



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Posgrado en Ciencias Biológicas

Generación del vector de silenciamiento para genes que codifican para lacasas de *Pleurotus ostreatus*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Altayra Quiroz Lucas

Directora de tesis

Dra. Alba Mónica Montiel González

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2014



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Generación del vector de silenciamiento para genes que codifican para lacasas de *Pleurotus ostreatus*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Altayra Quiroz Lucas

Comité Tutorial

Dra. Alba Mónica Montiel González
Dr. Arturo Estrada Torres
Dr. Gerardo Mata Montes de Oca

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2014

HOJA DE FINANCIAMIENTO

El presente proyecto se realizó con una beca para estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo la codirección de la Dra. Alba Mónica Montiel González, en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Este trabajo contó con el apoyo financiero otorgado por el fondo de Ciencia Básica SEP-CONACYT para el proyecto “Implicación fisiológica de la inactivación de genes de lacasa de *Pleurotus ostreatus* PoB sobre la morfogénesis y aprovechamiento de fuentes complejas de carbono” No. 167759.

Cabe mencionar que el programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la UAT está registrado en el Programa Nacional de Posgrado-CONACyT (PNP 00-30-03)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, por la beca otorgada a lo largo de la maestría realizada en el Posgrado de la Maestría en Ciencias Biológicas, con el número de registro 420254 y número de beca 261909.

A mi comité tutorial, Dra. Alba Mónica Montiel González, Dr. Arturo Estrada-Torres y Dr. Gerardo Mata Montes de Oca. Al Dr. Gerardo Díaz Godínez por sus comentarios al manuscrito y en especial al Dr. Jaime Marcial Quino por su asesoramiento y el tiempo dedicado para la realización del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero agradecer a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

A mis maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias, quienes nunca desistieron al enseñarme, me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

A la Dra. Alba Mónica Montiel González, por su apoyo incondicional como mi directora de tesis y por la paciencia que me tuvo.

Al Dr. Arturo Estrada Torres, por sus comentarios tan acertados, gracias doctor por dedicar parte de su tiempo para revisar el escrito.

Al Dr. Jaime Marcial Quino, por su asesoramiento, por el conocimiento y tiempo aportado para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Gerardo Mata Montes de Oca, por su apoyo y tiempo brindado.

A mis amigos, Fabys, Andy, Norma, Lety, Yeny, Lu, Luis Miguel, Luis Enrique, Berenice, Andrés, Jesús y Héctor con todo mi cariño, puesto que son parte importante en mi vida, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba.

Gracias a todas las personas que de alguna manera influyeron en la realización de esta tesis

DEDICATORIA

A DIOS por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A mis padres: Eulogio Quiroz Cortés y Gaudencia Lucas Gómez, no encuentro las palabras adecuadas para expresar lo que significan en mi vida, saben que los amo, agradezco el amor, confianza y apoyo que me han dado.

A mis hermanos: Eulogio, Noel, Fernando y Emmnuel, por todo su cariño y apoyo, los quiero!!!

A mis tíos y primos que me apoyaron y me motivaron a seguir adelante.

RESUMEN

Pleurotus ostreatus es una de las setas comestibles más importantes para el hombre debido a que posee altos valores nutritivos y a que actualmente es una de las especies de las que se obtienen algunos metabolitos de interés dentro de la industria alimentaria, papelera, cosmética y en áreas de biorremediación, entre otras. Este hongo posee la capacidad de degradar a la lignina a través de un complejo enzimático constituido por peroxidasas y fenoloxidasas, a estas últimas pertenecen las lacasas, las cuales son enzimas secretadas en múltiples isoenzimas, dependiendo de la especie que las produce y las condiciones de cultivo del organismo, lo que constituye una fuente de enzimas con cualidades catalíticas diversas, con varias aplicaciones biotecnológicas. Una de las funciones más estudiada y discutida de las lacasas es, justamente, la degradación del polímero de lignina. Por otra parte, en otros hongos, se ha descrito su implicación en procesos que no tienen que ver con degradación, por ejemplo, *Aspergillus nidulans* posee al menos dos lacasas, una de ellas que se cree está implicada en la coloración verde de los conidios y la otra en la morfogénesis y en procesos de esporulación. Por otra parte, se ha reportado que están involucradas en la síntesis de melanina y otros pigmentos en *Aspergillus nidulans*, la formación del cuerpo fructífero en *Lentinula edodes* y *Coprinus congregatus*, así como en la formación de los primordios en *Schizophyllum commune* y la formación de rizomorfos en *Armillaria* sp. Sin embargo, aún no se han comprobado todas estas funciones, puesto que estos estudios se han realizado de manera indirecta, es decir, que evalúan al mismo tiempo otros efectos que no permiten aclarar terminantemente cual es la función fisiológica que presenta la enzima en el hongo. Sin embargo a través de técnicas moleculares, tales como la inactivación o silenciamiento de los genes de interés se puede llegar a conocer la función de dicha enzima. Para ello se ha utilizado ARN de interferencia (ARNi), el cual es un mecanismo que inhibe la expresión de genes específicos en la fase post-transcripcional, permitiendo así la evaluación de cambios en la morfología y otros efectos en el organismo, este tipo de estudios dan la pauta para poner en práctica esta metodología específicamente para el silenciamiento de genes codificantes de lacasas en *Pleurotus ostreatus*.

Para poder aplicar esta técnica, se debe construir un vector de silenciamiento específico para el gen que se desee silenciar, cuyos elementos importantes incluyen aquéllos que lo hacen v

replicarse e integrarse al genoma eucarionte, los promotores empleados, el sitio o sitios de cortes, así como un marcador de resistencia para el organismo que se desee transformar para poder seleccionar sólo a las cepas transformantes y un fragmento específico muy conservado de genes de lacasa para dirigir el silenciamiento. Para ello se cuenta con información obtenida de numerosos estudios en los que han identificado los genes que codifican para estas enzimas, de la cual se ha podido obtener el fragmento indicado.

En el presente estudio se construyó el vector pRNAi-LAC con un fragmento de 300 pares de bases aproximadamente, correspondientes con una zona exónica de genes muy conservada, que codifica para una gran variedad de lacasas en hongos y en otros organismos, lo que lo hace específico para el silenciamiento de genes que codifican para dicha enzima. Cabe mencionar que dicho vector cuenta con un marcador de resistencia a fleomicina, que permite la selección de las transformantes, presenta promotores P_{gpd} y P_{pki}, los cuales son considerados promotores fuertes debido a que preceden de genes muy importantes que codifican para enzimas de rutas metabólicas que se encuentran en la mayoría de los organismos y son reconocidos por factores de transcripción generalistas, lo que proporciona ventajas al diseño de este vector respecto a otros vectores. También presenta un único sitio de corte para *NcoI*, lo cual facilita la introducción del gen de interés.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hongos	1
1.2. Silenciamiento génico	2
1.3. Interrupción dirigida de genes/reemplazo (knock-out)	3
1.4. ARN de interferencia (knock-down)	4
1.5. Estrategias para la construcción de vectores de silenciamiento	6
1.6. Lacasas	8
1.6.1. Bioquímica de las lacasas	8
1.6.2. Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas	8
1.6.3. Lacasas y su función biológica	9
1.7. Características y ciclo reproductivo del género <i>Pleurotus</i>	11
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Reportes de genes que codifican para lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	15
2.2. Participación de las lacasas	16
2.3. Estudios de genética reversa en hongos	19
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. General	24
4.2. Específicos	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. Diagrama general de la metodología	25
5.2. Vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi	26
5.3 Organismos	26
5.3.1. Microorganismo de estudio	26
5.3.2. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Top 10F'	27
5.4. Medios de cultivo	27

5.4.1. Cultivo de <i>E. coli</i>	27
5.4.2. Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
5.5. Construcción del vector de silenciamiento específico para genes de lacasa (pRNAi-LAC)	27
5.6. Estrategia 1	27
5.6.1 Extracción del fragmento del gen que codifica para lacasas del pJET.....	27
5.7. Estrategia 2	30
5.7.1 Extracción de ADN...	30
5.7.2 Diseño de primers (Alineamiento)...	31
5.7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa...	31
5.8. Estrategia 3	31
5.8.1 Plásmido comercial (Fragmento sintético del gen de lacasas)...	31
5.8.2. Digestión del plásmido comercial	32
5.8.3. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión del plásmido comercial... ..	32
5.8.4. Purificación del fragmento de gen de lacasas obtenido de la digestión a partir del gel.....	33
5.8.5. Digestión del fragmento de gen de lacasas, obtenido del plásmido comercial	33
5.8.6. Digestión del plásmido de silenciamiento (pGpdPki-RNAi)	34
5.8.7. Desfosforilación del plásmido de silenciamiento (pGpdPki-RNAi)	34
5.8.8. Ligación	35
5.9. Transformación de células competentes de <i>E. Coli</i>	35
5.9.1. Extracción del ADN plasmídico mediante el método de minipreps	36
5.9.2 Extracción del ADN plasmídico mediante el método de megapreps	37
6. RESULTADOS	38
6.1. Estrategia 1	38
6.2. Estrategia 2	38
6.2.1. Extracción de ADN	38
6.2.2. Diseño de primers (Alineamiento)	39
6.2.3. PCR.....	40

6.2.4. PCR con gradientes de temperaturas	41
6.3. Estrategia 3	42
6.3.1. Digestión del plásmido comercial con el fragmento del gen de lacasas	42
6.3.2. Transformación y MINI-PRPES del plásmido comercial	43
6.3.3. MEGA-PREPS del plásmido comercial	45
6.3.4. Digestión de pGpdPki-RNAi.....	46
6.3.5. Desfosforilación de pGpdPki-RNAi	47
6.4. Construcción del vector de silenciamiento para genes	
de lacasa (pRNAi-LAC)	48
6.4.1. Transformación y MINI-PREPS de la construcción del vector	
de silenciamiento para genes de lacasa (pRNAi-LAC)	48
6.4.2. Extracción del plásmido (MEGA-PREPS) de la construcción	
del vector de silenciamiento para genes de lacasa (pRNAi-LAC)	50
7. DISCUSIÓN	51
8. CONCLUSIONES	53
9. PERSPECTIVAS	54
10. REFERENCIAS	55
11. ABREVIATURAS USADAS	64
12. ANEXOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía del ARN de interferencia (Tomado de López y cols. 2007)	5
Figura 2. Estrategias de silenciamiento por ARNi (Tomado de Bhadauria 2009).....	7
Figura 3. Ciclo reproductivo del género <i>Pleurotus</i> (Tomado de Guinberteau 1990).....	13
Figura 4. pGpdPki-ARNi (Tomado de Marcial 2011)	26
Figura 5. <i>Pleurotus ostreatus</i> (PoB).....	26
Figura 6. Extracción de ADN. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular (λ PstI), en los carriles 3, 5 y 7 ADN total de PoB.....	39
Figura 7. Región nucleotídica utilizada para el alineamiento de las secuencias de genes que codifican para lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	40
Figura 8. Producto de PCR obtenido con los primers FRAG LAC 1 Y FRAG LAC 2.....	41
Figura 9. PCR de gradientes 60-68°C	42
Figura 10. Digestión del plásmido comercial con <i>NcoI</i>	43
Figura 11. transformantes obtenidas con el inserto del gen sintético en <i>E. coli</i>	44
Figura 12. Digestión de la miniprep con <i>NcoI</i>	45
Figura 13. Digestión de la megaprep con <i>NcoI</i>	46
Figura 14. Digestión del vector de silenciamiento (pGpdPki-ARNi) con <i>NcoI</i>	47
Figura 15. Desfosforilación del vector de silenciamiento con fosfatasa alcalina	47
Figura 16. Colonias de <i>E. coli</i> transformadas con el plásmido pARNi-LAC	48
Figura 17. Digestión de la miniprep de células transformadas con la construcción del vector de silenciamiento pARNi-LAC.....	49
Figura 18. Digestión de la megaprep de células transformadas con la construcción del vector de silenciamiento pRNAi-LAC.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos para PCR.....	29
Tabla 2. Reactivos para la digestión del plásmido comercial.....	32
Tabla 3. Reactivos para la digestión del fragmento del gen de lacasas.....	34
Tabla 4. Reactivos para la digestión del plásmido de silenciamiento	34
Tabla 5. Reactivos para la desfosforilación del plásmido de silenciamiento	35
Tabla 6. Reactivos para la ligación.....	35

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hongos

Los hongos son organismos muy comunes en la naturaleza, ya que viven prácticamente en todos los ambientes (Guzmán y cols. 1993). Son organismos heterótrofos y presentan dos formas de reproducción para dar origen a nuevos individuos, la reproducción sexual y la asexual (Huerta 2001). Son modelos de estudio excelentes, debido al fácil manejo que puede hacerse de ellos, especialmente los que forman cuerpos fructíferos visibles con estructuras celulares bien diferenciadas (Manáchere 1988, Taylor y cols. 1993, Sánchez y Moore 1999, Kûes y Liu 2000). El cultivo de los hongos se practica por interés económico o científico, por ejemplo, las levaduras han sido ampliamente estudiadas porque son las responsables de la fermentación en la producción de cerveza y el pan, otros se han empleado para producir industrialmente antibióticos, algunas especies son agentes de biocontrol de plagas, otras producen micotoxinas y compuestos bioactivos (como los alcaloides) que son tóxicos para humanos y otros animales (Harris 2008).

A través de los años, el conocimiento acerca de los hongos se ha incrementado, debido a la importancia que poseen los metabolitos que producen, de tal forma que actualmente son motivo de estudio para numerosos grupos de investigación, surgiendo así nuevos conocimientos que incluyen aspectos taxonómicos, ecológicos, nutricionales, farmacológicos y más recientemente bioquímicos y fisiológicos. Para seguir obteniendo información acerca de estos aspectos, se ha implementado la investigación en la genómica funcional en hongos filamentosos, esto ha sido posible gracias a los avances importantes en cuanto al desarrollo de diversos sistemas de transformación y el conocimiento de la variedad de tejidos fúngicos que son susceptibles de ser manipulados genéticamente, también se han adaptado y desarrollado herramientas eficientes para la investigación de la función de genes en hongos como mutación al azar y mutación dirigida. Un aspecto importante que facilita el implemento de estas técnicas es que un gran número de genomas de hongos han sido o están actualmente siendo secuenciados (Weld y cols. 2006).

1.2 Silenciamiento génico

Mediante el uso de técnicas empleadas en ingeniería genética se pueden generar cepas transformantes que permitan evaluar el papel que algunas enzimas desempeñan dentro de la fisiología del hongo.

La hipótesis de la función de un gen puede ser probada directamente en experimentos donde la ganancia o pérdida de la actividad pueda ser predicha por la presencia o ausencia de un gen funcional en el caso de enzimas (Bhadauria y cols. 2009). Un gen es un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) que produce ácido ribonucleico (ARN) mediante el proceso de transcripción. El ADN tiene dos hebras de ácido nucleico y el ARN tiene sólo una hebra. La secuencia del ARN es determinada por la secuencia del ADN molde, siendo así, la secuencia complementaria a ésta, pero compuesta por ribonucleótidos en lugar de desoxirribonucleótidos y con uracilo en lugar de timina. La principal función que se le ha reconocido al ARN es como parte de la maquinaria de producción de proteínas. Los ARN mensajeros (ARNm) son los intermediarios en la expresión de los genes, transmitiendo la información originada en el ADN hacia la maquinaria de síntesis de proteínas. Los ARN de transferencia (ARNt) son el elemento decodificador que permite traducir de un lenguaje de nucleótidos (el que tiene el ADN y el ARNm) a un lenguaje de aminoácidos (el de las proteínas), en tanto los ARN ribosomales (ARNr) son parte del organelo en el que se producen las proteínas (Melo y Cuamatzi 2007)

La genética inversa ha sido ampliamente utilizada para dar a conocer estrategias a nivel molecular tales como la interrupción dirigida de genes/reemplazo (knock-out), silenciamiento génico (knock-down), mutagénesis de inserción, entre otras, que con la posterior evaluación de los cambios que presentan las mutantes en varios aspectos fisiológicos, pueden determinar los eventos con los que se asocian las variaciones en la expresión de las proteínas de interés y permiten determinar la función del gen. Sin embargo la adaptación de la estrategia adecuada para un proyecto en particular resulta ser complicada, con muchas variables a considerar,

puesto que se deben conocer las ventajas y desventajas que estas técnicas nos proporcionan, para poder obtener los resultados deseados.

1.3 Interrupción dirigida de genes/reemplazo (knock-out)

La interrupción dirigida de genes llamada también knock-out, consiste en la alteración de un locus por inserción o reemplazo de un fragmento de ADN heterólogo. En esta metodología el gen es transformado con un cassette de disrupción construido con secuencias del gen blanco y un marcador de selección. Posteriormente el cassette es insertado dentro del gen blanco por recombinación homóloga. Esta técnica puede ser utilizada para reemplazar parte de un gen endógeno con secuencias exógenas, por ejemplo la sustitución del promotor. Las transformantes recuperadas pueden contener cualquiera de las dos o ambas, ADN integrado por recombinación homóloga o por integración ectópica (Weld y cols. 2006). Ha sido uno de los métodos más eficientes para investigar la función de genes, puesto que una vez causado el knock out se evalúa el fenotipo de las mutantes, pudiendo así conocer la participación del gen que se está interrumpiendo.

Esta técnica tiene gran importancia en investigaciones genéticas, porque al desactivar completamente la función de un gen específico se puede evaluar y entender cuál es su papel en el organismo que lo contiene. Son empleadas con mayor frecuencia en el área de medicina para evaluar genes asociados con enfermedades humanas (Janeway y cols. 2003). Recientemente ha sido una metodología elegida para muchos hongos. Sin embargo la eficiencia del método depende del tamaño de la secuencia homóloga, el grado de homología, el método de transformación y la posición genómica del gen objetivo. En hongos filamentosos generalmente se requiere 1 Kb de secuencia homóloga y en ocasiones mucho más, aunado a lo anterior la recombinación homóloga en estos organismos es muy baja por lo que es necesario evaluar muchas transformantes para encontrar una que tenga la integración (Janeway y cols. 2003). Por otra parte si el gen de interés resulta ser vital para el organismo, no se puede realizar una evaluación a nivel de morfogénesis, puesto que la cepa no sobrevivirá.

1.4 ARN de interferencia (knock-down)

El silenciamiento génico inducido por ARN de interferencia (ARNi) es un proceso regulador de la expresión que suprime, a nivel post-transcripcional la expresión de un gen, con base en la especificidad de secuencia, es decir, se basa en la complementariedad de bases entre la molécula de ARNi y la molécula de ARN mensajero. Si la complementariedad de bases es perfecta se producirá la degradación completa del ARN mensajero mientras que, si no lo es, simplemente se degradará de manera parcial (Satoshi y cols. 2005, Matityahu 2008). Este sistema se ha descrito en diferentes organismos eucariotas como plantas, animales y hongos (Eslami y cols. 2014). El mecanismo mejor caracterizado es aquel que se inicia con la incorporación a la célula de una molécula larga de ARN de doble cadena, conocida como dsARN (Double-Stranded ARN). Esta molécula puede ser introducida artificialmente. En el citoplasma la molécula de dsRNA es reconocida por la endonucleasa del tipo ARNasa III (*Dicer*) que la fragmenta. Generando así, moléculas bicatenarias cortas de ARN, denominados pequeños ARN de interferencia (siARN, Small Interfering RNA), que contienen tanto la cadena sentido como la antisentido de la molécula bicatenaria original. La longitud de los siARN es variable según del organismo que se trate, por lo regular suelen tener entre 21 y 25 nucleótidos. Cada molécula de siRNA es incorporada a un complejo multiproteico conocido como RISC (RNA-inducing Silencing Complex). Este complejo separa las dos hebras de la molécula de siRNA quedándose una de las hebras incorporada en el complejo (Figura 1). La hebra que queda en el complejo es usada como molde o guía para reconocer a la molécula de ARNm. Cuando las moléculas de ARNm complementarias son encontradas, la interacción entre el ARNsi y este ARNm desemboca en el corte del ARNm y su posterior degradación (Agrawal 2008, Eslami 2014).

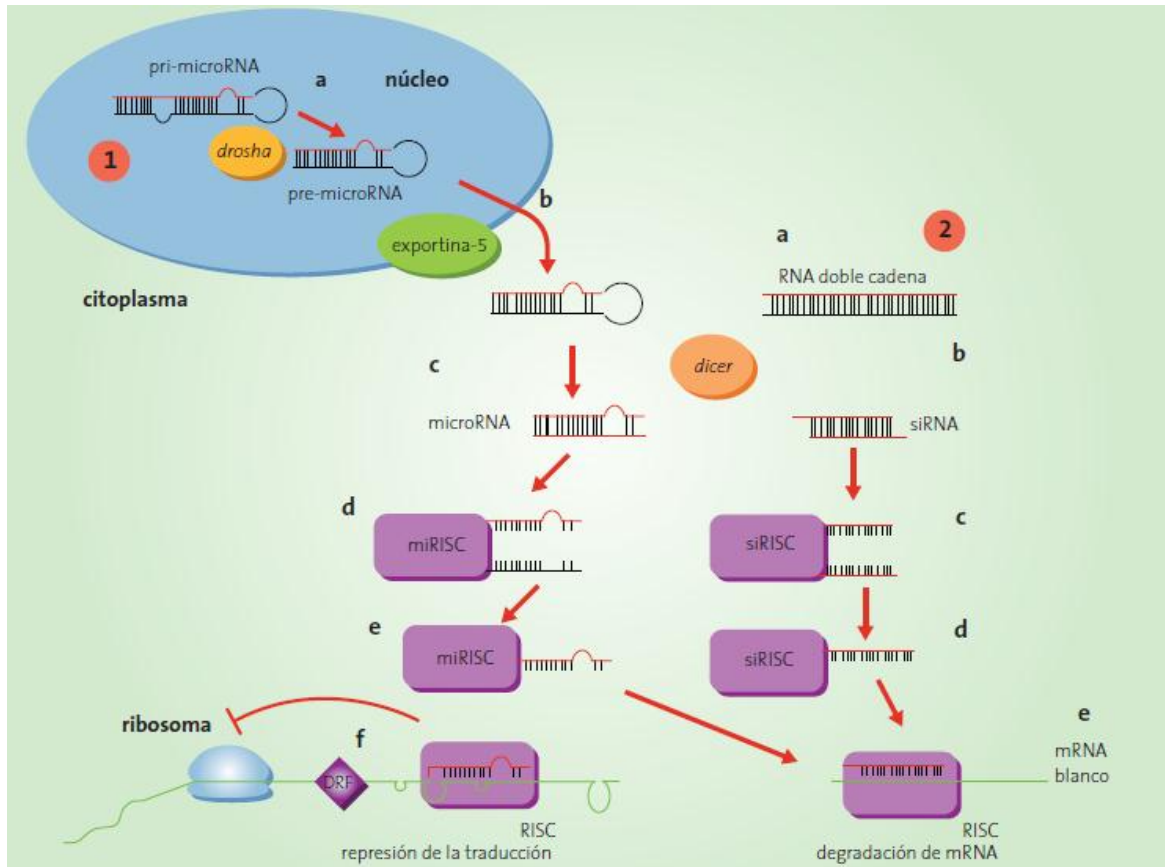


Figura 1. Vía del ARN de interferencia. Las dos vías de procesamiento se indican con los números 1 y 2. Los pasos de cada vía se señalan con letras. **1.** Biogénesis de microARN: a) procesamiento por *Drosha* en el núcleo, b) exportación de la molécula pre-microARN del núcleo al citoplasma por exportina-5, c) segundo procesamiento por *Dicer*, d) identificación y desnaturalización del microARN por miRISC, e) selección asimétrica de una de las cadenas del microARN, f) apareamiento con el ARNm blanco y represión de la traducción. **2.** Biogénesis de los ARNs: a) presencia de un RNA de doble cadena en el citoplasma, b) procesamiento por *Dicer*, c) identificación del dúplex de 19 a 12 pares de bases por siRISC, d) selección asimétrica de una de las cadenas del dúplex, e) apareamiento con el ARNm blanco y su subsiguiente degradación (Tomado de López y cols. 2007).

1.5 Estrategias para la construcción de vectores de silenciamiento

Para llevar a cabo la metodología con ARN de interferencia, es necesario contar con el vector adecuado, es decir que se ajuste a los requerimientos del organismo, por ello se debe buscar la estrategia que ofrezca ciertas ventajas en situaciones específicas. Algunas de las estrategias para la construcción de vectores que causan silenciamiento son:

a) hpARN convencional. Consta de transcritos con repeticiones invertidas de bases complementarias o casi complementarias de 20-50 pb que forman las horquillas con un tallo de doble cadena de ARN, estas dobles cadenas son procesadas a miARN que intervienen en la degradación del ARNm (Bhadoria y cols. 2009).

b) pSilent 1 (sistema de expresión de ARN heterólogo nuclear). Contiene un cassette de resistencia a higromicina y una unidad transcripcional para la expresión de ARN de horquilla con un sitio de clonación múltiple y la secuencia de un intrón como espaciador (Bhadoria y cols. 2009).

c) pSilent-Dual system (sistema de dos promotores opuestos) los promotores trpC y gpdA fueron clonados de manera convergente separados por un sitio de clonación múltiple. Para co-silenciamiento, un fragmento de eGFP de 0.41Kb fue insertado en pSD1, teniendo como resultado pSD1-G. Fragmentos de alrededor de 500pb pueden ser insertados en el vector pSD1, que expresarán la correspondiente quimera de doble cadena de ARN, como templado para la degradación del ARNm homólogo (Figura 2) (Bhadoria y cols. 2009).

Cabe mencionar que pueden hacerse modificaciones de estas estrategias, ajustándolas a los requerimientos necesarios para el estudio a realizar.

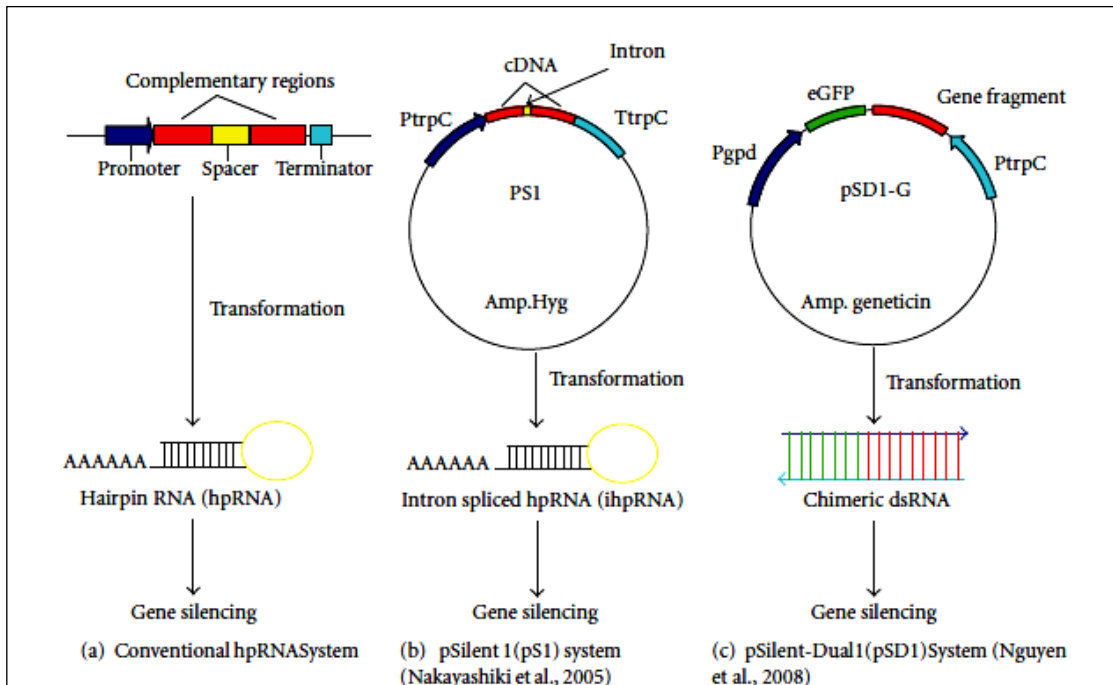


Figura 2. Estrategias de silenciamiento por ARNi (Tomado de Bhadauria 2009).

Una de las ventajas que nos proporciona el silenciamiento con ARN es su utilidad en la regulación de la expresión génica (Agrawal y cols. 2008). Por otra parte, la mayoría de los hongos presentan hifas multicelulares o multinucleadas y algunos de ellos son heterocariontes, es decir, tienen dos o más núcleos genéticamente diferentes en un citoplasma común, lo cual es una variable que debe tomarse en cuenta a la hora de elegir el método más adecuado para realizar la inactivación del gen de interés, puesto que con el método de interrupción dirigida u otros, esto suele ser una limitante. Sin embargo con el silenciamiento con ARN no se presenta esta situación, puesto que el silenciamiento con ARN es independiente del locus y está mediado por señales en el citoplasma, razón por la cual puede ser aplicado en hongos con baja eficiencia del gen objetivo. El silenciamiento por ARN permite flexibilidad en experimentos de inactivación génica, ya que induce la supresión de genes en una secuencia específica pero no en un locus específico. Por ejemplo, el silenciamiento de genes homólogos o incluso genes heterólogos se ha demostrado utilizando una secuencia conservada de una familia de genes o

con la construcción de una secuencia quimérica derivada de varios genes. El silenciamiento con promotores inducibles o el silenciamiento transitorio por ARNsi permiten la expresión de un gen en una etapa específica durante el desarrollo del organismo o cómo éste afecta diferentes partes del organismo, estudios en este sentido, no pueden realizarse con estrategias de eliminación ya que eliminan el gen de interés de manera permanente. Por lo tanto el silenciamiento ofrece varias opciones para la inactivación de un gen, incluso puede ser utilizado para el análisis de genes letales ya que en muchos casos sólo induce la disminución de la actividad, pero no la inactivación por completo (Schmidt 2005).

Como se ha mencionado, esta metodología puede ser empleada para conocer las funciones asociadas con varios productos de genes, sobre todo en aquéllos casos en que codifican para proteínas de interés en múltiples áreas. Este conocimiento es fundamental debido a que puede aportar información relevante de la función específica de la enzima de interés y así se contribuirá con más elementos para su manejo. Una de las enzimas que puede ser un buen modelo debido a que ha sido muy estudiada por sus variadas aplicaciones es la lacasa, la cual, es producida por diversos organismos, en los cuales sus funciones varían y hasta el momento algunas de ellas sólo se les han atribuido, sin ser demostradas, por lo que son poco claras y siguen siendo objeto de estudio.

1.6 Lacasas

1.6.1 Bioquímica de las lacasas

Las lacasas (benzenediol: oxígeno óxido-reductasa E.C. 1.10.3.2) son enzimas del tipo fenol oxidasas, se han clasificado dentro del grupo de enzimas denominadas azul cobre oxidasas con capacidad para reducir el oxígeno molecular a dos moléculas de agua (Thurston 1994). Son secretadas en múltiples isoenzimas, dependiendo de la especie que las produce y las condiciones de cultivo del organismo, lo que constituye una fuente de enzimas con cualidades catalíticas excepcionales (Giardina y cols. 1999). Se ha reportado un intervalo de peso molecular entre 50 y 190 kDa para las lacasas (Baldrian 2006). Las lacasas son proteínas muy estables, con temperaturas óptimas entre 50 y 70 °C (Morozova y cols. 2007b), aunque se

pueden encontrar enzimas muy termoestables como la lacasa de *Pycnoporus sanguineus*, con un tiempo de inactivación de 3 horas a 75 °C (Litthauer y cols. 2007). Poseen pI entre 2.6 y 4.5 y presentan actividad en un amplio rango de pH, entre 2.0 y 8.5 aunque el máximo se encuentra entre 3.0 y 5.0 (Thurston 1994; Leonowicz y cols. 2001; Morozova y cols. 2007b). Poseen potenciales de óxido-reducción entre 0.5 y 0.8 V y catalizan la oxidación de un amplio rango de sustratos, desde compuestos fenólicos (*orto* y *para* difenoles, metoxifenoles, etc.) a aminas aromáticas (Yaropolov y cols. 1994), e incluso iones inorgánicos (Morozova y cols. 2007a).

Se describen como glicoproteínas que utilizan al cobre como cofactor y requieren para su actividad catalítica 4 cuatro átomos de cobre por cada proteína activa. Los cuatro átomos de cobre que contienen estas proteínas han sido clasificados en tres tipos por sus propiedades espectroscópicas (Solomon y cols. 1996, Claus 2004). En el espectro UV-visible, el cobre tipo 1 es el responsable del color azul intenso de la enzima con un máximo de absorbancia a 610 nm provocada por la unión covalente cobre-cisteína. El cobre tipo 2 no exhibe señales de absorbancia en la UV-visible. El cobre tipo 3 es un complejo binario formado por un par de iones Cu^{2+} - Cu^{2+} que se encuentran acoplados binuclearmente a través de un puente hidróxido, muestra un máximo de absorbancia a 330 nm (Solomon y cols. 2001). Los átomos de cobre tipo 1 y tipo 2 son detectables por resonancia electrónica paramagnética (EPR), mientras que los dos de tipo 3 no son detectables (Claus 2004).

1.6.2 Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas

El empleo de enzimas en procesos biotecnológicos aparece como una alternativa a la utilización del microorganismo completo. Además, también suponen una alternativa frente al uso de compuestos químicos que, en determinadas industrias como la alimentaria, suscitan un cierto rechazo entre los consumidores. Por otro lado, el uso de enzimas en procesos industriales aporta un mayor control sobre el producto final generado, condicionado principalmente por la especificidad y estereoselectividad de estos catalizadores biológicos. Una de las enzimas más estudiadas a la hora de implementar procesos biotecnológicos han sido las

lacasas. Estas enzimas presentan una amplia capacidad de actuar sobre sustratos fenólicos y aminas aromáticas. Además, el uso del sistema lacasa mediador sustenta la base de su aplicabilidad a la hora de oxidar también compuestos no fenólicos (Mayer y Staples 2002). Otra característica importante que apoya su uso en aplicaciones biotecnológicas es la utilización de oxígeno molecular como aceptor de electrones.

Una aplicación de las lacasas es su uso en la clarificación de mosto de vino, jugos de frutas o cerveza, en los que los fenoles presentes en estos productos son eliminados tras su polimerización catalizada por estas enzimas (Servili y cols. 2000, Minussi y cols. 2002).

Aparte de estas aplicaciones alimentarias, se ha investigado la acción de las lacasas en el campo del bioblanqueo enzimático de pastas de papel. El bioblanqueo consiste, a grandes rasgos, en la eliminación, vía enzimática, de la lignina residual presente en pastas de papel, con el objeto de mejorar sus propiedades papeleras. Otro ejemplo de aplicación de las lacasas es sobre la oxidación de compuestos aromáticos recalcitrantes, como compuestos organoclorados o hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Debido al potencial biotecnológico que tienen las lacasas, se han desarrollado estrategias encaminadas a la búsqueda de nuevas fuentes de producción, tanto en forma nativa, a partir de cultivos de basidiomicetos de podredumbre blanca, como en forma recombinante, utilizando sistemas de silenciamiento y expresión heteróloga de genes de lacasa, puesto que, además de presentar variadas aplicaciones biotecnológicas, se ha reportado su participación en procesos biológicos.

1.6.3 Lacasas y su función biológica

Las lacasas fueron descritas por primera vez en exudados del árbol japonés del barniz (*Rhus vernicifera*) (Yoshida 1883). Se encuentran distribuidas tanto en organismos eucariotas (Palonen y cols. 2003, Mayer y Staples 2002, Dittmer y cols. 2004), como en eubacterias (Givaudan y cols. 1993, Sánchez-Amat y cols. 2001, Martins y cols. 2002), actinomicetos (Endo y cols. 2002) e incluso arqueobacterias (Claus 2003), presentando una función muy diversa dependiendo del tipo de organismo que la posee.

En plantas, por ejemplo, las lacasas están implicadas en una respuesta primaria a heridas; tras la herida, el árbol del barniz secreta un látex que, en contacto con el aire, polimeriza en una reacción dependiente de lacasa, formándose una película protectora que podría favorecer la curación (Davies y Ducros 2001). En los tejidos leñosos, las lacasas forman parte del sistema de síntesis de lignina (Bao y cols. 1994, Ranocha y cols. 1999). También se han descrito fenoloxidasas, que muestran propiedades lacasa, en cutículas de larvas e insectos que participan en la esclerotización de las mismas (Arakane y cols. 2005). En hongos, las lacasas presentan otras funciones. Se ha reportado que el ascomiceto *Aspergillus nidulans* posee, al menos, dos lacasas, una de ellas implicada en la coloración verde de los conidios (Aramayo y Timberlake 1990) y otra expresada en los extremos de la hifa, con una posible función en la síntesis de la pared celular (Scherer y Fischer 2001).

Por otra parte, uno de los campos en los que más se ha investigado acerca de la función de las lacasas es en la degradación de lignina. Existen diferentes organismos capaces de degradar la lignina, en mayor o menor medida, gracias al complejo enzimático que poseen, entre los que se encuentran actinomicetos del género *Streptomyces*, bacterias como *Pseudomonas* y *Xantomonas* (Buswell y cols. 1987, Vicuña 1988), hongos ascomicetos como *Chrysonilia sitophyla* (Buswell y cols. 1987, Rodríguez y cols. 1999) o deuteromicetos como *Fusarium proliferatum* (Regalado y cols. 1997). Sin embargo, los únicos organismos capaces de degradar por completo el polímero de lignina y que además presentan mayores niveles de expresión y lacasas con potenciales de oxidorreducción más altos, características muy importantes a la hora de desarrollar aplicaciones biotecnológicas, son los hongos basidiomicetos, y más concretamente los de podredumbre blanca de la madera (Crawford 1981, Buswell y cols. 1987, Kirk y cols. 1987), llamados así por la tonalidad blanquecina que adquiere el material degradado enriquecido en celulosa como consecuencia de la eliminación de la lignina. Entre estos organismos, *Pleurotus ostreatus* ha sido uno de los organismo más estudiados en cuanto a la biodegradación de la lignina (Schoemaker y cols. 1991), proceso en el cual se ha reportado la implicación de la enzima lacasa en la degradación de este compuesto (Saparrat y cols. 2002).

Aunque no existe ninguna duda de la implicación de las lacasas en los procesos antes mencionados (Claus 2004), su función no está clara, debido a que cabe la posibilidad de que

no sea ésta la razón principal por la que el organismo la produce. Por esto, se siguen realizando estudios utilizando estrategias como el silenciamiento génico y la sobreexpresión heteróloga de genes de lacasa para tratar de entender el mecanismo por el cual el organismo produce dicha enzima, lo cual permitirá tener más evidencias de su participación fisiológica en el hongo.

1.7 Características y ciclo reproductivo del género *Pleurotus*

Se sabe que los hongos presentan una gran variedad de formas de vida, por lo que existen diferentes clasificaciones: una de ellas se refiere a su capacidad de degradación de sustratos, donde se encuentran los hongos de pudrición: 1) blanda; que degradan carbohidratos sencillos, 2) oscura; que degradan polisacáridos tales como la celulosa y hemicelulosa y 3) blanca; que pueden degradar hasta lignina. Los hongos del género *Pleurotus* se clasifican como de pudrición blanca. Estos hongos poseen la capacidad de degradar la lignina a través de un complejo enzimático de peroxidasas y fenoloxidasas, a estas últimas pertenecen las lacasas y se combinan con otros procesos para efectuar su mineralización (Pointing 2001).

Este género pertenece al Reino Fungi, Phylum Basidiomycota, Clase Homobasidiomycetes, Orden Agaricales, Familia Pleurotaceae (Kirk y cols. 2001). Sus basidiomas miden entre 8 y 15 cm, aunque en ocasiones alcanzan dimensiones mucho mayores, son lisos, convexos al principio, con forma de ostra. De color muy variable, normalmente desde gris claro hasta marrón oscuro, pasando por todas las tonalidades intermedias, a veces con reflejos azulados. Cuentan con margen delgado y enrollado del mismo color que el sombrero, presentan láminas de blancas a marfil, un pie muy corto, a veces ausente, aterciopelado y blanco, sus esporas son cilíndricas. Se desarrolla en temporada de lluvias y la temperatura óptima de producción de sus basidiomas es de 25 °C. La humedad relativa que le favorece es de 70 a 80% (Milla 2007). Produce metabolitos secundarios con aplicaciones farmacéuticas y algunas proteínas de uso industrial (Hadar y cols. 1992, Peñas y cols. 1998, Leonowicz y cols. 1999). La fase vegetativa es filamentosa porque está constituida por un conjunto de filamentos (hifas) denominado micelio (Herrera y Ulloa 1998). El crecimiento de éste se realiza sólo en las

puntas y es un sistema de biomasa ramificada que se origina de la germinación de esporas o a partir de fragmentos de hifas. Su crecimiento se atribuye a un fenómeno complejo en el que participan vesículas, que son agregados de enzimas hidrolíticas y sintéticas que degradan y restauran fragmentos de la pared celular. Las vesículas se producen a lo largo del segmento sub-apical y se transportan por medio de un mecanismo hasta llegar al centro distribuidor de vesículas conocido como spitzenkörper. Desde ahí son distribuidas en forma radial y aleatoria hacia la pared apical dando lugar al crecimiento de las hifas (Viniegra-González y cols. 2003).

El crecimiento de la hifa causa que se formen sitios adicionales para la síntesis de la pared en la región sub-apical, originando ramificaciones laterales que a su vez sintetizan una nueva pared. La formación de las ramificaciones requiere de la producción de un nuevo ápice de la célula madre existente (Deshpande 1992). El micelio tiene por función adquirir y distribuir los nutrimentos, así como el crecimiento y la formación de la estructura de soporte para el desarrollo de los cuerpos fructíferos (Knapp y cols. 1995).

En los basidiomicetes existen dos modelos sexuales: 1) el homotalismo, término empleado para los hongos que son autocompatibles, es decir en los que la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio, y 2) el heterotalismo en el que son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* está dentro de este último modelo (Figura 3), donde las basidiosporas con un núcleo germinan (micelio primario monocariótico) (A) y se fusionan dos micelios primarios compatibles, en los cuales hay un intercambio nucleico recíproco (plasmogamia) (B), formando el micelio secundario dicariótico con la presencia de fíbulas (C), la fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios, que se encuentran en las laminillas del cuerpo fructífero (D), posteriormente ocurre la meiosis, dando origen a células haploides (basidiosporas), que son expulsadas hacia el ambiente (E).

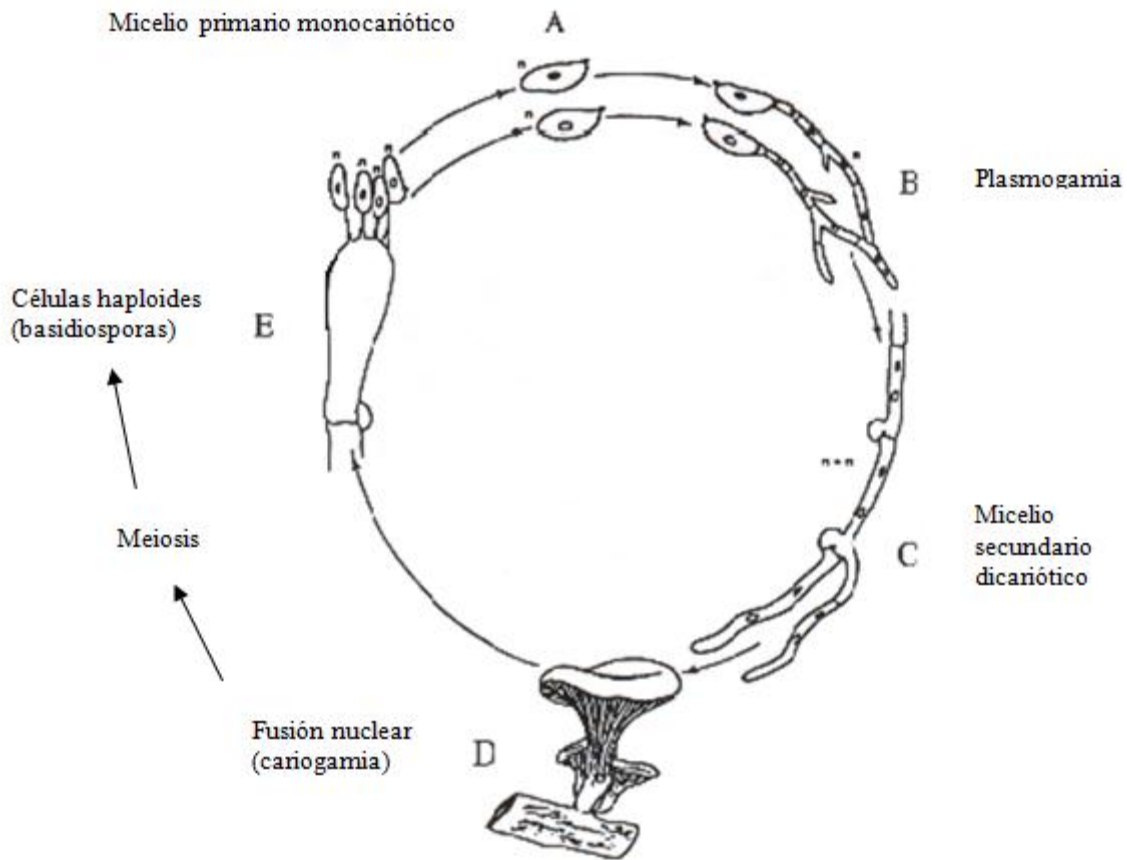


Figura 3. Ciclo reproductivo del género *Pleurotus* (Tomado de Guinberteau 1990).

En los últimos años, la especie *Pleurotus ostreatus* ha adquirido gran importancia como organismo modelo para estudiar el fenómeno de la morfogénesis, gracias a su capacidad para degradar eficientemente lignocelulosa, lo que permite cultivarlo en una gran variedad de sustratos ricos en dicho material, generalmente sobre troncos, ramas o árboles muertos, incluso sobre raíces podridas (Herrera y Ulloa 1998), gracias a la participación de las lacasas. Estas enzimas también se han relacionado con el desarrollo de cuerpos fructíferos en *Lentinula edodes* (Thurston 1994), por lo que es probable que en *Pleurotus* participen también en este proceso. Sin embargo, esta función no ha sido claramente explicadas en ninguna especie de basiomicetos.

Adicionalmente, para la producción de esta enzima por *Pleurotus ostreatus* se han utilizado diversos métodos y se han empleado una gran gama de sustratos, por medio de los cuales se han podido obtener datos sobre su actividad y del número de isoenzimas que presentan. En estos estudios se ha observado que la actividad de lacasas se incrementa en presencia de glucosa, respecto a la que presentan cuando el hongo crece sobre materiales sólidos lignoselulosicos (Shicheng y cols. 2003). Sin embargo aún no hay suficientes estudios que pongan de manifiesto los mecanismos internos que provocan que el organismo produzca la enzima en estas condiciones.

La familia de lacasas de *Pleurotus ostreatus* representa un grupo variado de enzimas, algunas de las cuales están dotadas con propiedades peculiares. La isoenzima POXC representa la lacasa más abundantemente producida por *Pleurotus ostreatus*, también secreta una lacasa blanca, la isoenzima POXA1w, que tiene un singular contenido metálico, una lacasa heterodimérica, las isoenzimas POXA3 y POXA1b son notablemente estables a pH alcalino (pH 10). Estudios acerca de los genes que codifican lacasas hasta ahora han identificado seis diferentes genes y sus correspondientes cADNs *poxc* (Giardina y cols. 1996), *pox1* (Giardina y cols. 1995), *poxa1b* (Giardina 1999), *poxa3* (Palmieri y cols. 2003), *pox3*, *pox4* y un pseudogen *pox5* (Pezzella y cols. 2009).

Con el conjunto de información previamente adquirida, en el presente estudio se generó un vector con un sistema de promotores opuestos, que podrá ser empleado para generar silenciamiento de genes que codifican para la enzima lacasa en *Pleurotus ostreatus*, que nos permita evaluar su efecto sobre algunos procesos fisiológicos y acercarnos a conocer la función que tiene esta enzima en dicho organismo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Reportes de genes que codifican para lacasas de *Pleurotus ostreatus*

Actualmente se han realizado estudios en los que reportan nuevos genes que codifican para lacasas en *Pleurotus ostreatus*, tal es el caso del desarrollado por Castanera y cols. (2012) quienes evaluaron el perfil de transcripción de genes que codifican para enzimas lacasas de *Pleurotus ostreatus* en cultivos de fermentación sólida y líquida, empleando extracto de paja de trigo como inductor. De acuerdo con los resultados obtenidos se demostró que el genoma de *Pleurotus ostreatus* presenta 12 genes que codifican para lacasa, por otra parte se realizó una PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) para lograr una estimación precisa de la expresión génica. En los resultados de los perfiles de transcripción en medio líquido, observaron que el 65 % de los genes lacc analizadas fueron expresados diferencialmente (46% de estos genes presentaron menor actividad de la enzima, mientras que el 19% presentó mayor actividad) en comparación con el control, en cuanto al medio de cultivo sólido encontraron que el 42% de los genes se expresaron diferencialmente en comparación con las condiciones del control (El 4% de los genes presentaron menor actividad de la enzima, mientras que el 38% de estos genes presentaron mayor actividad de la enzima). De manera adicional se observó una actividad que aún no se caracteriza (UNK1) y que es inducida específicamente en el cultivo de fermentación sólida y complementa la actividad de Lacc2 y Lacc 10. Por otra parte, reportaron que tanto las actividades enzimáticas de lacasa y los perfiles de transcripción de la familia de genes Lacc difieren mucho entre cepas estrechamente relacionadas por lo que estas diferencias pueden ser objeto de programas biotecnológicos para mejoramiento de la producción de enzimas en los reactores de fermentación líquida.

En este sentido Fernández y cols. (2014) secuenciaron el genoma de *Pleurotus ostreatus*, con el fin de identificar y caracterizar las enzimas responsables de la degradación de la lignina, realizaron expresión heteróloga, estudio de la estructura molecular, propiedades catalíticas, la estabilidad y la capacidad de degradación de la lignina. De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de la secuenciación, se demostró la ausencia de lignina peroxidasa y la presencia de tres peroxidases versátiles (PV) y seis manganeso peroxidases (MnP), así como las estructuras cristalinas de dos de ellas (VP1 y MnP4) mostrando diferencias estructurales

significativas. Se reveló que la peroxidasa versátil es capaz de degradar la lignina. Por otra parte, la doble actividad de Mn-dependiente y Mn-independiente de MnP de *P. ostreatus* justifica su inclusión en una nueva subfamilia peroxidasa. La disponibilidad de todo el repertorio de peroxidases activa la investigación, a nivel bioquímico, de la existencia de genes duplicados. Las diferencias entre las isoenzimas no se limitan a sus constantes cinéticas. No se observaron diferencias sorprendentes en su actividad T50 (Temperatura a la que la enzima retiene el 50% de su actividad tras 10 minutos de incubación) y actividad residual a pH tanto ácido y alcalino. Este trabajo permitió la primera caracterización completa de isoenzimas de peroxidases en un basidiomiceto.

2.2 Participación de las lacasas

La función fisiológica de estas enzimas no ha sido comprendida totalmente, se ha reportado que el propósito fisiológico de la lacasa en las plantas es biosintético, además de participar en el proceso de lignificación, mientras que en insectos participan en esclerotización de las cutículas mediante la oxidación de catecoles a sus quinonas correspondientes. En los hongos, inicialmente se pensaba que las lacasas eran producidas sólo para degradar fuentes complejas de carbono, básicamente la lignina o en la eliminación de fenoles potencialmente tóxicos que surgen durante la degradación de los sustratos naturales en donde se desarrolla (Giardina y cols. 1995). Sin embargo, Shicheng y cols. (2003) realizaron la inducción de actividad de lacasa en *Volvariella volvacea*, creciéndola en un cultivo sumergido en un medio con glucosa como única fuente de carbono, con la obtención de dos isoformas de lacasas, lo cual quiere decir que esta enzima no es producida específicamente para degradar lignina o compuestos fenólicos, que es la función con la que más se ha relacionado, por lo que no queda claro el motivo por el que el hongo la produce. Por otra parte, se le han atribuido funciones que no tienen que ver con la ligninólisis, sino con implicaciones fisiológicas.

Leatham y Stahmann (1981) mencionaron que la lacasa estaba relacionada con la formación del cuerpo fructífero de *Lentinula edodes*, realizaron medios de cultivo con pH diferentes y los cultivos se crecieron en un fermentador a 150 rpm a diferentes tiempos, causando la formación

de pequeños sedimentos miceliales, el cultivo líquido resultante se usó directamente para inocular matraces, para producir una mayor cantidad de inóculo. Se estudiaron las fenol oxidasas a partir de cuerpos fructíferos maduros de *Lentinula edodes*. La principal fenol oxidasa fue una lacasa con un pH óptimo cercano a 4.0 y un peso molecular aparente de 100,000 kDa. También se encontraron otras enzimas como la catecol oxidasa y la tirosinasa. La mayor actividad de lacasa se obtuvo durante la pigmentación del píleo y en el estípite. El aumento de la actividad de lacasa se asocia con un rápido crecimiento de micelio aéreo no pigmentado y la formación de primordios pigmentados y cuerpos fructíferos. Las posibles funciones de la lacasa y su regulación durante el desarrollo de los cuerpos fructíferos siguen en discusión.

Otro estudio en el que se reporta la posible participación de la enzima lacasa en la formación del cuerpo fructífero es en el realizado por Ross (1982) con *Coprinus congregatus*. Los resultados obtenidos en este estudio revelaron que la diferenciación en este basidiomiceto se produce en las zonas de micelio joven, por otra parte las actividades de lacasa obtenidas a partir de extractos de micelio, sugieren una correlación entre los niveles generales de lacasa y el desarrollo de primordios, sin embargo estos niveles están regulados una variedad de regímenes de luz, nutrientes y temperatura, lo cual indica que las lacasas probablemente no están involucradas en el desarrollo de los primordios, pero si en la diferenciación en presencia de luz de la fase inicial del crecimiento en *C. congregatus*, puesto que los resultados obtenidos muestran que cualquier participación de las lacasas en la formación del cuerpo fructífero se limita al proceso de inducción de luz que se requiere en la fase inicial, más que en el desarrollo de primordios, puesto que se demostró que la acción de la luz estabiliza la zona inducida y que puede ocurrir a bajas temperaturas y antes del contacto con el borde sin dar lugar a diferenciación, hasta después del contacto con el borde o un aumento de la temperatura. Esto sugiere que lo que se debe tener activada es la capacidad de permanecer en ese estado por algún tiempo. Los diferentes niveles de lacasa que pueden estar presentes en el momento de la diferenciación, sugieren que no es el nivel más crítico de lacasa el responsable de dicho desarrollo. Por otro lado, la correlación constante entre los altos niveles de actividad lacasa y la inducción de la luz, podría implicar a la lacasa en una inducción inicial o evento

desencadenante de la diferenciación. Además sugieren que las investigaciones sobre el inicio y la regulación de la diferenciación en basidiomicetos deben centrarse en áreas específicas del micelio, más que en las observaciones de todo el micelio.

De Vries y cols. (1986) estudiaron la formación de una lacasa extracelular por *Schizophyllum commune* dicarionte, la que es producida en la obscuridad, mientras que en presencia de luz y en 24°C hubo una disminución de la productividad de la lacasa extracelular. Los monocariones de los que se generó el dicarion no lograron producir lacasas. La actividad del dicarion estuvo presente hasta que la glucosa se consumió y luego disminuyó de manera constante. En su nivel máximo de actividad, la enzima representó aproximadamente el 3% de la proteína extracelular. Purificaron la enzima y se realizaron estudios de especificidad de sustrato al igual que de inhibición de la enzima, mostrando que se trata de una lacasa fúngica típica. La electroforesis de la enzima purificada mostró una banda principal que representa el 98% de las proteínas de lacasa y dos bandas con actividad lacasa de menor importancia. La lacasa principal se utilizó para generar anticuerpos específicos. Detectaron la presencia de lacasa en diversos medios de cultivo por medio de Western blots. La acumulación de la enzima lacasa extracelular en el dicarion se produjo a 30°C. Por otra parte, se ha reportado una significativa actividad de lacasa en el dicarion durante la fructificación, pero sólo en los cuerpos fructíferos jóvenes (Wessels y cols. 1985), también se ha reportado una disminución de la lacasa extracelular en el inicio de la fructificación en *Agaricus bisporus* (Wood 1986), por lo que la participación de la lacasa en el proceso de fructificación todavía no es clara.

Otra función que se le ha atribuido a esta fenol oxidasa es su participación en la formación de los rizomorfos en *Armillaria sp.* reportado por Worrall y cols. (1986), quienes realizaron un estudio en el que emplearon etanol para inducir la formación de rizomorfos y encontraron que la actividad de la enzima lacasa está positivamente correlacionada con la formación de estos, puesto que la lacasa se detectó antes de la aparición de estas estructuras. La actividad máxima de la enzima se alcanzó cuando la tasa de crecimiento de rizomorfos fue mayor y cayó a cero cuando el crecimiento de los rizomorfos cesó. Por estas razones los resultados sugieren un papel de la lacasa en la morfogenésis y/o crecimiento de rizomorfos. Sin embargo, la actividad

lacasa se produce aproximadamente 5 mm detrás de la punta del rizomorfo en crecimiento activo, por lo que es poco probable que la función de la enzima sea estrictamente morfogenética.

Otras funciones biológicas atribuidas a las lacasas más recientemente, incluyen la resistencia y procesos de detoxificación, factores de virulencia, así como la pigmentación de los conidios (Mayer y Staples 2002).

Los estudios antes expuestos fueron realizados de manera indirecta, es decir el objetivo de los estudios no era conocer la función como tal de la lacasa, si no evaluar la manera de inducir la producción de dicha enzima. A pesar de ello, aportan información sobre las posibles participaciones de esta enzima en diversos organismos, sin embargo todas estas funciones no se han comprobado e incluso algunos estudios han llegado a ser contradictorios, puesto que se sugiere que para cada organismo o especie, la función de la enzima es variable, lo que puede deber a las condiciones fisicoquímicas de crecimiento.

2.3 Estudios de genética reversa en hongos

Son pocos los estudios en los que se trata de evaluar la participación de las lacasas de *Pleurotus ostreatus* en cuánto a su fisiología de crecimiento y morfogénesis a través de la inactivación o silenciamiento de sus genes. El silenciamiento génico es una estrategia que requiere que el organismo al que se pretende silenciar cuente con la maquinaria metabólica apropiada para que se realice dicho silenciamiento, por lo que el verificar esta circunstancia es el primer paso para determinar la pertinencia de su implementación.

En este sentido, se han reportado estudios de silenciamiento en hongos, como en el de Oliveira y cols. (2008), en donde realizaron un sistema de clonación eficiente para la construcción de vectores de silenciamiento génico en *Aspergillus niger*. El activador de la transcripción de xilano y genes celulolíticos XlnR de *A. niger* fue elegido como objetivo para el silenciamiento con el vector pXLNRir, enseguida realizaron la transformación de este organismo con dicho

vector. De todas las cepas aisladas (N= 77), nueve mostraron actividades pobres de degradación de xilano en ensayos semicuantitativos, las pruebas mostraron diferentes actividades de degradación de xilano tras la inducción de D- xilosa. Por otra parte, los niveles de transcripción de XlnR se redujeron en las cepas silenciadas, en comparación con la de tipo silvestre. En estas condiciones, los niveles de transcripción de Xyra y xynB (dos genes regulados por el XlnR) también disminuyeron en las cepas silenciadas. Estos resultados indican que el nuevo sistema para la generación de vectores de silenciamiento resultó ser una herramienta eficaz para *A. niger*.

Por otro lado, Keiko y cols. (2010) silenciaron el gen *Lcc1* de *Lentinula edodes* SR-1 con dos vectores de expresión, pChG´-ivrL1 que contiene una secuencia homóloga repetida invertida de 40 pb del exón 1 en secuencia sentido y antisentido, separados por una secuencia de 60 pb del intrón 2 del gen *Lcc1* y pChG´-cL1a que contiene una secuencia antisentido del ARNm del gen *Lcc1*. Ambos vectores tienen como promotor al del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gdp*). La transformación fue realizada con el método de integración mediada por enzimas de restricción (REMI). Los resultados mostraron que la actividad lacasa disminuyó en más del 95% en once cepas con el promotor *ivrL1* y nueve de *cL1a*. En dos de las once cepas de *ivrL1* la secreción de *Lcc1* disminuyó en más de 95% con relación al control. En cuatro transformantes de *cL1a* la secreción disminuyó sólo en un 50% comparado con el control. En cuanto a los efectos en la morfología micelial, el micelio aéreo en SR-1 surgió entre los 10 y 14 días y la densidad micelial se incrementó a los 20 días. Una de las transformantes que no mostraron transcripción no formaron micelio aéreo después de 40 días y la densidad micelial era baja, mostró ramificaciones muy pequeñas, y se observaron diferencias en el grosor y número de capas de la pared celular, lo que sugiere que la función biológica de *Lcc1* está relacionada además con la adhesión celular.

Tomer y cols. (2010) realizaron el silenciamiento del gen *mnp3* que codifica a una peroxidasa dependiente de manganeso en *Pleurotus ostreatus* PC15, una cepa monocarionte, para evaluar su implicación en la degradación del colorante Orange II. La transformación fue realizada con el vector pTMS1. La construcción se basó en el silenciamiento de *mnp3* y fue diseñada para

expresar una sola cadena de ARN que forma una horquilla, correspondiente con la cadena antisentido de 100-1 pb del ADNc de *mnp3*, y un tallo de doble cadena correspondiente con 750-101 pb del ADNc de *mnp3* antisentido alineado a 101-750 pb de la cadena sentido de *mnp3*; la secuencia estuvo bajo el control del promotor y terminador *sdi1* y un cassette de resistencia a carboxina. Lograron aislar treinta transformantes, todas mostraron gran variabilidad en su capacidad de decoloración. Al determinar si la alteración en los niveles de transcripción de la familia de genes de MnP estaba relacionada con los cambios en los niveles de decoloración, se observó que la intensidad de la expresión varió en respuesta a la cantidad de Mn^{2+} agregado al medio, excepto para los genes *mnp3* y *mnp9* que no fueron afectados en el tratamiento sin Mn^{2+} , pero fueron fuertemente inhibidos en el tratamiento con Mn^{2+} de 24 a 79 veces más alto que el control. El *mnp4*, no fue afectado en el tratamiento sin Mn^{2+} (menos del doble), sin embargo en el tratamiento con Mn^{2+} fue de 8 a 24 veces más alta. Estos resultados muestran que el silenciamiento no necesariamente afecta a todos los miembros de una familia génica. La importancia adicional de este estudio radica en que nos permite observar la factibilidad del silenciamiento en *P. ostreatus*, que es la especie de estudio del presente trabajo.

Otro estudio de silenciamiento génico útil para el presente estudio fue el realizado por Marcial (2011), en el que realizó la identificación y silenciamiento mediado por un mecanismo de ARN de interferencia, de una aspartato proteasa producida por *Amylomyces rouxii* y su efecto sobre la actividad tirosinasa. Se seleccionaron los genes para la rhizopuspepsina-2 y -6, producidas por *Rhizopus* sp, como modelos de silenciamiento (utilizándose dos fragmentos de diferente tamaño, 412 y 910 pb, para el gen de la rhizopuspepsina-2 y uno solo, de 455 pb, para el de la rhizopuspepsina-6). Se construyó un plásmido con cada uno de los fragmentos de genes de rhizopuspepsina, insertado entre dos promotores orientados en sentido contrario, el *Pgdp* y *Ppki*. Tras la transformación de la cepa silvestre de *Amylomyces rouxii*, se seleccionaron cinco transformantes con la construcción que incorporaba el fragmento de 412 pb y dos con la que contenía los fragmentos de 910 y 455 pb. La transformante A412-3 presentó mayor porcentaje de inhibición: 80%, y 91% a las 48 y 96 h de cultivo, respectivamente, mientras que las transformantes obtenidas con el fragmento de 910 pb sólo

alcanzaron a inhibir el 25% de la actividad proteasa a las 48 h, en promedio. Las dos transformantes obtenidas con el fragmento de 455 pb presentaron 68% de inhibición de la actividad proteasa a las 48 h de cultivo. Por otra parte, la construcción del vector para el silenciamiento por RNAi mediado por fragmentos de dsRNA resultó ser una herramienta molecular eficiente para inhibir la actividad proteasa.

Estos estudios son de gran importancia para el presente trabajo, puesto que aportan información sobre técnicas empleadas para la construcción de vectores de silenciamiento, además de mostrar la viabilidad del silenciamiento para la evaluación de la participación fisiológica de los productos de ciertos genes también en hongos.

3. JUSTIFICACIÓN

El objetivo de proyectos actuales de genómica es la identificación de genes de diversos organismos, sobre todo de aquéllos que codifican para productos como metabolitos de importancia aplicados a diversas áreas, como la biorremediación, la medicina, la de industrias alimentarias, entre otras, tal es el caso de las lacasas de *Pleurotus ostreatus*. Una de las funciones más estudiadas y discutidas de las lacasas es su participación en la degradación del polímero de lignina. Por otra parte, se ha descrito su implicación, en otras especies de hongos distintas a *Pleurotus*, en procesos que no tienen que ver con degradación si no en cuestiones tales como coloración de los conidios, procesos de esporulación, formación de cuerpo fructífero, así como, formación de los primordios y rizomorfos entre otras. Sin embargo, a pesar de que es evidente la importancia que tiene esta enzima en el organismo, aún se desconoce la razón principal por la que el organismo produce dicha enzima.

Para determinar la función de un gen se ha recurrido a diversas vías, una de ellas es el silenciamiento génico por ARN de interferencia (ARNi) que ha mostrado ser una herramienta poderosa para este fin. Este mecanismo permite el silenciamiento de uno, varios o todos los miembros de una familia multigénica, de esta forma se pueden observar cambios graduales en el organismo. Para implementar este mecanismo es necesario conocer las secuencias de los genes de interés, así como las estrategias de construcción de vectores que logren el fin deseado, la evaluación técnica en cuanto al tamaño del fragmento de ADN específico para el silenciamiento de algún gen en particular y pruebas de eficiencia de transformación para que en su momento se logren obtener mutantes que posean la característica deseada. Los antecedentes de este tipo de estudios en hongos son pocos, sin embargo, dan la pauta para intentar realizar la construcción de vectores específicos para genes de interés y evaluar su efectividad dentro de estudios de genética funcional. Contar con este tipo de vectores es importante puesto que se puede emplear para la transformación de *Pleurotus ostreatus* u otro organismo que produzca esta enzima y generar mutantes silenciadas, que posteriormente sean sometidas a diversos estudios y así, generar información básica sobre la función de dicha enzima. Estos estudios son de relevancia, dado que entender el por qué un organismo está produciendo la enzima de interés, es una contribución esencial para su manejo.

4. OBJETIVOS

4.1 General

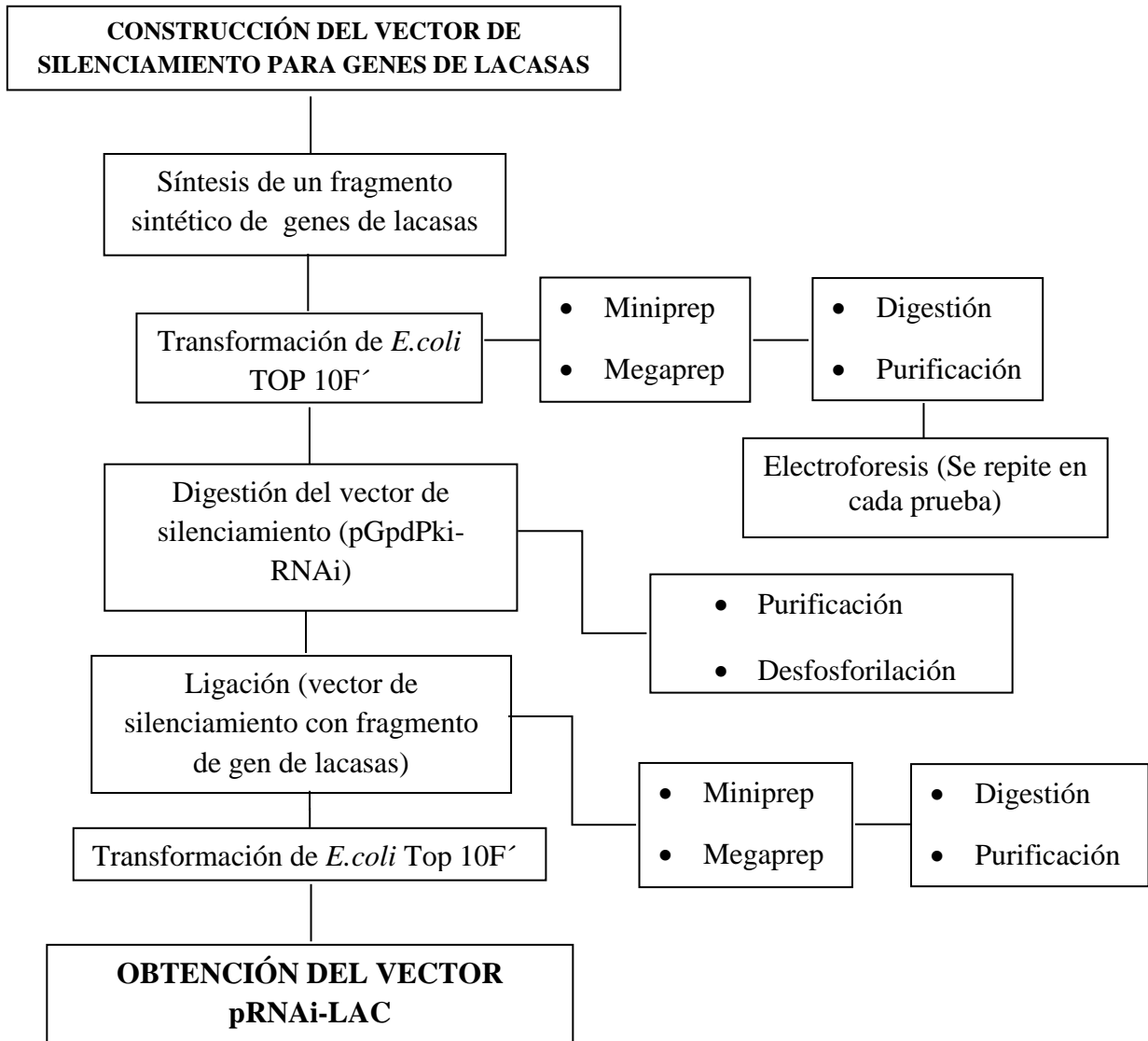
- ❖ Generar un vector de silenciamiento específico para genes que codifican para enzimas lacasa de *P. ostreatus*.

4.2 Específicos

- Obtención del fragmento exónico conservado de genes de lacasa.
- Obtención de la construcción del vector de silenciamiento específico para genes de lacasa, utilizando como base al plásmido pJMQ-RNAi.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diagrama general de la metodología



5.2 Vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi

Este vector de silenciamiento (Figura 4) contiene promotores: *Pgpd* y *Ppki*, en sentido opuesto y enfrentados, separados por un sitio de restricción *NcoI*, así como un cassette de resistencia a fleomicina (*Pgdh::ble::Tcyl*), como marcador de selección para las cepas de hongos de este estudio.

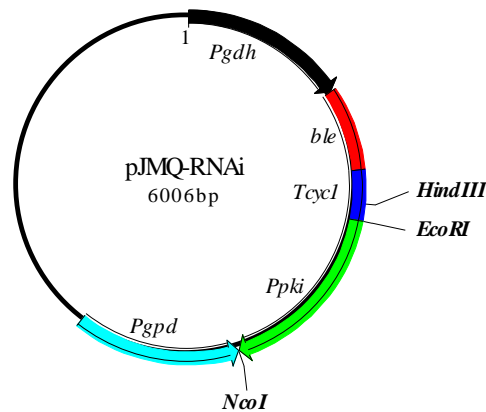


Figura 4. pGpdPKi RNAi (Tomado de Marcial 20012).

5.3 Organismos

5.3.1 Microorganismo de estudio



Figura 5. *Pleurotus ostreatus* PoB.

Para llevar a cabo este estudio, se utilizó la cepa nativa de la especie *Pleurotus ostreatus* cepa PoB (figura 5). Se trata de una cepa comercial originaria de Japón, de alta productividad, de la colección del Laboratorio Institucional de Hongos Comestibles de la Universidad Autónoma de Chapingo. Se obtuvo por donación de dicha universidad.

5.3.2 *Escherichia coli* (*E. coli*) Top 10F'

Fue donada por el Laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría, del Distrito Federal. Se eligió este organismo puesto que se trata de una bacteria competente y ha sido utilizada en experimentos de transformación debido a la alta eficiencia que puede conseguirse con ella.

5.4 Medios de cultivo

5.4.1 Cultivo de *E. coli*

Se utilizaron los siguientes medios:

- Luria-Bertani (LB-medio líquido) (Miller 1972)
- LA (Medio sólido) (2% p/v)

5.4.2 Cultivo de *Pleurotus ostreatus*

Se cultivó el hongo en matraces Erlenmeyer con 50 mL de medio de cultivo líquido Extracto de Malta (EM) (DIBICO) con las condiciones del fabricante, durante un mes. Se conservó en refrigeración, para su utilización en los estudios posteriores.

5.5 Construcción del vector de silenciamiento específico para genes de lacasas (pRNAi-LAC)

5.6 Estrategia 1

5.6.1 Extracción del gen que codifica para lacasas del pJET

Cortés (2012) cultivó *Pleurotus ostreatus* cepa PoB, durante 20 días, realizó perfiles zimográficos, obteniendo tres isoenzimas de lacasas, por otra parte obtuvo ADN del organismo, que amplificó por medio de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), obteniendo 3 bandas que oscilaban entre 2,000 y 2700 pb, la secuencia de la banda de 2700 pb

dio como resultado un 99.8% de similitud con el gen POX2 de lacasa de *Pleurotus ostreatus*. Posteriormente, clonó el fragmento de 450 pb aproximadamente, en un vector de clonación (pJet) utilizando la enzima de restricción *Hind* III, pero esta enzima realiza cortes romos y el vector de silenciamiento tiene cortes cohesivos, por lo tanto no fueron compatibles, por lo que se diseñaron primers específicos para los extremos de los sitios de clonación del plásmido con secuencias de corte para la enzima de restricción *Nco*I, que es la común entre el fragmento y el plásmido pGpdPki-RNAi (vector de silenciamiento) para unirse en extremos de tipo cohesivo los cuales servirían como adaptadores en los extremos del fragmento.

La secuencia de los primers es la siguiente:

***Nco*I-silR:** 5'-GCA CCA TGG AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG-3'

***Nco*I-silF:** 5'-ATA CCA TGG CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC-3'

La recuperación del fragmento se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa, en donde se amplificó sólo el fragmento clonado en pJet (vector de clonación linear), quedando así con los extremos artificiales *Nco*I. El protocolo de amplificación mediante PCR utilizado fue el siguiente:

Se hizo un baño de hielo, en donde se colocaron las muestras para su utilización.

La mezcla de reacción se realizó en tubos Eppendorf de 200 μ L mantenidos a 4°C durante todo el proceso, los reactivos utilizados se muestran en la tabla 1.

ADN (20-30 ng)	5 μ L
Buffer taq 10X	5 μ L
MgCl (50 mM)	1.5 μ L
Primer SilR (1:10)	2 μ L
Primer SilF (1:10)	2 μ L
DNTPs (20 mM)	2 μ L
ddH ₂ O	32 μ L
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5 U μ L)	0.5 μ L

Tabla 1. Reactivos para PCR

La PCR se llevó a cabo en un termociclador My Cycler (Bio-Rad), el programa utilizado consta de los siguientes pasos:

Desnaturalización: Calentamiento para la separación de las dos hebras del ADN, mediante una incubación breve (30-120 s) a 96°C.

Templado (o hibridación): Consiste en la hibridación de los primers (SilR, SilF), que al unirse a secuencias de ADN delimitan la región que se desea amplificar. La temperatura usada durante este paso fue de 52°C.

Elongación (o replicación): Etapa de amplificación en la que la *Taq* ADN polimerasa a una temperatura de 72°C, elonga los primers, empleando como molde ambas hebras originales. La replicación transcurre en la dirección 5'- 3' a partir del extremo 3'-OH de cada cebador, empleando como sustrato los cuatro dNTPs, hasta terminar la lectura del molde o hasta que se comience el siguiente ciclo.

El conjunto de los tres pasos constituye un ciclo, para tener la cantidad necesaria de la secuencia amplificada, se repite este ciclo 30 veces.

5.7 Estrategia 2

Esta parte consistió en tratar de obtener el fragmento de ADN de genes de lacasa mediante PCR del ADN genómico. Se inició con el alineamiento de las secuencias de nucleótidos de genes que codifican para lacasa con el fin de diseñar primers con cortes *NcoI*, para obtener el fragmento que se insertaría en el vector de silenciamiento con extremos de corte coincidentes con dicho vector y obtener así la construcción del vector de silenciamiento específico para lacasas ((**pRNAi-LAC**)).

5.7.1 Extracción de ADN

Se extrajo ADN de *Pleurotus ostreatus* cepa PoB con DNAzol (Invitrogen), con la finalidad de obtener el fragmento de interés para la realización del presente estudio, se trata de un procedimiento que utiliza un reactivo compuesto y completo para el aislamiento del ADN genómico de muestras sólidas y/o líquidas. El protocolo que se realizó fue el siguiente:

El primer paso consistió en realizar la lisis celular; para este propósito se maceraron 35 mg de la muestra después de su congelamiento con nitrógeno líquido. Al homogeneizado se le adicionó 1 mL del reactivo DNAzol y se homogenizó dando pequeños pulsos con un vórtex (T-GENIE2). La mezcla se centrifugó en seguida durante 10 minutos a 11,000 rpm a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante obtenido a un tubo nuevo estéril.

Posteriormente se precipitó el ADN contenido en el sobrenadante con la adición de 0.5 mL de etanol al 100%, se mezcló la muestra mediante pulsos e inversión del tubo durante 3 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se centrifugó a 6000 rpm durante 2 minutos para obtener el pellet de ADN.

Después se realizó el lavado del pellet de ADN precipitando con la adición de 0.8 a 1 mL de etanol al 75%. Para el lavado se suspendió el ADN en el etanol por inversión del tubo, manteniéndolo verticalmente para que el pellet de ADN vuelva al fondo para después retirar el etanol del tubo.

Después de haber removido el etanol, se dejó secar el ADN durante 15 segundos.

En seguida se disolvió en agua estéril y se conservó en refrigeración, hasta su uso.

5.7.2 Diseño de primers (Alineamiento)

Se realizó el alineamiento de las secuencias de los genes que codifican para lacasas, con el fin de identificar los sitios conservados para el diseño de los primers. Después de diseñados se incluyó en uno de sus extremos (5') las secuencias de cortes para *NcoI*, de tal forma que el amplicón resultante, luego de la digestión con esta enzima de restricción, tuviera extremos coincidentes con los del vector plasmídico pGpdPki-RNAi (vector de silenciamiento). Los primers fueron diseñados para amplificar una región de aproximadamente 450 pb.

La secuencia de los primers diseñados es la siguiente:

FRAG LAC 1 (Forward)

5'- CGG CCA TGG ATG TTT CCA GGC GCA CGG-3'

FRAG LAC 2 (Reverso)

5'- CGC CCA TGG GGT GGA AAG ATG CGA ATG-3'

5.7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se realizó PCR en las mismas condiciones antes descritas.

5.8 Estrategia 3

5.8.1 Plásmido comercial (fragmento sintético de gen de lacasas)

Se mandó sintetizar un fragmento correspondiente con una secuencia exónica conservada de genes de lacasas de 318 pb aproximadamente, con secuencias de reconocimiento para cortes con *NcoI* en ambos extremos, esto para facilitar la ligación con el vector de silenciamiento. El fragmento sintetizado estaba integrado en un plásmido comercial, cabe mencionar que esta estrategia fue la que nos proporcionó resultados favorables, por lo tanto fue con la que se logró la obtención de la construcción del vector de silenciamiento específico para genes de lacasas (**pRNAi-LAC**). La secuencia del fragmento de gen de lacasas se muestra a continuación.

5'CGGCCATGGATGTCGTGGCCCCTCAAATGCGGGGCTCGCCCACTCCCGATAGA
 CACTCATCAATGGCATAGGTCGCTACGCTGGGGGTCTACTTCCCCTCTGGCCGTC
 ATCAACGTCGAAAGCGGCAAGCGATATCGTTTCCGACTCATCTCCATGTCTTGCGA
 CCCCAATTACAGTTCTCGATCGACGGTCACACTTTGCCGGTTATTGAAGCAGATG
 CAGTCAATATTGTGCCCTTGACGGTATGTTTCATATACTGACAACACAAACACAT
 TCTGAATCATCTTGATGTAGTGGATAGTATCCATGGCGC-3'

5.8.2 Digestión del plásmido comercial

Se digirió el plásmido comercial con la enzima de restricción *NcoI* (Fermentas), para liberar el fragmento del gen y comprobar que estaba ligado al plásmido. Esta enzima reconoce una secuencia de nucleótidos específica dentro de la molécula de ADN y lo corta en ese punto, llamado sitio diana o de restricción. El mecanismo de corte de ADN se realiza a través de la ruptura de dos enlaces fosfodiéster en la doble hebra, lo que da lugar a dos extremos de ADN. Éstos son cohesivos/escalonados. Una vez realizada la mezcla de la digestión (Tabla 2), se incubó durante tres horas a 37°.

Vector comercial (0.5-1 µg/µL)	6 µL
Buffer Tango 10X	1 µL
Enzima <i>NcoI</i> (0.5-2 µL)	0.5 µL
Agua	2.5 µL

Tabla 2. Reactivos para la digestión del plásmido comercial.

5.8.3 Electroforesis en gel de agarosa de la digestión del plásmido comercial

Se trata de una técnica empleada para verificar la presencia de ADN después de la extracción, también para el análisis de los productos obtenidos después de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como la separación del mismo por su peso molecular, en este caso

empleada para verificar la digestión del plásmido comercial. Por tal razón, después de cada prueba, ya sean extracciones, PCR o digestiones, se debe realizar una electroforesis con un gel a diferentes concentraciones de agarosa, esto va a depender del tamaño de la molécula que se espera resolver. En el presente estudio se realizaron geles de 1.5%.

Cuando se ha completado la electroforesis, se puede revelar mediante la adición de un colorante específico o algún compuesto intercalante para de esta manera poder observar la molécula de interés, en este caso empleamos bromuro de etidio al 10%, debido a que tiene la capacidad de intercalarse entre las bases del ADN y a que emite una señal luminosa cuando se irradia luz UV sobre el gel. Los geles se tiñen con este compuesto durante 15 minutos; posteriormente se coloca en un foto documentador (Gel Doc 1000 de Bio Rad) y se digitaliza la imagen. Cabe mencionar que en cada electroforesis se colocó un marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder) el cual nos permite determinar el peso molecular de las bandas obtenidas en cada muestra.

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

En un baño de hielo se colocaron tubos eppendorf para realizar la mezcla, se colocaron 20 μ L de la digestión y 2 μ L de buffer de carga. La solución se cargó en un gel de agarosa al 1.5%. La migración de las muestras se llevó a cabo en Buffer TBE 1X a 85 V.

5.8.4 Purificación del fragmento de gen de lacasas obtenido de la digestión a partir del gel

La purificación del fragmento obtenido de la digestión a partir del gel se realizó con el Kit Zymoclean (ZYMO RESEARCH), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN fue resuspendido en 30 μ L de buffer de elución y se mantuvo a -20° C, hasta su uso.

5.8.5 Digestión del fragmento del gen de lacasas obtenido del plásmido comercial

El fragmento sintético de gen de lacasas se digirió con la enzima *NcoI* y se incubó a 37°C, durante toda la noche, en la tabla 3 se muestran las condiciones de la reacción.

Fragmento sintético (0.5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	3 μL
Buffer Tango 10X	1 μL
Enzima <i>NcoI</i> (0.5-2 μL)	.5 μL
Agua	5.5 μL

Tabla 3. Reactivos para la digestión del fragmento del gen de lacasas.

5.8.6 Digestión del plásmido de silenciamiento (pGpdPki-RNAi)

Por otra parte se digirió el plásmido de silenciamiento (pGpdPki RNAi) con la enzima *NcoI*, se mantuvo en incubación a 37°C durante toda la noche, en la tabla 4 se muestra las condiciones de la reacción.

Vector de silenciamiento (40-50ng)	15 μL
Buffer 10X	2 μL
Enzima (1 U)	1 μL
Agua	2 μL

Tabla 4. Reactivos para la digestión del plásmido de silenciamiento.

5.8.7 Desfosforilación del plásmido de silenciamiento (pGpdPki-RNAi)

En el caso de plásmido de silenciamiento, tras su digestión se llevó a cabo una desfosforilación de los extremos 5' para evitar religaciones. La desfosforilación se realizó con la enzima fosfatasa alcalina (*Bio Labs*) obtenida de camarón. Las condiciones de la reacción se muestran en la tabla 5.

Vector de silenciamiento (0.5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	3 μL
Buffer Tango 10X	2 μL
Enzima <i>NcoI</i> (0.5-2 μL)	0.5 μL
Agua	14.5 μL

Tabla 5. Reactivos para la desfosforilación del plásmido de silenciamiento.

5.8.8 Ligación

Una vez confirmado el tamaño y la secuencia del fragmento se realizó la ligación del fragmento de interés y el plásmido de silenciamiento (pGpdPKi RNAi) con la enzima ADN ligasa T4 (Fermentas), con las indicaciones del fabricante (Tabla 6). Posteriormente se corroboró que el fragmento se haya insertado en el vector de clonación, para ello se corrió la muestra en un gel de agarosa al 0.7%.

Buffer 5X	2 μL
Inserto de ADN (variable)	8 μL
Vector de clonación (10-100 ng)	2 μL
Enzima 1 u/ μL	1 μL

Tabla 6. Reactivos para la ligación.

La mezcla se incubó a 22°C durante 1h.

5.9 Transformación de células competentes de *E. coli*

Se colocó en un tubo eppendorf las células competentes *Escherichia coli* Top10F', con la mezcla de ligación (20 μl), se mezcló y se incubó a 37°C durante una hora.

Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm, se decantó un poco de sobrenadante, quedando así el sedimento, el cual se mezcló y se vertió en las placas con medio LB y ampicilina, se esparció bien hasta quedar completamente seco.

5.9.1 Extracción del ADN plasmídico mediante el método de miniprep

Se seleccionó una placa con células transformadas, se tomó una colonia que fue inoculada en un tubo eppendorf que contenía medio LB con ampicilina, se incubó a 37°C durante 18 h a 200 rpm. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 minuto, se decantó, resuspendiendo el pellet en 350 µL de STET (SDS, Tris HCl, EDTA, tritón), se agregaron 10 µL de lisozima en una concentración de 10 µg/mL⁻¹ mezclando suavemente, el tubo se colocó en un recipiente con agua en ebullición durante un minuto, se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 10 minutos, el pellet formado en la parte inferior del tubo se retiró del sobrenadante con un palillo estéril, se agregaron 40 µL de acetato de sodio 3M a pH 5.2 y 600 µL de isopropanol, se mezcló y se mantuvo durante 15 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante, el pellet se lavó con 500 µL de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a 14000 rpm durante 5 min, finalmente el sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en 30 µL de agua libre de RNasas. Con el objetivo de corroborar la extracción del plásmido se realizó electroforesis, colocando en un baño de hielo un tubo eppendorf y agregando 2 µL de tampón de carga y 3 µL de la muestra, en otro tubo se colocó el tampón de carga y se sustituyó la muestra por un marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder) para determinar el tamaño de las bandas obtenidas en la muestra, la reacción se llevó a un volumen final de 20 µL con agua MilliQ estéril, posteriormente se colocó en el termobloque (eppendorf) a 50° C durante 30 segundos, se sacaron y se colocaron en un baño de hielo durante 2 min. La mezcla se cargó en un gel de agarosa al 1.5% y se corrió a 80 V durante 95 min en buffer TAE 1X. Terminada la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz ultravioleta. Se tomó una imagen del gel con el foto-documentador.

5.9.2 Extracción de ADN plasmídico mediante el método de megaprep

Esta técnica se utiliza en experimentos en los que se requiere una gran cantidad de ADN fácilmente digerible. Para ello se inocularon 100 mL de medio LB con la colonia que porta el plásmido que queremos amplificar, de la misma forma antes descrita. Tras este tiempo se obtuvieron las células mediante centrifugación a 5,000 rpm durante 3 minutos, el precipitado obtenido se resuspendió en 6 mL de STET y la suspensión de bacterias se separó en alícuotas de 350 μ L.

Los pasos que se siguen a continuación son ligeras modificaciones de lo realizado en las minipreparaciones. A cada tubo se le añadieron 20 μ L de una solución de lisozima preparada a una concentración de 10 μ g/mL en agua, enseguida, se mezcló durante treinta segundos y se hirvió durante 45 segundos. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitaron por centrifugación a 14,000 rpm durante 15 minutos y se eliminaron con la ayuda de un palillo estéril. El precipitado blando que se obtiene en este paso ocupa gran parte del tubo y por ello es necesario eliminarlo completamente. El ADN plasmídico se precipitó tras añadir 40 μ L de acetato sódico 3M pH 5.2 y 600 μ L de isopropanol, se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Este tiempo puede reducirse debido a la gran cantidad de ADN obtenido por este método. El ADN se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos y el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v). Posteriormente se secó y el precipitado correspondiente de cada alícuota se resuspendió en 100 μ L de MilliQ. Tras la resuspensión del ADN se reunieron todas las fracciones en un mismo tubo y se limpió la solución de ADN mediante fenolización. Posteriormente se precipitó de acuerdo con los métodos habituales y se resuspendió en un volumen adecuado con agua estéril.

6. RESULTADOS

Para lograr los objetivos del presente estudio se emplearon tres estrategias, puesto que en el trayecto se presentaron complicaciones, siendo la tercera la que nos arrojó resultados favorables; no obstante, a continuación se muestran los resultados que se lograron obtener de las estrategias antes mencionadas.

6.1 Estrategia 1

En las pruebas realizadas en esta etapa no fue posible obtener el fragmento de gen de lacasas con extremos *NcoI* para ligarlo al vector de silenciamiento, debido a que aunque si fue posible extraerlo del vector de clonación, no se pudieron ligar los adaptadores para tener los extremos compatibles para su integración al vector de silenciamiento.

6.2 Estrategia 2

6.2.1 Extracción de ADN

Se obtuvo el ADN de *Pleurotus ostreatus* en las condiciones antes descritas, enseguida, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para poder visualizar las bandas, en el primer carril se colocó un marcador de peso molecular ($\lambda PstI$) como referencia para poder saber el tamaño de las bandas obtenidas de ADN. En la figura 6 se puede ver ADN total en el carril 3, 5 y 7

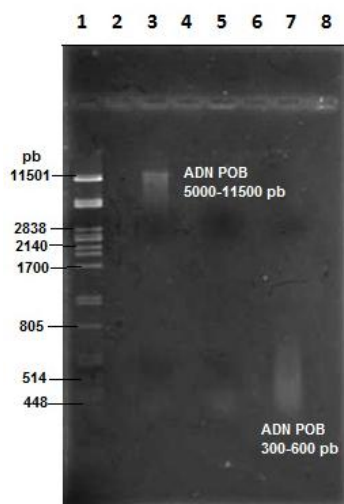


Figura 6. Extracción de ADN. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular ($\lambda PstI$), en los carriles 3, 5 y 7 ADN total de *Pleurotus ostreatus*.

6.2.2 Diseño de primers (Alineamiento)

Se realizó el alineamiento utilizando las secuencias de nucleótidos de ARNm que codifican para lacasas de *Pleurotus ostreatus*. En la figura 7, se muestran las regiones utilizadas para el diseño de los nuevos primers para la obtención del fragmento de 450 pb, los nucleótidos marcados con amarillo son las secuencias de los primers, en el inciso(a) se muestra la secuencia del primers Frag-Lac (Inicial) y en el inciso (b) la secuencia del primers Frag-Lac2 (terminal).

(a) Alignment Report of 'Untitled' - ClustalW (Slow/Accurate, IUB) : miZrcoles, 27 de noviembre de 2013 06:02 p.m.

Majority	-----ATGTTTCCAGGCGCACGGATTCTCGCTACGCTTACCTTAGCCCTTCA-CTTTTACATGGGACT	
	+ + + + + + +	
	10 20 30 40 50 60 70 80	
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----	
mRNAparcialCHSH.seq	-----	0
mRNA Pox1.seq	-----CAGAACACGTATGTTTCCAGGCGCACGGATTCTCGCTACGCTTACATTAGCTCTTACACCTTTTACATGGGACT	73
mRNA Pox2.seq	-----ATGTTTCCAGGCGCACGGATTCTTGCTACGCTTACCTTGGCCCTTACATCTTTGCATGGGGCT	63
mRNA pox3 PO.seq	-----ATGATTGCGCCTGTACTCTCATTGGCCTCACTGTCCTTTGTTACTTTCTCCACA	57
mRNA Poxalb.seq	ACCGCATCCCTCAGCCGATCTCCCATGGCGGTTGCATTCGTTGGCCTTGTTCACCTCGCATTAGCACTCGTACCGGTT	80
mRNAcomp1 1.seq	-----ATGTTTCCAGGCGCACGGATTCTTGCTACGCTTACCTTGGCTTTCATCTTTTACATGGGACT	63
mRNAcomp1 2.seq	-----	0
mRNAcomp1 pox4.seq	-----ATGCGCACATTCTCCCGCTTCTCGCTCGCTGACGCTCTTCTCTGGCTTCAGTCGGGGCC	63
mRNAcomp1 .seq	-----ATGTTTCCAGGCGCACGGATTCTCGCTACGCTTACATTAGCTCTTACACCTTTTACATGGGACT	63
mRNAparcial.seq	-----	0

(b) Majority	TTTCCTGTACGACTTCAACGTCCCGACCAAGCTGGAACGTTTTGGTATCATTTCGCATCTTTCCACCCAAATATTGTGATG	
	+ + + + + + +	
	410 420 430 440 450 460 470 480	
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----	
mRNAparcialCHSH.seq	CTTCCTATATGACTTCAACGTCCCGACCAAGCTGGCACGTTCTGGTACCATTTCGCATCTTTCCACCCAGTATTGTGATG	386
mRNA Pox1.seq	CTTCCTATATGACTTCAACGTCCCGACCAAGCTGGCACGTTCTGGTACCATTTCGCATCTTTCCACCCAGTATTGTGATG	461
mRNA Pox2.seq	TTTCCTGTACAATTTCAATGTCCTGATCAAGCTGGAACGTTTTGGTATCACTTCGCATCTTTCCACCCAAATATTGCGAGC	457
mRNA pox3 PO.seq	TTTCGAGTACAACCTTCAACGTCCCGAACAAAGCCGGTACCTTTGGTACCAGCCCACTACGGCACGCAATACTGTGAGC	418
mRNA Poxalb.seq	GTTTTTGTACGACTTCGAAGTCCCTGATCAAGCTGGAACATTTTGGTATCACTCTCATCTTTGGGACACAAACTGTGATG	441
mRNAcomp1 1.seq	TTTCCTGTACAATTTCAATGTCCTGATCAAGCTGGAACGTTTTGGTATCACTTCGCATCTTTCCACCCAAATATTGTGATG	457
mRNAcomp1 2.seq	GTTTTTGTACGACTTCGAAGTCCCTGATCAAGCTGGAACATTTTGGTATCACTCTCATCTTTGGGACACAAACTGTGATG	358
mRNAcomp1 pox4.seq	TTTCCTGTACGACTTCAACGTTCCGGATCAAGCTGGTACATTTTGGTACCATTTCGCATCTTTCCACCCAAATATTGTGATG	445
mRNAcomp1 .seq	CTTCCTATATGACTTCAACGTCCCGACCAAGCTGGCACGTTCTGGTACCATTTCGCATCTTTCCACCCAAATATTGTGATG	451
mRNAparcial.seq	-----ACTGGTACCTTCTGGTATCATAGTCATCTCTCAACGCAGTATTGCGATG	49

Figura 7. Región nucleotídica utilizada para el alineamiento de las secuencias de genes que codifican para lacasas de *Pleurotus ostreatus*, (a) primers Frag-Lac 1, (b) primers Frag-Lac2.

6.2.3 PCR

Después de haber obtenido el ADN total, se realizó la PCR en las condiciones antes mencionadas, para obtener el fragmento de interés. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para verificar la presencia del fragmento el cual se muestra en la Figura 8.

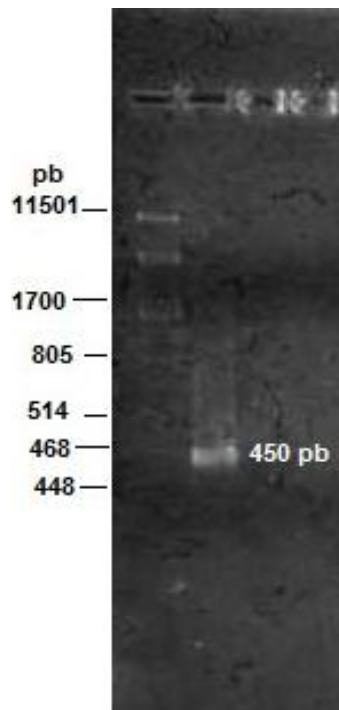


Figura 8. Producto de PCR obtenido con los primers FRAG LAC 1 Y FRAG LAC 2. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular ($\lambda PstI$) y en el segundo el producto de PCR.

6.2.4 PCR con gradientes de temperaturas

Al intentar realizar la ligación del vector de silenciamiento con el fragmento de interés, se presentaron complicaciones y se realizaron pruebas de comprobación para verificar el inserto, para ello, se realizó electroforesis para resolver el fragmento y se pudieron observar en el mismo carril bandas de distintos pesos moleculares. Para tratar de obtener sólo una banda, se realizó la PCR con un gradiente de temperaturas, es decir, a diferentes grados de temperatura, sin embargo, no se logró obtener una sola banda, como se muestra en la figura 9.

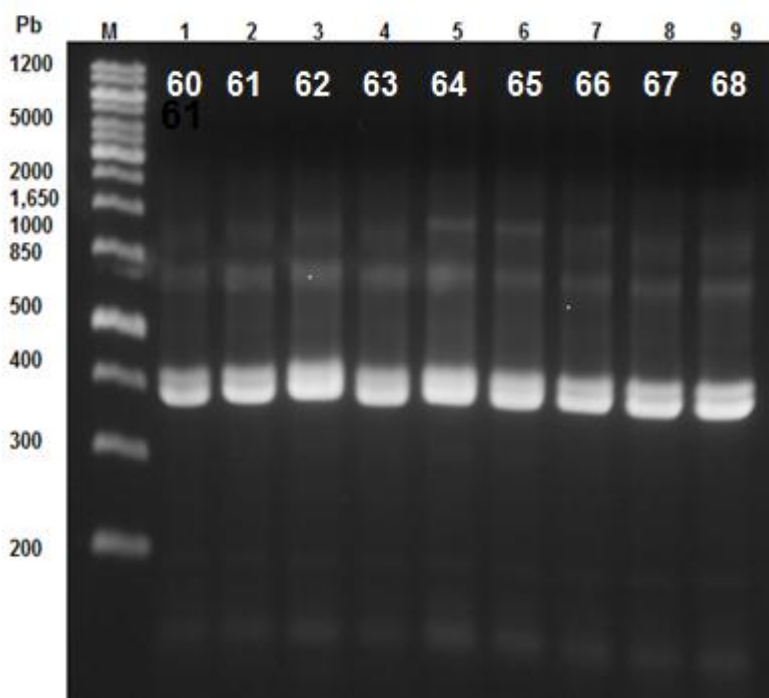


Figura 9. PCR de gradientes 60-68°C.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la PCR de gradiente, no se consideró conveniente usar esta mezcla de fragmentos puesto que al estar las bandas muy unidas una de la otra se complicaría cortar una en específico, por otra parte si realizaba la construcción así como aparece en la figura 8, no se tendría la seguridad de tener vectores con un solo fragmento lo que podría constituir cambios importantes en la estrategia. Por tal motivo el presente estudio se realizó con la estrategia 3.

6.3 Estrategia 3

6.3.1 Digestión del plásmido comercial con el fragmento del gen de lacasas

Se realizó la digestión de un plásmido comercial que contenía un fragmento sintético del gen para lacasas. Enseguida, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, para corroborar la presencia del fragmento del gen sintético. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, como referencia para conocer el peso molecular

aproximado de las bandas obtenidas como producto de la digestión. En los carriles 1 y 2, se colocaron muestras de la digestión. En ambos carriles se observó una banda de 3,500 pb aproximadamente, correspondiente con el plásmido comercial y una de 300 pb aproximadamente, que correspondía con el fragmento del gen de lacasas, como se muestra en la figura 10.

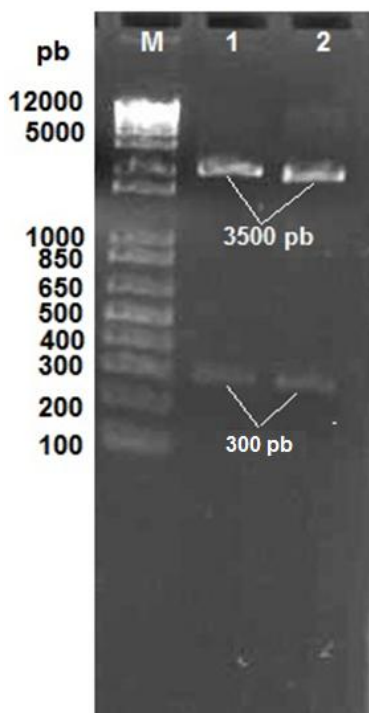


Figura 10. Digestión del plásmido comercial con *NcoI*.

6.3.2 Transformación y miniprep del plásmido comercial

Una vez confirmada la presencia del inserto del gen en el plásmido comercial, se procedió a transformar *E. coli* Top 10F' en las condiciones antes descritas, se observaron transformantes crecidas en medio LA, como se muestra en la figura 11.

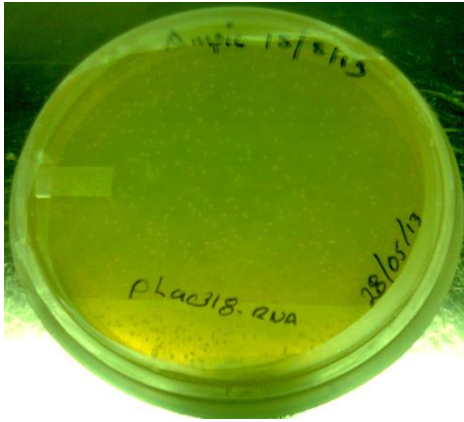


Fig. 11. Transformantes obtenidas con el inserto del gen sintético en *E. coli*.

Por otra parte se realizó la miniprep y enseguida la electroforesis para corroborar que las colonias que crecieron en la placa, realmente fueron transformadas, posteriormente se realizó la digestión a partir de la solución obtenida de la miniprep y enseguida la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. En los carriles 1, 2, 3, 4 se muestran las digestiones de las cuatro minipreps de las colonias al azar. En el carril 5 se muestra el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, como referencia para conocer el peso molecular aproximado de las bandas obtenidas como producto de la digestión, en todos los carriles se observaron las bandas correspondientes con el plásmido y el fragmento del gen de lacasas, como se muestra en la figura 12.

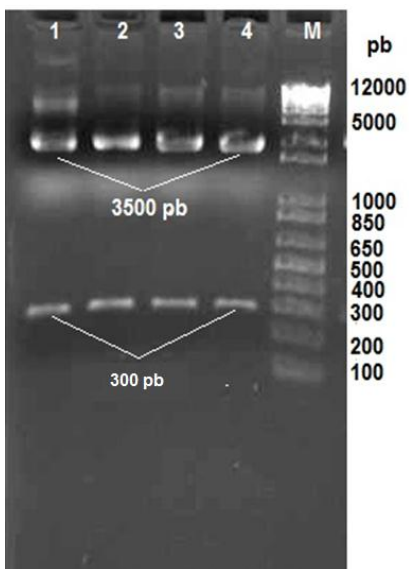


Figura 12. Digestión de la miniprep con *NcoI*.

6.3.3 Megaprep del plásmido comercial

Se realizó la megaprep, con el fin de obtener mayor cantidad de muestra, así como la digestión y posteriormente la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. En los carriles 1 y 2 las muestras digeridas de la megaprep, Se observó en ambos carriles la banda del plásmido y del inserto, como se muestra en la figura 13.

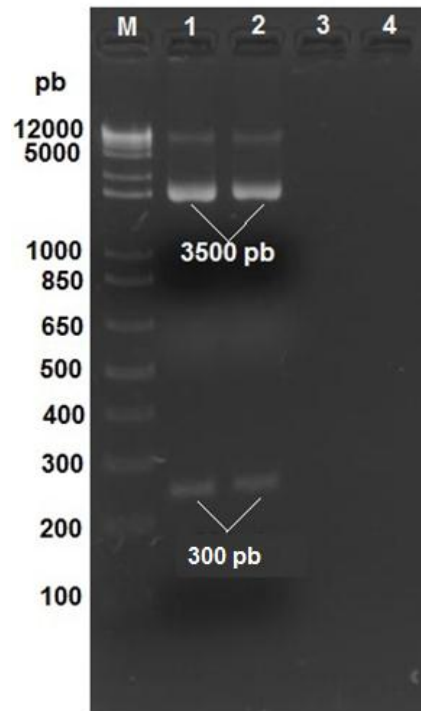


Figura 13. Digestión de la megaprep con *NcoI*.

6.3.4 Digestión de pGpdPki-RNAi

Se digirió el vector de silenciamiento (pGpdPki-RNAi) con la enzima *NcoI*, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar la presencia del vector de silenciamiento en su forma lineal. En los carriles 1 y 2 se observó una banda de 6000 pb aproximadamente, en el último carril se colocó el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, como se muestra en la figura 14.

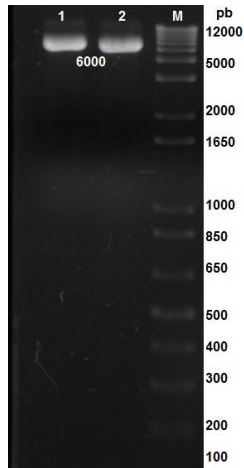


Figura 14. Digestión del vector de silenciamiento (pGpdPki-RNAi) con *NcoI*

6.3.5 Desfosforilación de pGpdPki-RNAi

Una vez digerido el plásmido se desfosforiló en las condiciones antes descritas y se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, en la figura 15 se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. En los carriles 2 y 3, las muestras 1 y 2 de la desfosforilación.

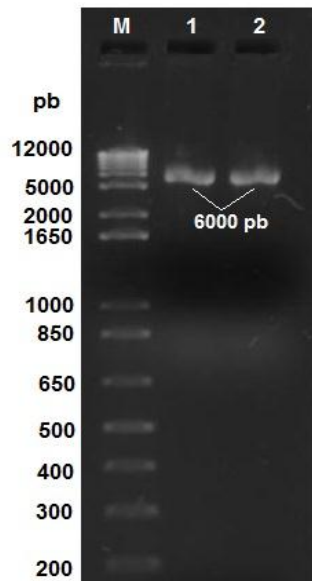


Figura 15. Desfosforilación del vector de silenciamiento con fosfatasa Alcalina

6.4 Construcción del vector de silenciamiento específico para genes de lacasa (pRNAi-LAC)

6.4.1 Transformación y MINI-PREPS de la construcción del vector de silenciamiento específico para genes de lacasa (pRNAi-LAC)

Se transformó *E. coli* Top 10F' con la construcción del plásmido de silenciamiento con el fragmento del gen de lacasas, se crecieron las células en medio LA y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Pasado este tiempo se observaron colonias transformantes como se muestra en la figura 16.

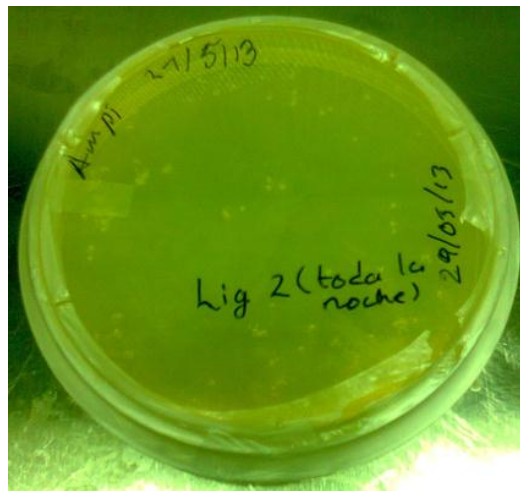


Figura 16. Colonias de *E. coli* transformadas con el plásmido pRNAi-LAC

Enseguida se realizó una miniprep en las condiciones antes mencionadas y se comprobó mediante digestiones del ADN plasmídico que las células crecidas tuvieran el inserto, esto se observó en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, en los carriles 1, 2, 3, 4 se colocaron las muestras de la digestión de la miniprep y se pudo corroborar que las células si fueron transformadas con el vector de silenciamiento que contenía nuestro fragmento de interés ya que en todos los carriles se observaron bandas de 6,000 pb aproximadamente correspondientes con el vector de silenciamiento y en la parte inferior se muestra una banda de 300 pb aproximadamente la cual corresponde con el fragmento de interés, como se muestra en la figura 17.

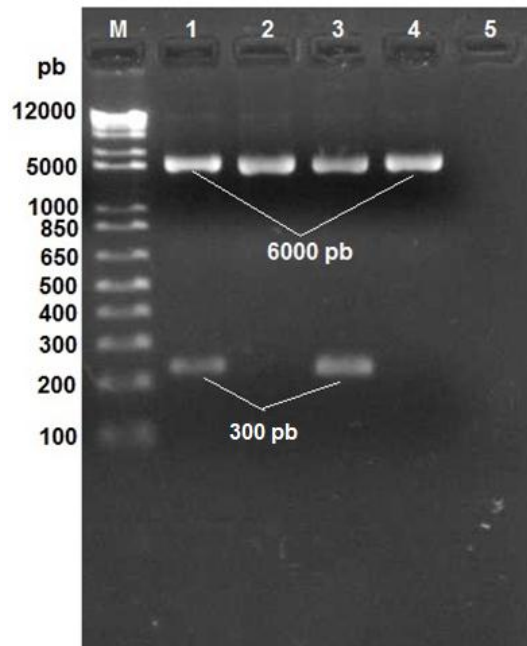


Figura 17. Digestión de la miniprep de células transformadas con la construcción del vector de silenciamiento (pRNAi-LAC)

6.4.2 Extracción del plásmido (MEGA-PREPS) de la construcción del vector de silenciamiento específico para genes de lacasa (pRNAi-LAC)

Con el fin de extraer el plásmido de las células y tener suficiente muestra para las pruebas posteriores se realizó la megaprep, enseguida la digestión y se corroboró mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, en los carriles 1 y 2 las muestras digeridas de la megaprep, en ambos carriles se observaron dos bandas, la primera de 6,000 pb aproximadamente la cual corresponde con el vector de silenciamiento y la segunda de 300 pb aproximadamente y que corresponde con el fragmento de interés, como se muestra en la figura 18.

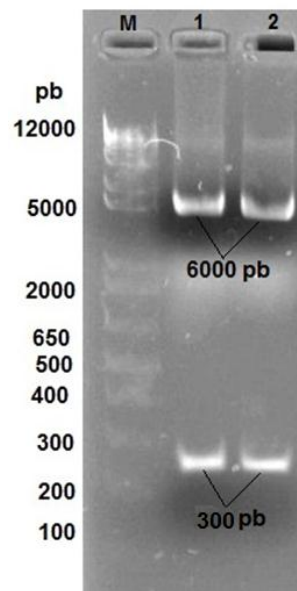


Figura 18. Digestión de la megaprep de células transformadas con la construcción del vector de silenciamiento (pRNAi-LAC)

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se obtuvo la construcción del plásmido de silenciamiento pRNAi-LAC, específico para genes de lacasas de *Pleurotus ostreatus* con el fin de silenciar estos genes, para tener un mejor conocimiento de la participación de esta enzima en el organismo, tomando en cuenta el potencial biotecnológico de la cepa utilizada. El método por ARNi ha demostrado ser eficaz para la regulación de la expresión génica en la mayoría de los eucariotas, incluyendo vertebrados, plantas, protistas y hongos (Nakayashiki y Nguyen, 2008). Además, a diferencia de la interrupción de genes por métodos convencionales, el ARNi confiere sólo la reducción parcial (knock-down), pero no una pérdida completa (knock-out) de la expresión de los genes. La supresión de genes incompletos con frecuencia da lugar a variaciones fenotípicas que pueden proporcionar más información detallada acerca de la función del gen silenciado (Nakayashiki y Nguyen, 2008).

Estudios previos han demostrado que es posible realizar silenciamiento génico en *Pleurotus ostreatus*, puesto que se necesita que el organismo tenga un mecanismo que permita que se activen los complejos enzimáticos necesarios para que se lleve a cabo dicho proceso. Tomer y cols. (2010) identificaron los componentes clave de la maquinaria del ARN que provoca el silenciamiento génico (Argonauta, Dicer y RdRP). Por lo tanto emplearon un enfoque basado en ARNi (knock-down) para el silenciamiento de los genes que codifican para una MnP dependiente seguido por la evaluación de la decoloración del colorante Orange II, así como, los niveles de transcripción de la familia de genes MnP en las cepas correspondientes, lo que demostró que la expresión de peroxidasas MnP, puede ser directamente asociada con las capacidades de degradación lignolíticas de *P. ostreatus*.

Por otra parte, en cuanto a la construcción se refiere, es sabido que las construcciones de plásmidos con promotores en sentido opuestos y enfrentados han dado buenos resultados, consiguiéndose con ellos una considerable cantidad de transformantes con silenciamiento génico. Estos tipos de vectores se han utilizado con éxito para demostrar el uso de ARNi modelo de los genes y para explorar la función de genes en una amplia gama de especies de

hongos. Marcial (2011) construyó un vector de silenciamiento (pGdpPki-RNAi) para silenciar el gen que codifica para aspartato proteasas, probando fragmentos de diferentes tamaños de 412pb, 455pb, 910pb, con lo cual, se pudo observar que si hubo diferencias entre ellos, obteniendo 39, 23 y 18 transformantes, respectivamente. Este vector fue empleado en el presente estudio para la generación del vector de silenciamiento para lacasas (pRNAi-LAC) debido a que, presenta importantes características, tales como, un solo sitio de corte para la introducción del fragmento de interés, así como promotores que se encuentran enfrentados (*Pgdp* y *Ppki*) y orientados en sentido contrario, los cuales, serán los encargados de generar ARNs complementarios (ARNds), que posteriormente provocarán la degradación del ARNm mediante la acción de las enzimas antes mencionadas, razón por la cual podrá ser empleado en estudios posteriores para transformar el organismo. Keiko y cols. (2010) construyeron dos vectores de expresión pChG'-ivrL1, que es un vector de expresión con secuencias homologas de *Lcc1* repetidas e invertidas, y pChG'-cL1a, el cual es un vector de expresión antisentido (*lcc1* RNAm), para silenciar el gen *lcc1* con un fragmento de 40 pb. Dos de las transformantes con *ivrL1* (*ivrL1* # 26 e *ivrL1*# 32) presentaron supresión del gen *Lcc1*. Por otra parte se ha reportado silenciamiento en transformantes con el vector antisentido pChG'-cL1a (Heneghan y cols. 2007). En las transformantes con *ivrL1* (*ivrL1* # 26 e *ivrL1*# 32) se observaron cambios en la morfología, sugiriéndose así que esta enzima puede estar relacionada con la adhesión celular. Sin embargo no se puede asegurar con certeza puesto que el inserto empleado en dicho vector es muy pequeño, por lo cual, posiblemente se pudo haber silenciado algún otro gen.

De acuerdo con los resultados de los estudios expuestos, se puede pensar que el tamaño del fragmento y el método de transformación juegan un papel importante en la eficiencia del silenciamiento.

En el presente estudio se logró la construcción del vector de silenciamiento específico para genes de lacasas pRNAi-LAC con un inserto de aproximadamente 300 pb, tomando como referencia los resultados de los estudios expuestos anteriormente se podría asegurar que al intentar transformar el hongo con este vector los resultados serán favorables.

8. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se obtuvo un vector de silenciamiento denominado pRNAi-LAC, específico para genes de lacasas.

9. PERSPECTIVAS

En el presente estudio se logró ligar el inserto de 300 pares de bases aproximadamente en el vector de silenciamiento, sin embargo, podrían probarse fragmentos de diversos tamaños, lo cual da pauta para obtener las primeras mutantes de *Pleurotus ostreatus* que aporten información sobre la función de la enzima lacasa en este organismo, para ello se sugiere someter a los protoplastos a estudios de sensibilidad al antibiótico, con el fin de conocer la concentración adecuada de fleomicina que permita un mayor porcentaje de regeneración de éstos. Una vez obtenido lo antes mencionado a punto, se puede proceder a transformar el hongo, con lo cual se recomienda hacer resiembras de las cepas transformadas con el fin de comprobar su estabilidad y de esta manera verificar que sigan manteniendo el silenciamiento del gen que codifica para esta enzima.

Por otra parte sería importante que se realizaran pruebas de crecimiento en fermentación tanto sólida como líquida con diversas fuentes de carbono, ya sea simple o compleja, por ejemplo glucosa y lignina, para analizar su comportamiento e ir relacionando los cambios que presentan las mutantes para así dilucidar la función que tiene dicha enzima. Es Así como estudios a nivel de morfogénesis, para dicho fin.

El vector de silenciamiento empleado en el presente estudio podrá ser utilizado para silenciar otros genes del mismo o de otro organismo, para conocer o aportar información acerca de su función.

10. REFERENCIAS

- Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malotra P, Bhatnagar RK y Mukherjee. 2008. RNA interference, biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol*. 67:657-685.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman R, Kanost MY y Kramer K. 2005. Laccase 2 is the phenoxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Dev Biol*. 102: 11337-11342.
- Aramayo R y Timberlake WE. 1990. Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* yA (laccase I) gene. *Nucleic Acids Res*. 18:3415.
- Bao WL, Fukushima Y, Jensen KA, Moen MA y Hammel KE. 1994. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Lett*. 354:297-300.
- Baldrian P, Vendula V, Vera M y Jiri G. 2005. Degradation of ligninocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Res Microbiol* 156: 670-676.
- Bhadauria V, Banniza S, Wei Y, You-Liang P. 2009. Comparative and Functional Genomics. 09: 1-11.
- Buswell JA y Odier E. 1987. Lignin biodegradation. *Crit Rev. Biotechnol*. 6: 1-60.
- Claus H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 35:93-96.
- Claus H., Faber G y König H. 2003. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 59:672-678.
- Castanera RP, Omarini A, Alfaro M, Antonio GP, Vicenza F, Amore A y Ramirez L. 2012. *Appl Environ Microbiol*. 4037-4045.
- Crawford RL. 1981. Lignin biodegradation and transformation. En: Wiley J. (Ed.) *Oxidative degradation of lignin by photochemical and chemical radical generating systems*. New York.

- De Vries MH, Kooistra WHCF y Wessels GH. 1986. Formation of an extracellular laccase by *Schizophyllum commune* dikaryon. J Gen Microbiol. 2817-2826.
- Dittmer NT, Suderman RJ, Jiang H, ZhuY, Gorman MJ, Kramer KJ y Kanost MR. 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccaselike multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. Mol Biol. 34:29-41.
- Endo K, Hosono K, Beppu T y Ueda K. 2002. A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. Microbiol Sgm.148:1767-1776.
- Eslami H, Khorramizadeh MZ, Pourmand MZ, Moazeni M y Rezaie S. 2014. Down-regulation of sidB gene by use of RNA interference in *Aspergillus nidulans*. Iran Biomed J. 18(1): 55-59.
- Fernández FE, Ruiz-Dueñas J, Jesús MM, Romero A, Hammel EK, Medrano FJ y Martínez T Angel. 2014. Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. Biotechnol for Biofuels. 7:2
- Giardina P, Cannio R, Martirani I, Marzullo I, Palmieri G y Sannia G. 1995. Cloning and Sequencing of a Laccase Gene from the Lignin-Degrading Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Appl Environ Microbiol. 2408–2413.
- Giardina P, Aurilla V, CanninoR, Marzullo L, Amoresano A, Siciliano R, Pucci P y Sannia G. 1996. The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. Eur J Biochem. 235: 508-515.
- Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G y Sannia G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. Biochem. J. 341: 655-663.

- Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P, Bouillant M y Bally R. 1993. Polyphenol oxidase from *Azospirillum lipoferum* isolated from the rhizosphere: evidence for a laccase in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. FEMS Microbiol Lett. 108:205-210.
- Guinberteau J. 1990. Definition and taxonomical place of the genus *Pleurotus* in the mushrooms classification. Bulletin de la Federation Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons (Francia) 48: 261-264.
- Guzmán G, Mata G, Salmenes D, Soto VC y Guzmán DL. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. México. D.F.
- Hadar Y, Kerem Z, Gorodecki B y Ardon O. 1992. Utilization of lignocellulosic waste by the edible mushroom, *Pleurotus*. Bio. 3:189-205.
- Harris SD. 2008. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. Mycol. **50** (6): 823–32.
- Heneghan MN, Costa AM, Challen MP, Mills PR, Bailey A y Foster GD. 2007. A comparison of methods for successful triggering of gene silencing in *Coprinopsis cinerea*. Mol. Biotechnol. 35:283-96.
- Herrera T, Ulloa M. 1998. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. (2da.ed.) UNAM-Fondo de Cultura Económica. México DF.
- Huerta P. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Capítulo II Generalidades sobre los hongos, con énfasis en los basidiomicetos. Coedición: El Colegio de la Frontera Sur/ Editorial Limusa. México DF.
- Janeway CA, Travers PJr, Mark W y Shlomchik MJ. Edit. Masson M. 2003. Inmunobiología del sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad) 2ª edición, España.
- Keiko N, Hisayuki W, Yuichi S y Toshitsugu S. 2011. Gene silencing of the *Lentinula edodes* lcc1 gene by expression of a homologous inverted repeat sequence. Microbiol. 166 (2011) 484-493.

Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. 2001. Dictionary of the fungi. CABI Publishing. New York. 655.

Kirk TK y Farrell RL. 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:465-505.

Knapp JS, Newby PS y Reece LP. 1995. Decoloration of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microbial Technol.* 17: 664-668.

Kües U, Y Liu. 2000. Mini-review: Fruiting body production in basidiomycetes. *App Microbiol and Biotechnol.* 54:141-152.

Leatham GF y Stahmann MA. 1981. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J Gen Microbiol.* 125, 147-157.

Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojta-Wasilewska M, Cho NS, Hofrichterl M y Rogalski J. 1999. En: Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungi Genetics and Biology.* 27(2/3): 175-185.

Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, WojtasWasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M., Wesenberg D, y Rogalski J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microb.* 41:185-227.

Litthauer D, Van vuuren MJ, Van Tonder A y Wolfaardt FW. 2007. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *pynoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme Microb. Technol.* 40:563-568.

López T, Silva D, López S y Arias C. 2007. RNA de interferencia: el silencio de los genes. *Biotecnol.* 14:110.

- Manáchere G. 1988. Regulation of sporophore differentiation in some macromycetes, particularly in Coprini: an overview of some experimental studies, from fruiting initiation to sporogenesis. *Cryptogamie, Mycol.* 9: 291-323.
- Marcial J. 2011. Identificación de una aspartato proteasa producida por *Amylomyces rouxii*, silenciamiento del gen que la codifica y efecto sobre la actividad tirosinasa. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH, y Henriques AO. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase which occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J Biol Chem.* 277:18849-18859.
- Matityahu A, Hadar Y, Dosoretz CG y Berlinky PA. 2008. Gene silencing by RNA interference in the White rot fungus *Phanerochaete Chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 74(17): 5359.
- Mayer MA y Staples CR. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochem.*60: 551–565.
- Melo V y Cuamatzi O. 2007. Bioquímica de los procesos metabólicos. 2ª ed. Editorial México: Reverté.
- Milla A. 2007. Introducción al cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*. Publicaciones INEA. Valladolid, Sp.
- Minussi RC, Pastore GM y Duran N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 13:205-216.
- Morozova OV, Shumakovich GP, Shleev SV y Yaropolov YI. (2007a) Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Appl Biochem Microbiol.* 43:523-535.
- Morozova OV, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV y Yaropolov AI. (2007b). Blue laccases. *Biochem.* 72:1136-1150.

- Nakayashiki H y Nguyen QB. 2008. "RNA interference: roles in fungal biology". *Curr Opin Microbiol.* vol. 11, no.6, pp. 1–9.
- Oliveira JM, Van der V, Graff HL y Qin L. 2008. Efficient cloning system for construction of gene silencing vectors in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80:917–924.
- Palmieri G, Cennamo G., Faraco V., Amoresano A., Sannia G y Giardina P. 2003. Atypical laccase isoenzymess from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microbial Technol.* 33: 220-230.
- Palonen H, Saloheimo M, Viikari L y Kruus K. 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme Microbial Technol.* 33: 854-862.
- Peñas M, Ásgeirsdottir SA, Lasa I, Culiañez-Maciá FA, Pisabarro AG, Wessels JGH y Ramírez L. 1998. Identification, characterization, and in Situ detection of a fruit-body-specific hydrophobin of *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol.* 4028-4034.
- Pezzella C, Autore F, Giardina y Piscitelli A. 2009. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Curr Genet.* 55:45–57.
- Pointing SB. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Environ Microbiol.* 57: 20-33.
- Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Macheteau M, Boudet AM y Goffner D. 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases a divergent gene family in poplar. *Eur J Biochem.* 259:485-495.
- Ross, IK. 1982. The role of laccase in carpophore initiation in *Coprinus congregatus*. *J Gen Microbiol.* 128, 2763-2770.

- Regalado V, Rodríguez A, Perestelo F, Carnicero A, de la Fuente G y Falcón MA. 1997. Lignin degradation and modification by the soil inhabiting fungus *Fusarium proliferatum*. Appl Environ Microbiol. 63:3716- 3718.
- Rodriguez E, Pickard M.A y Vazquez-Duhalt, R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. Curr Microbiol.38:27-32.
- Sánchez-Amat A, Lucas-Elio P, Fernandez E, García-Borron JC y Solano F. 2001. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. BBA-Protein Struct. M. 1547:104-116.
- Sánchez C y D Moore. 1999. Conventional histological stains selectively stain fruit body initials of basidiomycetes. Mycol Res 3: 315-318.
- Saparrat, MCN, Guillén F, Arambarri AM, Martínez AT y Martínez MJ. 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the whiterot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. Appl Environ Microbiol. 68:1534-1540.
- Satoshi HN, Kazuki I, Hiroko S, Fumika NH, Akiyo K, Hiroyuki C, Takashi K y Kengo S. 2005. Knockdown of LIM 1S/DMC1 in the mushroom *Coprinus cinereus* by double-stranded RNA-mediated gene silencing. Microbiol. 151:3669-3678.
- Scherer M. y Fischer, R. 2001. Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol Lett. 199:207-213.
- Shicheng C, Dengbo M, Wei G y Buswell J. 2003. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. FEMS Microbiol Lett 218: 143-148.
- Schmidt FR. 2005. About the nature of RNA interference. Appl Microbiol Biotechnol. 67: 429-435.

- Schoemaker HE, Tuor U, Muheim A, Schmidt HWH y Leisola MSA. 1991. White-rot degradation of lignin and xenobiotics. Betts WB. Biodegradation: Natural and synthetic materials: 157-174 London, Springer-Verlag.
- Servili M, De Stefano G, Piacquadio P y Sciancalepore V. 2000. A novel method for removing phenols from grape must. Am J Enol Vitic. 51:357-361.
- Solomon EI, Chen P, Metz M, Lee SK y Palmer AE. 2001. Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. Angew Chem Int. Ed Engl. 40:4570-4590.
- Taylor JW, Bowman ML, Berbee TJ, White. 1993. Fungal model organisms: Phylogenetics of *Saccharomyces* and *Neurospora* of *Aspergillus*. Syst Biol. 42: 440-457.
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiol. 140: 19-26.
- Tlecuitl-Beristain S, Sánchez C, Loera O, Robson GD yGG Díaz. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. Mycol res. 112: 1018-1084.
- Tomer MS, Oded Y, Yitzahak H. 2010. *Pleurotus ostreatus* manganese-dependent peroxidase silencing impairs decolourization of Orange II. Microb Biotechnol. 3: 93.
- Vicuña R. 1988. Bacterial degradation of lignin. Enzyme Microb Technol. 10:645-655.
- Viniegra GG, Favela TE, Aguilar NC, Romero GSJ, Díaz GG y Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system. Biochem Engineering J 13: 157-167.
- Weld RJ, Plummer KM, Carpenter MA y Ridgway HJ. 2006. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. Cell Res. 16: 31-44.
- Wessels JGH, Dons JJM y DE Vries OMH. 1985. Molecular biology of fruit body formation in *Schizophyllum commune*. In Developmental Biology of Higher Fungi. pp. 485-497.

Wood DA.1985. Production and roles of basidiomycete fungi. In *Developmental Biology of Higher Fungi*. Pp. 375-387.

Worrall JJ, Chet I y Hottermann A. 1986. Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria* spp. *J Gen Microbiol.* 132, 2527-2533.

Yaropolov AI, Skorobogatko OV, Vartanov SS y Varfolomeyev SD. 1994. Laccase - Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl Biochem Biotechnol.* 49:257-280.

Yoshida H. 1883. Chemistry of lacquer (*Urushi*). *J Chem Soc.* 43:472-486.

12. ABREVIATURAS USADAS

%: Por ciento

°C: grados centígrados

µg: Microgramos

µL: microlitros

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARNds: Ácido ribonucleico de doble cadena

ARNi: Ácido ribonucleico de interferencia

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ARNsi: Pequeños Ácidos ribonucleicos de interferencia

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

BCF: Buffer citrato de fosfatos

Cm: Centímetros

Cols.: Colaboradores

E. coli: *Escherichia coli*

EM: Extracto de Malta

EMA: Agra extracto de Malta

g/L: Gramos sobre litro

Gdp: gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa

h: hora

Kb: Kilo bases

KCl: Cloruro de potasio

LB: Luria-Bertani

M: Concentración molar

min: Minutos

mL: mililitros

mM: Concentración milimolar

mm: Milímetros

Mn: Manganeseo

MnP: Manganeseo peroxidasa

NaCl: Cloruro de sodio

P.: *Pleurotus*

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEG: Polietilenglicol

pH: Potencial de Hidrógeno

PoB: *Pleurotus Ostreatus B*

rpm: Revoluciones por minuto

SP: Especies

U/L: Unidad sobre litro

α : alfa

ANEXOS

1.- MEDIOS DE CULTIVO

A) Reactivación de la cepa PoB

- **EMA : Empleado para la reactivación y crecimiento del organismo**

Se utilizó el comercial de la marca DIBICO, se siguieron las instrucciones del fabricante.

B) Crecimiento de *E. coli*

- **Luria-Bertani:** Empleado para la propagación y conservación de *E.coli*

Componentes	(g/L)
Bacto-triptona	10 g
Nacl	10 g
Extracto de levadura	5 g

Se ajustó el pH a 7.5 con NaOH y se aforó hasta 1 L. Para su utilización como medio sólido se añadió 2% (p/v) de agar bacteriológico. Se esterilizó y se vertió 25 mL en cajas Petri. Para seleccionar a las bacterias transformantes se adicionó al medio ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL.

2.- EXTRACCIÓN DE ADN

A) Etanol 70%

3.- EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO (MINI-PREPS) Y (MEGA-PREPS)

A) STET

EDTA	50mM, pH 8.0
sacarosa	8% (p/v)
TRIS-HCl	10mM, pH 8.0
Tritón X-100	0.5% (v/v)

B) solución de lisozima preparada a una concentración de 10 µg/mL.

C) Acetato sódico 3M pH 5.2

D) Isopropanol

E) Etanol al 70% (v/v)