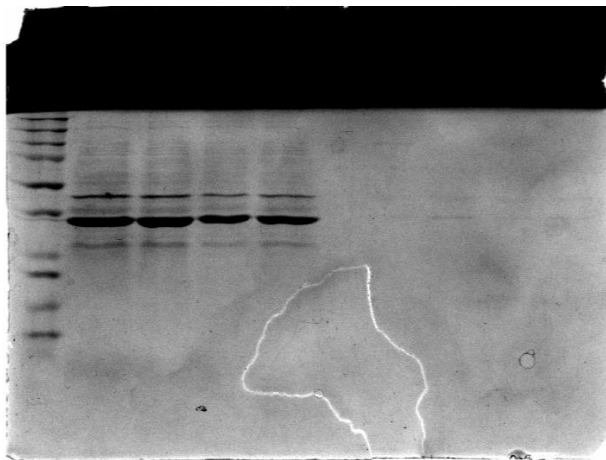


Figura 25. Perfil de proteínas intracelular en gel de poliacrilamida con tinción Comassie en diferente tiempo de inducción. Carril 1, marcador de peso molecular (Low range, Bio-Rad), carriles 2-8 tiempos de inducción 0, 1, 2, 3, 4 y 5 h, respectivamente.

7.4.1.2 Actividad “in situ”

Para observar la presencia de actividad de esterasa en el gel de poliacrilamida que se realizó con el extracto crudo obtenido de la sonicación, se realizó un gel de actividad, en el que no se utilizó B- mercaptoetanol y no se aplicó calor. En la figura 18A se aprecia una banda con actividad de esterasa con un peso molecular cercano al esperado de (19.68 KDa).

Los resultados obtenidos en el perfil proteico y en el zimograma muestran una correlación ya que se observó la misma banda en los dos geles.

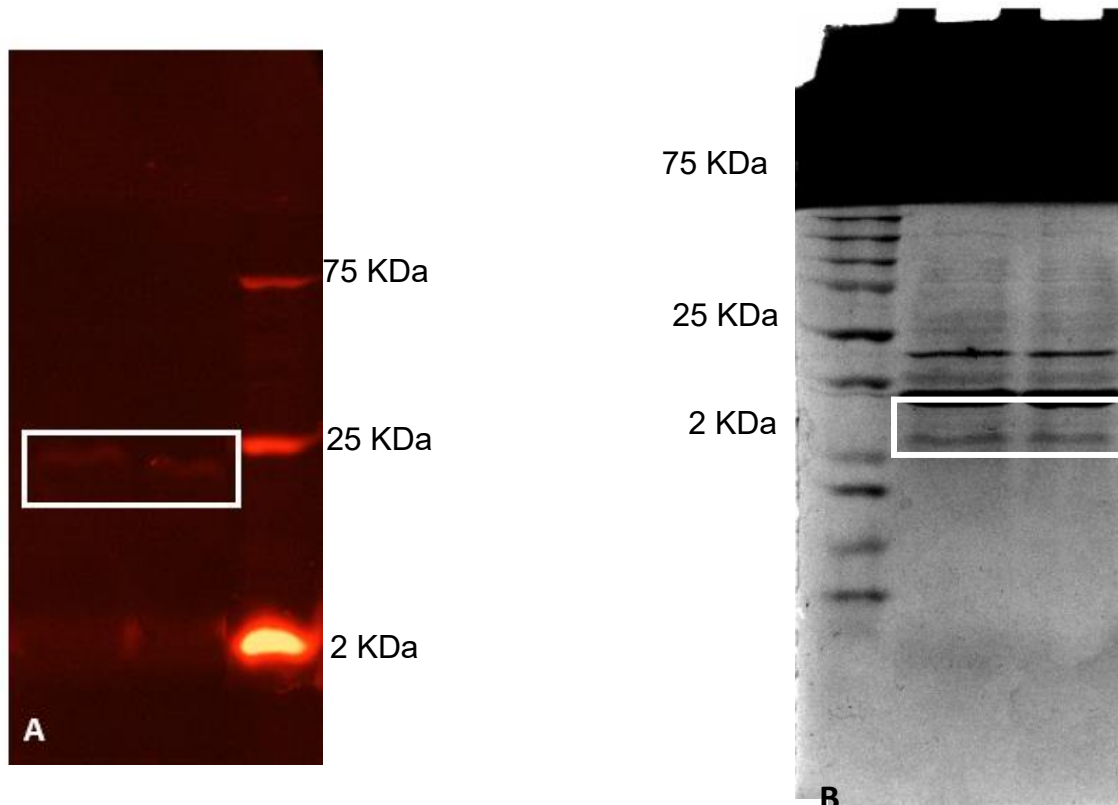


Figura 26. Geles de poliacrilamida

A) Zimograma de proteínas extracelulares B) Tinción Comassie con proteínas intracelular.

7.4.1.3 Identificación de MRCUT1 con Western Blot

Se realizó un ensayo inmonublot (Western blot) donde se verificó que la proteína clonada tuviera la secuencia de polihistidina. Se realizó un gel de electroforesis SDS-PAGE y se realizó la transferencia a una membrana de PVDF. Se obtuvo como

resulto una banda a la misma altura que se observó en los geles de comassie y zimograma, el peso de la proteína teórica es de 19.68 KDa y la banda que se observó en la fig 27 se encuentra entre las bandas de 25 KDa.

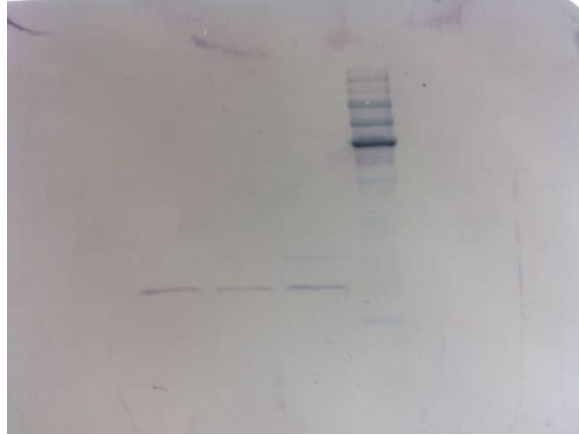


Figura 27. Western blot
Membrana con las proteínas separadas en la electroforesis unida, de las que sólo se disciernen de aquellas contra las que se le ha añadido un anticuerpo

7.5 Purificación de MRCUT1

Se purificó la enzima por medio de una columna de afinidad de cobalto, tomando en cuenta que se le adicionó el fragmento de histidina en el C- terminal que se pegó al cobalto (Co^{2+}). Al finalizar el proceso de purificación se llevó a cabo la prueba de actividad cualitativa, a todas las fracciones obtenidas. Se observó presencia de actividad de esterase en las fracciones del extracto crudo antes de purificar, la fracción se tomó antes de pasar por la columna de elución y después de ser eluidas (enzima pura). Se observó que no se llevó a cabo la unión total de la proteína con el cobalto que contenía la columna. Pero se observó una coloración marrón más intensa en las dos fracciones de elución, esto indicó que la enzima se unió a la columna y fue purificada (figura 28).

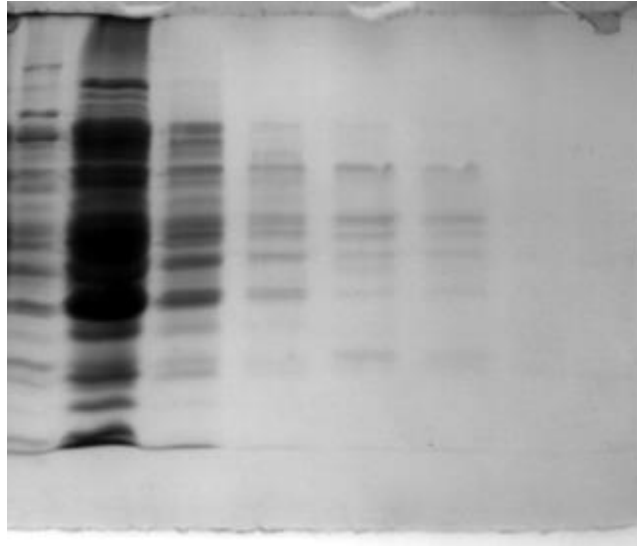


Figura 28. Gel de poliacrilamida con el proceso de purificación

7.4 Conclusiones

Se lograron aislar los genes de las cutinasas de *M. roreri* y *A. alternata*. En el caso de los tres genes de cutinasas de *M. roreri*, la cutinasa 1 se logró aislar en el medio mínimo que contenía cutícula de cacao, la cutinasa 2 se aisló de dos medios, el que contenía cutícula de manzana y el que contenía solo glucosa como fuente de carbono y la cutinasa 3 se aisló del medio mínimo que contenía cutícula de manzana. El aislamiento de las 3 cutinasas de *A. alternata* se obtuvieron en los medios que contenían cutícula de manzana y aceite de olivo.

Con los resultados obtenidos en el proceso anterior se insertaron los 6 genes de cutinasas en el vector pJET.

El gen *M. roreri* CUT1 digerido se clonó en el vector pPICZ para obtener una concentración de plásmido de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de agua libre de nucleasa. *E. coli*.

Se clonó además el gen CUT1 de *M. roreri* en el vector pET22 el cual es un vector de expresión para el sistema de *E. coli* que dirige la enzima recombinante al periplasma.

7.5 PERSPECTIVAS

Transformación de *P. pastoris* con el plásmido pPICZ construido.

Expresar la proteína en el sistema de *E. coli*.

Determinación de la cinética de producción de la enzima recombinante en cada sistema.

Purificación de la cutinasa 1 recombinante de *M. royeri*.

Caracterización bioquímica, de los parámetros de reacción y de especificidad de sustrato de la cutinasa MrCUT1 recombinante.

REFERENCIAS

1. Badenes, S. M., Lemos, F. y Cabral, J. M (2010). Transesterificación of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles. *Biotechnology Letters*. 32(3), 399-403.
2. Bauer, S., et al; (2006). Development and application of a suite of polysaccharide degrading enzymes for analysing plant cell walls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11417-11422.
3. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method dor quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
4. Calmels, T., Parriche, M., Burand, H., and Tiraby, G. (1991). High Efficiency Transformation of *Tolypocladium geodes* Conidiospores to Phleomycin Resistance. *Curr. Genet.* 20, 309-314.
5. Carvalho, C. M., Aires- Barros, M. R. y Cabral, J. (1998). Cutinase structure, function and biocatalytic applications. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 28-29.
6. Castro-Ochoa, D., Peña-Montes, C y Farres, A. (2010). Producción y características de cutinasas: una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 13 (1), 16-25.
7. Castro-Ochoa, D., Peña-Montes, C., González-Canto, A., Alva-Gasca,A., Esquivel-Bautista, R., Navarro-Ocaña, A y Farres, A. (2012). AN CUT2, and extracelular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(5), 1275-1290.
8. Castro-Ochoa, D., Peña-Montes, C y Farre, A. (2013). Evaluation of Strategies to Improve the production of Alkaline Protease PrtA from *Aspergillus nidulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(5), 1672-1682.

9. Chen, Z., *et al.* (2007). Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum Kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(6), 1306-1313.
10. Drocourt, D., Calmels, T. P. G., Reynes, J. P., Baron, M., and Tiraby, G. (1990). Cloning of the Streptoalloteichus hindustanus ble Gene for Transformation of Lower and Higher Eukaryotes to Phleomycin Resistance. *Nucleic Acids Res.* 18, 4009.
11. Evans, h.c., holmes, k.a. and reid, a.p. 2003. plant pathology. phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. 52, 476- 485.
12. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
13. 1. Rand, K.N., Crystal Violet can be used to Visualize DNA Bands during Gel Electrophoresis and to Improve Cloning Efficiency, Elsevier Trends Journals Technical Tips, Online, T40022, 1996. 2. Adkins, S., Burmeister, M., Visualization of DNA in agarose gels and educational demonstrations, *Anal Biochem.*, 240 (1), 17-23, 1996.
14. Gatignol, A., Durand, H., and Tiraby, G. (1988). Bleomycin Resistance Conferred by a Drug-binding Protein. *FEB Letters* 230, 171-175.
15. Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W. y Reets, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipase *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1), 315-351.
16. Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.
17. Kentaro, T., Syoyo, N and Keisuke, K. (1988) Cutinase Production by *Alternaria Alternata* Japanese Pear Pathotype and its Role in Pathogenicity. *Annual, Phytopath. Soc. Lapan* 54:483-492 (1988).
18. Kolattukudy, P. E. (1980). Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science*, 208 (4447), 990-1000.

19. Neves Petersen, M. T., Fojan, P. y Petersen, S. B. (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology*, 85(2), 115-147.
20. Purdy, RE y Kolattukudy, PE (1975). La hidrólisis de la cutina vegetal por patógenos de las plantas. Purificación, composición aminoácidos, y el peso molecular de dos isoenzimas de la cutinasa y una esterasa no específica de *Fusarium solani f. pisi*. *Bioquímica* 14: 2824-2831.
21. Rand, K.N., Crystal Violet can be used to Visualize DNA Bands during Gel Electrophoresis and to Improve Cloning Efficiency, Elsevier Trends Journals Technical Tips, Online, T40022, 1996. 2. Adkins, S., Burmeister, M., Visualization of DNA in agarose gels and educational demonstrations, *Anal Biochem.*, 240 (1), 17-23, 1996.
22. Ruiz, L. R., (2012). Hongos endófitos asociados a estructuras reproductivas de guayabo blanco (*Eugenia uruguayensis*); producción de enzimas y metabolitos bioactivos.2: 386-892.
23. Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
24. Skamnioti, P., Furlong, R. F. y Gurr, S. J. (2008). Evolutionary history of the ancient cutinase family in five filamentous Ascomycetes reveals differential gene duplications and losses and in *Magnaporthe grisea* shows evidence of sub- and neo-functionalization. *New Phytologist*, 180(3), 711-721.
25. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
26. Tiburcio, R.A.; et al. (2010). Genes Acquired by Horizontal Transfer Are Potentially Involved in the Evolution of Phytopathogenicity in *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri*, Two of the Major Pathogens of Cacao. *Journal of Molecular Evolution* 70(1): 85-97.

27. Yang C, et al. (2007) Prevalence of the initiator TATA box in the human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene*. 389, 52-65.

7.5 APENDICES

APENDICE A

Medios de cultivo

Luria bertani

1% Tryptone

0.5% Yeast Extract

0.5% NaCl

pH 7.5

Para 1 L, se disolvieron en 950 mL de agua desionizada 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio. Se ajustó el pH de la solución a 7.5 con 1N de NaOH, se aforó el volumen a 1 L. Se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 15 lb/ sq a 121 °C. Se dejó enfriar a ~ 55 ° C y se agregó el antibiótico Zeocin™, a 25 µg / ml de concentración final. Para placas se le agrega agar 20 g por 1L, meter a autoclave por 20 min a 15 Lb.

Medio PDB

350 g de papa

1 L de agua

20 g de dextrosa

Hervir la papa en fragmentos pequeños, filtrar la mezcla para obtener solamente la solución y agregar la dextrosa, mezclar y esterilizar por 120 min a 15 Lb.

Medio mínimo

M. roreri

KNO₃, K₂HPO₄, MgSO₄ 7H₂O, KCl, FeSO₄ 7H₂O, ZnSO₄ 7H₂O, MgCl₂ 7H₂O, y 0.5% de fuente de carbón.

A. Alternata

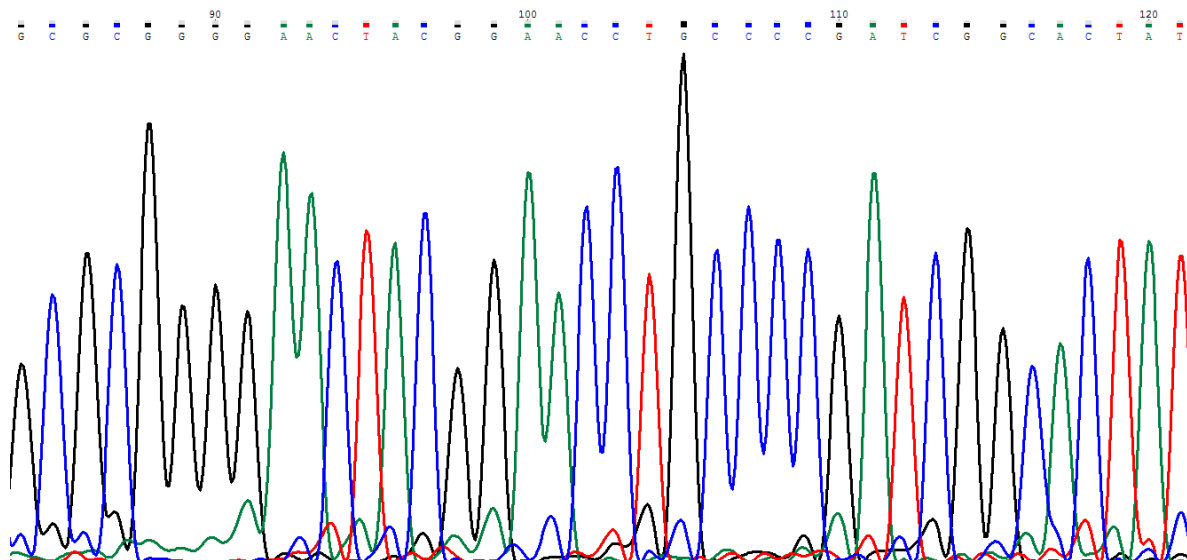
Proteosa peptona, tween 80, urea, KH₂PO₄, (NH₄)SO₄, MgSO₄ 7H₂O, CaCl₂, FeSO₄, ZnSO₄ 7H₂O, CoCl₂, MgSO₄

APENDICE B

Secuencias

>Mrcut1

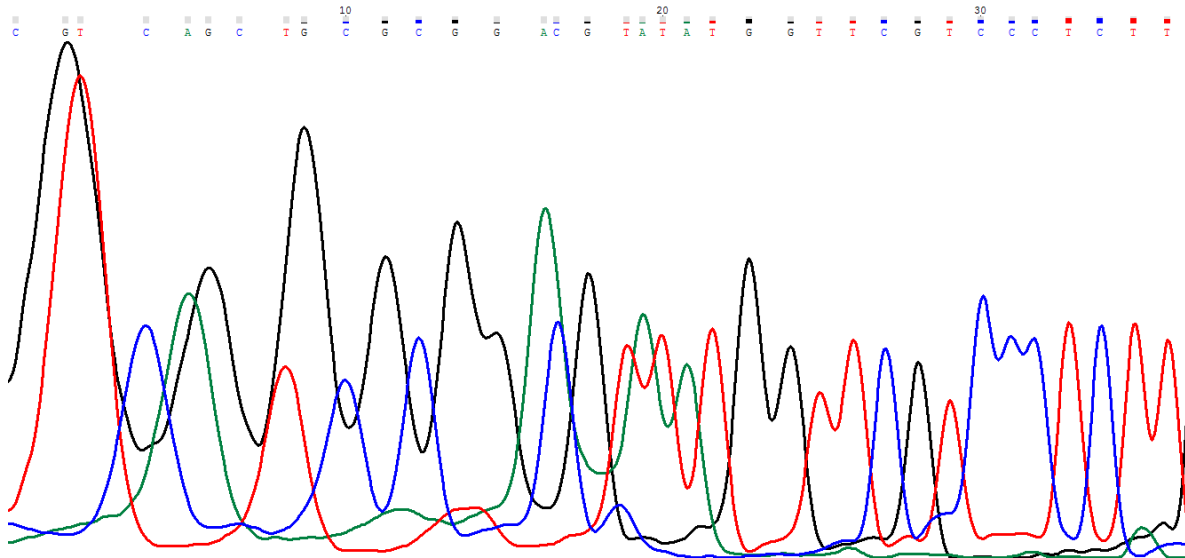
AGGATGTGCAGACGTCATGGTTGTCTACGCCCCKGGCACCGATCAAGATTCCCCCATCGGTGACCCCGCAAGC
GTCGGCGTACTCTTCCGAGACAACATCAAGAGCCTCCTCGGTAGCCGCACCTTTTCTTTCCAGGGCGTCAACT
ACGCCGCCAACGTCATTGGCTTCTTGCAAGGTGGTGACCCAGCAGGCTCCCGTCAGATGACTACTGACTTGAC
CAACGTTGCAAACCTCTTGCCCTAACGCCAAGATCGTCTCCGCGGGATACAGCCAAGGCGGACAGCTCGTCCAC
AACTCTGCTGCTCAGCTCACGGCTGCTGTTTCGCAACCGTATCAACGCTGTTGTCATCTTCGGCGACCCAAAGA
GCGACCAAGCCGTTACTGGCATCCCCTCCAGCAACGTGAAAATCATTGTCACGACGGTGACAACATATGCRA
AGGTGGTTTCATTGTTACTTCTCAGCACACCAACTACCAGCAAGACGCTCCTGCAGCTGCCCAATTCGTTCTT
TC



>Mcut2

TATGGTTTCGTCCCTCTTGCCCGAGTCTTTGAGCCATTA AAAACAATGATTTACAGGTATTCTTCGCGCGGGGA
ACTACGGAACCTGCCCCGATCGGCACTATCGTTCGGCCCTCCGCTCAAGGCGGCTCTGCAGCGAGAGCTCGGGT
CACAGACCATGTCTTTCCAGGGAGTAGACTATTCTGCAAATGTTGCAGGCTTCCYCYAARGAKGGGATAAGCA
CGGCCCTCATACTCWACGATTCTAATTCGCCCCGAMTGTGCGTCTTTTCATTCTCTTTTCCTTTCCCTTTGAT
TTACAATGATCRACARGCGAAAATAGGGGCAGCGGTTACAGCCGGGAGGGCAYTGGGGRAAATTGTGCCRAAC

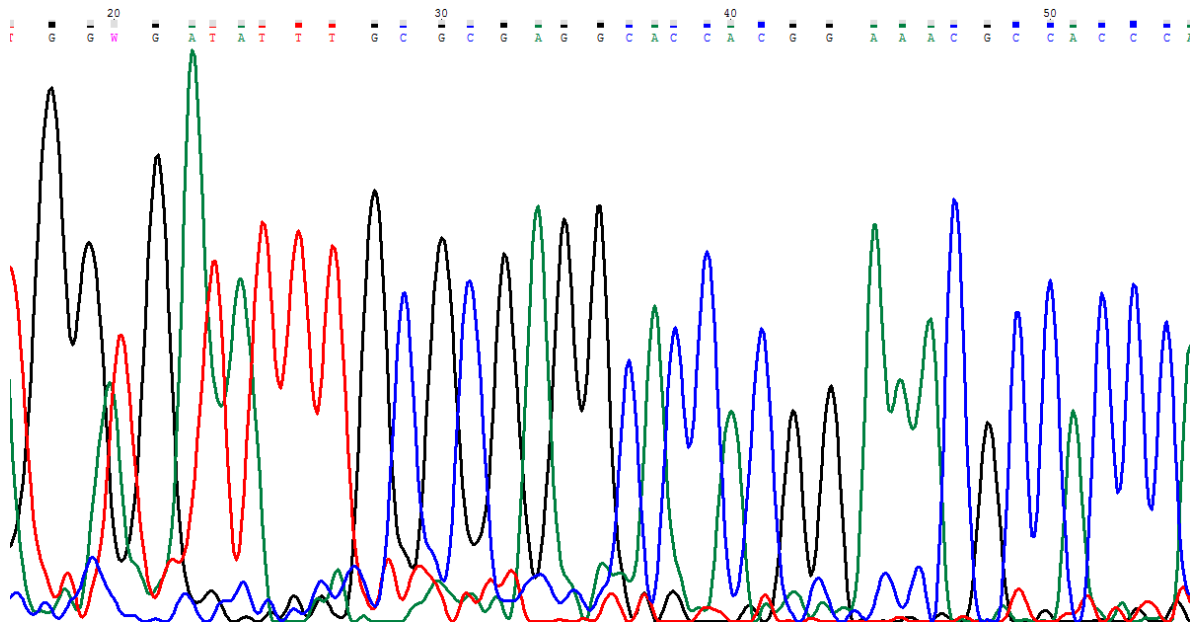
TTTGCCGAACATACGTGGYGYCTCGTATTGYCKCGGCTGGATTTTTGTAGATTTTYCCGCCGCCAGACGT
GGTGTCTCGCATTAAACGCCGCTGTGATTTTTGTAGGTGCGGCCG



Mcut3

>9592

TATTTGCGCGAGGCACCACGGAAACGCCACCCATTGGTATCTTCGTCCGACCACCCTTTGAGGACGCACTAGT
TTCTCAGCTTGGAGGGAGGTCTTTGTCATTCCAAGGCGTCGATTATGCCGCAGATATTGCGGGGTTCTTGCA
GGGGGTGACCCAGCGGGTTCACGGCAAATGGCGATCGACRRTGGTTCTCTTTTCTGGTTTCTTGCACTTCA
CCCAGCTTTCTTGCCAATCACTAAGACGGYTAATGCCTGCCCAAACGCTAGAATTGGTCCTCAGGCTACAGTC
AGGGTGGTCAGCTCGGCACAACCTCAKCCGCTTACTTTCTCGAGACATAGCTGCACGTATCACACTGTTGTCA
TCTTTGGTGATCCGAAACGGGGACAGCCAATCTCCGGAGTTGACTCTACTAAGGTGAAGGTCTTCTGTACAT
GGAGATAACATTTGCGATGGAGGCATTCTCGTTCTGCCSCCTCATTTGAATTACMAGGTTAATGTTGTTGACG
CGGCAAAATTCGTTGTGTCAAATTGGCG



Secuencias de aminoácidos cutinasas de *M. roleri* y *A. alternata*

>203aa MCUT1

MVRVFGTLTLLALLVPALAAPVPEDLEARQSGCADVMVVYARGTDQDSPIGDPASVGVLF
 DNIKSLLSRRTFSFQGVNYAANVIGFLQGGDPAGSRQMTTDLTNVANSCPNAKIVSAGYS
 QGGQLVHNSAAQLTAAVRNRINAVVIFGDPKSDQAVTGIPSSNVKIICHGDGNICEGGFI
 VTSQHTNYQQDAPAAAQFVLSKV

>127aa MCUT2

MAPVERRATVQCADVMVFFARGTTEPAPIGTIVGPPLKAALQRELGSQTMSFQVDYSAN
 VAGFLQGGDKQGSRTMADDITNAANSCPNAKIVTAGYSQGGQLVHNSAELLSPDVVSRI
 NAAVIFVG

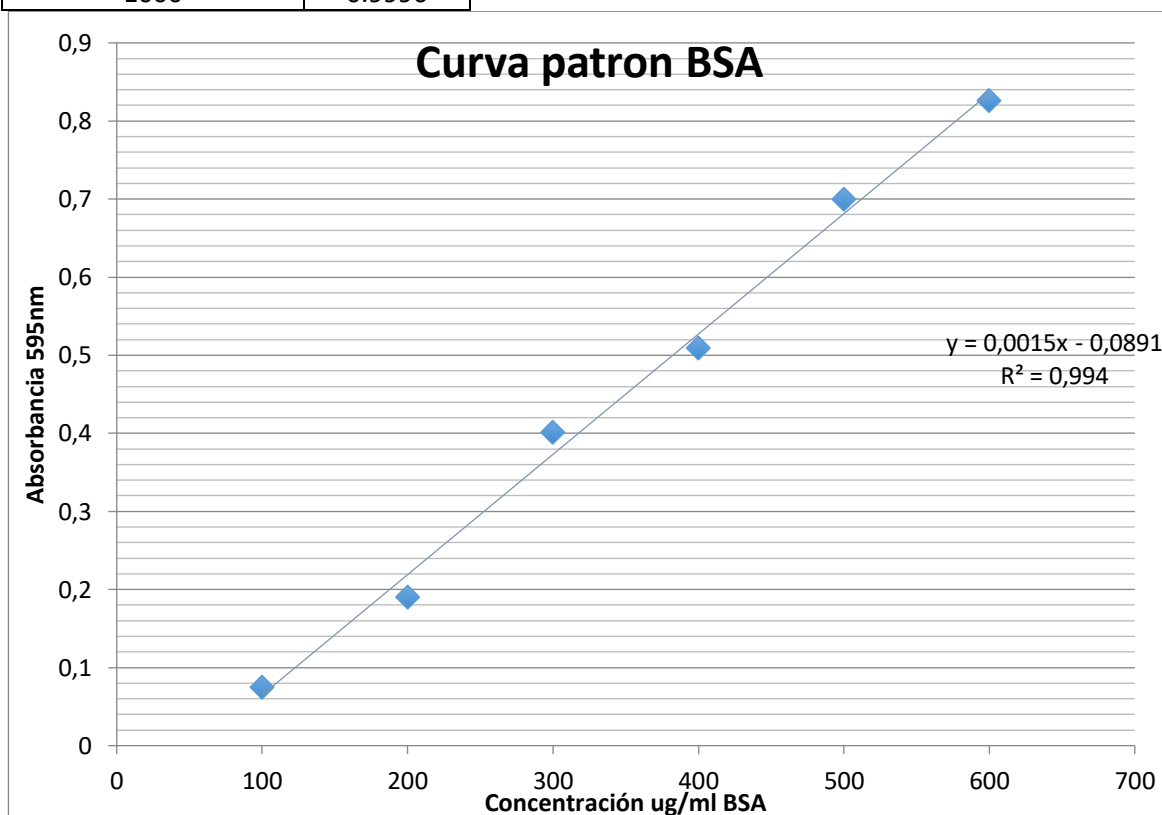
>198aa MCUT3

MFTSVARLVLLLGILTPAFAAPLAERAECAEVMVIFARGTTETPPIGIFVGPFPFEDALVS
 QLGGRSLSFQVDYAADIAGFLAGGDPAGSRQMAIDITNTANACPNARIVSSGYSQGGQL
 VHNSAALLSRDIAARINAVVIFGDPKRGQPIISGVDSKVKVFCCHGDGNICDGGILVLP
 PHLNYVVNVVDAAKFVSKL

APENDICE C

Curva estándar de Bradford

Concetración (ug/mL)	Absorbancia
100	0.0750
200	0.1900
300	0.4010
400	0.5090
500	0.7000
600	0.8260
700	0.8640
800	0.8870
900	0.9040
1000	0.9990



APENDICE D

Curva estándar de *p*- nitrofenol

Concentración ug/ml	Absorbacia
20	0.07860
40	0.12270
60	0.15230
80	0.23800
100	0.25030
120	0.29960
140	0.42990
160	0.44270
180	0.44570
200	0.59520
220	0.62010
240	0.64240
260	0.70360
280	0.91580
300	0.93570
320	0.98330

