



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Evaluación del efecto de la transformación de *Pleurotus ostreatus* con un vector de silenciamiento para lacasas sobre el aprovechamiento de dos fuentes de carbono y el proceso de morfogénesis.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Anahí Armas Tizapantzi

Codirectores: Dra. Alba Mónica Montiel González

Dr. Arturo Estrada Torres

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2019



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Evaluación del efecto de la transformación de *Pleurotus ostreatus* con un vector de silenciamiento para lacasas sobre el aprovechamiento de dos fuentes de carbono y el proceso de morfogénesis.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Anahí Armas Tizapantzi

Codirectores: Dra. Alba Mónica Montiel González

Dr. Arturo Estrada Torres

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2019

HOJA DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Genética y Ambiente 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.



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Posgrado en Ciencias Biológicas



COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Anahí Armas Tizapanzi** realiza para la obtención del grado de **Doctora en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Evaluación del efecto de la transformación de *Pleurotus ostreatus* con un vector de silenciamiento para lacasas sobre el aprovechamiento de dos fuentes de carbono y el proceso de morfogénesis”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., ENERO 21 DE 2019

DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

DR. GERARDO MATA MONTES DE OCA

DR. JAIME MARCIAL QUINO

DR. JULIO CÉSAR MORALES MEDINA

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070, Tlaxcala, Tlax. Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), por el apoyo otorgado durante el desarrollo de este estudio.

Al fondo de Ciencia Básica SEP-CONACyT por el apoyo financiero otorgado 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” con folio 167759.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realizar mis estudios de doctorado con el número de beca 208531.

A la Dra. Alba Mónica Montiel González por la confianza que depositó en mí para la realización del proyecto, por todas las enseñanzas, por los comentarios y por todo el apoyo incondicional recibido.

Al Dr. Arturo Estrada Torres por su asesoría, sus enseñanzas, por los comentarios y su valiosa aportación al estudio realizado.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino por su asesoría, por el apoyo recibido en mis estancias en la UAM-I, por sus enseñanzas, por los comentarios y su valiosa aportación al estudio realizado.

Al Dr. Gerardo Mata Montes de Oca por su asesoría, por el apoyo que recibí en mis estancias en el Inecol-Xalapa, por sus enseñanzas, por los comentarios y su valiosa aportación al estudio realizado.

Al Jaime Marcial Quino, primero que nada, por el vector que me proporcionó y enseguida por los comentarios y su valiosa aportación al estudio realizado.

Al Dr. Julio César Morales Medina por aceptar ser jurado, por sus comentarios y por el apoyo recibido.

A la Dra. Estela Cuevas Romero por aceptar ser jurado, por sus comentarios y por el apoyo recibido.

Cada paso, cada logro se lo debo y dedico a mi mamá Francisca Tizapantzi Galicia, siempre estaré agradecida porque fuiste la primera persona que confió en mí. La persona que siempre me animaba a seguir adelante a echarle ganas y que siempre hizo su mejor esfuerzo para enviarme a la escuela, por todos los sacrificios que hiciste mami ¡Muchas Gracias!

A Daniel Estrada Pérez... Gracias por ser mi compañero de vida, por animarme siempre en mis momentos de flaqueza, por apoyarme en todas las decisiones y acompañarme en cada una de ellas.

A la Dra. Alba Mónica Montiel González, por la confianza que depositó en mí desde el primer momento en que me acerque, por todas las charlas dentro y fuera en el laboratorio, por guiarme no solo en el ámbito profesional sino en el personal también, por la amistad que se ha forjado durante estos años y nuevamente por todo el apoyo incondicional recibido, Dra. ¡Muchas Gracias!

A la Dra. Laura Hernández Cuevas, quien siempre me tendió una mano amiga cuando lo necesite, por todas sus enseñanzas, por las charlas, los consejos, por las asesorías, por animarme siempre ante cualquier situación de manera incondicional, Dra. ¡Muchas Gracias!

A mis compañeras y amigas del laboratorio Rut y Diana, gracias hacer más ameno el tiempo en el laboratorio con la compañía, las risas, las comidas y todas esas charlas dentro y fuera del laboratorio y por el apoyo incondicional que siempre recibí de ustedes.

A todos los que formaron parte del equipo en el laboratorio de Biología Molecular durante estos años compañeros y amigos: Karla, Miri, Santos, Yadira, Arcadio, Samuel, Rodrigo, Selena, Fernando, gracias por el trabajo en equipo y por hacer más divertidos los días de trabajo.

Sin duda, hubo muchas personas que me apoyaron durante este trayecto, Doctores, personal administrativo y de servicios, familiares y amigos... a todos ¡Mil gracias!

Resumen

En este estudio se realizó la obtención de transformantes con diferentes niveles de afectación en su actividad enzimática lacasa, con el objetivo de conocer más acerca de la función fisiológica que desempeñan las enzimas lacasas en el hongo *Pleurotus ostreatus*. Para lograrlo se utilizó un vector de silenciamiento por RNA de interferencia el cual contenía el fragmento de un gen de lacasa para *P. ostreatus* cepa PoB. Se obtuvo una transformante con afectación fenotípica ligera: T7, la cual durante las evaluaciones realizadas mostró básicamente la misma respuesta que la cepa testigo PoB. Se obtuvo una transformante con afectación fenotípica media: T21 y dos transformantes con afectación fenotípica severa: T27 y T26. Durante su cultivo en medio sólido, las transformantes T21, T27 y T26, mostraron cambios en la biomasa producida y en el número de isoenzimas producidas, además, T27 y T26 mostraron cambios en la velocidad media de crecimiento, con respecto a la cepa testigo. Asimismo, la morfología macroscópica en T21, T27 y T26 se ve afectada con respecto a la cepa testigo PoB durante su crecimiento vegetativo. Lo anterior, sugiere que las lacasas podrían estar involucradas en el desarrollo del micelio de *P. ostreatus* durante su cultivo en medio sólido.

Estas diferencias fueron replicadas en el cultivo de dichas transformantes durante su cultivo en paja de trigo, pues se observó que PoB y T7 tuvieron un desarrollo similar, organización miceliar parecida, tiempos de formación de primordios y cuerpo fructífero similares, esporas con tamaños similares, dentro del rango para esta especie. Por su parte, las transformantes afectadas fenotípicamente de manera media y severa no presentaron primordios. La transformante T21 acumuló micelio, pero sin alcanzar a invadir toda la paja. Asimismo, aunque la T27 logró invadir gran parte de la paja de trigo, no fue capaz de desarrollar primordios. Por último, la T26 no logró una invasión completa de la paja y el tiempo en alcanzar una invasión aceptable fue mayor. La incapacidad de formación de cuerpos fructíferos por parte de las transformantes con afectación fenotípica media y severa, coincidió con la incapacidad del correcto desarrollo de su micelio en la paja, incluso desde su desarrollo en el inóculo al usar semillas de trigo. Lo anterior, evidencia cambios en el proceso de morfogénesis de las transformantes, durante su cultivo en paja de trigo.

Sin embargo, para poder analizar mejor dichos cambios, se llevaron a cabo observaciones por microscopia electrónica de barrido. En este análisis se encontraron similitudes entre los componentes de los cuerpos fructíferos de PoB y T7. En el micelio desarrollado en paja de trigo se observaron estructuras tipo toxocisto en el micelio de PoB y T7 las cuales disminuyen en presencia en T21 y T27, al grado de no encontrarlas en T26. Para corroborar los resultados se utilizó el micelio desarrollado también en paja de trigo de una cepa testigo adicional de *P. pulmonarius* IE115 la cual presentó las estructuras tipo toxocisto antes observadas en paja de trigo. Para verificar si las estructuras tipo toxocisto, están presentes durante el cultivo *in vitro* de las cepas, se realizó una observación adicional por microscopia electrónica de barrido, usando como testigo adicional el micelio de *P. ostreatus* cepa 240. Aunque poco frecuentes, se observaron en el micelio de PoB y T7 las estructuras tipo toxocisto observadas en paja de trigo, aparentemente T21 y T27 también presenta estas estructuras y definitivamente no se observaron en T26. En *P. ostreatus* cepa 240 se observaron dichas estructuras de manera incluso más abundante que en PoB.

Los resultados sugieren que la producción de enzimas lacasas en este hongo es necesaria para producir las estructuras tipo toxocisto observadas en el micelio desarrollado en paja de trigo y en EMA/PDA y podría ser que éstas a su vez, son necesarias para llevar a cabo el proceso de fructificación ya que su disminución o ausencia coincide con la incapacidad para formar un cuerpo fructífero.

Por lo que es posible que las lacasas tengan una participación importante en el proceso de morfogénesis del hongo. En cuanto a los resultados obtenidos del aprovechamiento de lignina, estos no permiten evidenciar la participación de las lacasas en el aprovechamiento de lignina en cultivos *in vitro*.

Índice general

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 <i>Pleurotus ostreatus</i>	5
1.1.2 Ciclo de vida de <i>P. ostreatus</i>	6
1.2 Características de las lacasas.....	7
1.3 Función fisiológica de las lacasas	10
1.4 Silenciamiento génico por RNA interferente (RNAi).....	15
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1 Estudios moleculares de las lacasas en <i>Pleurotus</i>	18
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS	24
5.1 General:.....	24
5.2 Específicos:.....	24
6. METODOLOGÍA	26
6.1 Microorganismos utilizados	26
6.2 Vectores utilizados.....	27
6.3 Medios de cultivo.....	28
6.3.1 Medio agar extracto de malta (EMA).....	28
6.3.2 Cultivo en líquido para la obtención de transformantes (YMG).....	28
6.3.3. Cultivo en sólido para evaluar el efecto de la transformación y seleccionar las transformantes en medio YMG-DMP	28
6.3.4. Cultivo para la evaluación del silenciamiento de genes de lacasa	28
6.3.5. Cultivo para la estimación de la velocidad media de crecimiento	29
6.4 Transformación de <i>P. ostreatus</i>	29
6.5 Selección y evaluación de las transformantes	30
6.5.1 Selección de las transformantes afectadas fenotípicamente en distintos niveles	30
6.5.2 Evaluación de los genes de lacasa expresados en cultivo sólido, en cultivo líquido, en paja de trigo y en los cuerpos fructíferos obtenidos.....	31
6.6 Evaluación del silenciamiento de genes de lacasa en cultivo sólido y líquido	32
6.6.1 Obtención de la biomasa y extracto enzimático (EE)	32

6.6.2 Obtención del número de isoenzimas de lacasa por zimografía.....	33
6.6.3 Determinación de la actividad enzimática de lacasa	33
6.6.4 Determinación de proteína total por el método de Bradford.....	34
6.7 Estimación de la velocidad media de crecimiento (VMC) y caracterización de la morfología macroscópica y microscópica de las transformantes.....	34
6.9 Cultivo de las transformantes seleccionadas y de la cepa PoB sobre paja de trigo.....	36
6.9.1 Preparación y siembra del inóculo en granos de trigo.....	36
6.9.2 Preparación y siembra del inóculo primario en paja de trigo	36
6.9.3 Condiciones de incubación y producción en cristalizadores.....	37
6.10 Morfología macro y microscópica de las transformantes y de la cepa nativa, cultivadas sobre paja de trigo.....	37
6.11 Cultivo de las transformantes y de la cepa nativa de PoB usando glucosa y lignina como fuentes de carbono	38
6.11.1 Cuantificación de biomasa y consumo de glucosa y lignina.....	38
6.12. Análisis estadístico.....	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
7.1 Transformación, evaluación del efecto de la transformación y selección de las transformantes afectadas en diferentes niveles	40
7.2 Evaluación del silenciamiento en medio sólido y líquido	43
7.2.1 Evaluación de los genes de lacasa expresados	43
7.2.2 Biomasa producida.....	45
7.2.3 Efecto sobre la actividad de lacasas	46
7.2.4 Isoenzimas producidas	48
7.3 Estimación de la velocidad media de crecimiento (VMC) y caracterización de la morfología macroscópica y microscópica de las transformantes.....	49
7.4 Cultivo de las transformantes seleccionadas y de la cepa nativa sobre granos de trigo.....	54
7.5 Descripción de la morfología macro y microscópica de las transformantes y de la cepa nativa, cultivadas sobre paja de trigo	55
7.6 Observaciones de micelio en paja de trigo y de cuerpo fructífero por microscopía electrónica de barrido	64
7.7 Evaluación de los genes de lacasa expresados en paja de trigo y en los cuerpos fructíferos	72
7.8 Observaciones de micelio desarrollado en EMA y PDA por microscopía electrónica de barrido.....	74
7.9 Cultivo de las transformantes usando glucosa y lignina como fuente de carbono	78

8. CONCLUSIONES	82
9. PERSPECTIVAS	83
10. REFERENCIAS	84
11. PUBLICACIONES	97

1. INTRODUCCIÓN

Los recientes avances en el área de la genómica funcional han aumentado el interés en la investigación científica utilizando como modelo a los hongos. El desarrollo de varios sistemas de manipulación genética, la estandarización de las técnicas de mutagénesis al azar y la mutación genética dirigida, junto con el incremento de la secuenciación de los genomas de una multitud de organismos fúngicos, han hecho posible el incremento del número y la variedad de organismos susceptibles de ser manipulados genéticamente con el fin de estudiar la función de sus genes. Sin embargo, toda esta disponibilidad de herramientas hace que existan muchas posibles combinaciones de estrategias a utilizar para estandarizar su aplicación en un determinado organismo. El reto al iniciar un nuevo proyecto de genómica funcional es complicado, con muchas variables a considerar (Weld y col. 2006), iniciando con el tipo de genes a estudiar.

Generalmente, la selección de los genes utilizados para este tipo de estudios se lleva a cabo considerando la importancia que los productos génicos tienen dentro de algunas áreas de interés humano, o bien, su implicación dentro de procesos de obtención de metabolitos. En el caso del enfoque aplicado de productos génicos, tales como las enzimas, existen algunas exigencias que deben cumplir tanto los productos como los cultivos de organismos de los que provienen, para que sea factible obtenerlos a una escala mayor a la de laboratorio. Éstas pueden ser: altas actividades enzimáticas, sistemas de cultivo y producción baratos, facilidad en su manejo y conservación, entre otros. Por ello, su caracterización debe ser realizada y descrita en una gran gama de condiciones en donde se hayan podido probar sus cualidades.

Sin embargo, para el caso de muchas enzimas de interés biotecnológico aún no se ha podido obtener una producción viable para aplicaciones a gran escala, lo que ha despertado el interés en investigar las razones de este hecho. En este sentido, autores como Weld y col. (2006), Salame y col. (2011) y Pezzella y col. (2013) han propuesto que poseer un mayor conocimiento básico acerca de la función fisiológica que algunas enzimas puedan tener en el organismo productor podría contribuir en el ajuste de muchos otros estudios en los que se tiene el objetivo de establecer condiciones de cultivo que permitan la producción masiva de las mismas.

Además de las bacterias, los hongos se encuentran entre los grupos de organismos que más se usan para la producción de enzimas de interés comercial. Dentro de este reino se encuentran los basidiomicetos, los cuales poseen un complejo enzimático formado por peroxidasas, polifenoloxidasas y fenoloxidasas, que tienen potencial de aplicación en diversas áreas (Glazer y Nikaido 1995). Entre los basidiomicetos, se encuentran los denominados hongos de pudrición blanca, que degradan eficientemente la lignina, debido a su capacidad para producir distintas enzimas extracelulares involucradas en el proceso de biodegradación. Éstas incluyen: lignino peroxidasas (LiP), peroxidasas dependientes de manganeso (MnP), lacasas y oxidasas que generan el peróxido de hidrógeno necesario para la actividad peroxidasa, y se han propuesto como las responsables de la degradación de lignina y compuestos similares (Hatakka 1994). Entre las especies de hongos que han sido estudiados ampliamente se encuentra *Pleurotus ostreatus*, sobre todo por el interés que se tiene en el uso de las enzimas fenoloxidasas y peroxidasas que produce (Muñoz 1995), además de su aprovechamiento como producto alimentario de consumo directo.

1.1 *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus es un hongo saprófito, en su ambiente natural suele crecer sobre ramas y troncos de árboles caídos o en proceso de descomposición, e incluso en el suelo sobre raíces podridas (Herrera y Ulloa 1998). Es un hongo comestible y se cultiva sobre diversos sustratos lignocelulósicos, como paja de cereales, bagazo de caña de azúcar y pulpa de café, entre otros residuos de tipo agroindustrial. Se ha sugerido que esto es posible porque dicho hongo cuenta con un complejo enzimático encargado de la degradación de la lignina. Este complejo enzimático está principalmente compuesto por lignina peroxidasa (EC. 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (EC. 1.11.1.13) y lacasas (EC. 1.10.3.2) (D'Souza y col. 1999). Los hongos ligninolíticos, como *P. ostreatus*, son los principales productores de estas enzimas y, por consiguiente, su utilidad en el reciclaje del carbono proveniente de los restos vegetales es trascendental. Por otra parte, el conocimiento disponible acerca de la biología (ciclo celular), sus características morfológicas (ej. color, tamaño y forma del cuerpo fructífero), microscópicas (ej. tamaño y forma de las esporas), fisiológicas (ciclo de desarrollo de cuerpo fructífero, temperatura de fructificación o de crecimiento micelial), así como el conocimiento de la

genómica y transcriptómica de *P. ostreatus* aunado a que se puede cultivar con facilidad en laboratorio sobre medios sintéticos, hace a dicho hongo un potencial organismo modelo para el estudio de su morfogénesis (Guzmán y col. 1993; Pérez 2002; Pérez y col. 2009; Ramírez y col. 2011).

1.1.2 Ciclo de vida de *P. ostreatus*

El ciclo de vida de los basidiomicetos, grupo de hongos al que pertenece *P. ostreatus*, consta principalmente de tres etapas: El ciclo comienza con una basidiospora, la cual germina y emite un tubo germinativo y un micelio tabicado primario monocariótico haploide. En la plasmogamia, dos micelios primarios compatibles se fusionan y dan origen a un micelio dicariótico (micelio secundario) en el cual permanecen dos núcleos parentales independientes haploides (dicarion, heterocarion) durante el crecimiento vegetativo. *P. ostreatus* presenta un patrón de sexualidad heterotálico, es decir, no es autofértil y para su reproducción requiere de la unión de dos micelios monocarióticos compatibles; por lo cual el micelio producido por la germinación de una basidiospora no puede dar origen al desarrollo de los cuerpos fructíferos. El micelio secundario se caracteriza por la presencia de fibulas (estructuras que permiten la migración nuclear entre hifas en su proceso continuo de elongación). Bajo condiciones ambientales óptimas, el micelio secundario originará el micelio terciario, el cual se encuentra organizado en pseudo-tejidos especializados que producen un primordio; después, se desarrolla el cuerpo fructífero para formar el estípite, el píleo y el himenio, el cual está formado por las láminas. En el himenio se lleva a cabo la formación de los basidios en los que se realiza la cariogamia (fusión de los núcleos haploides) y posteriormente la meiosis que dará origen a cuatro basidiosporas uninucleadas. Cuando éstas son liberadas y encuentran las condiciones adecuadas para su germinación producirán micelio monocariótico, reiniciando el ciclo de vida del hongo (Pérez 2002).

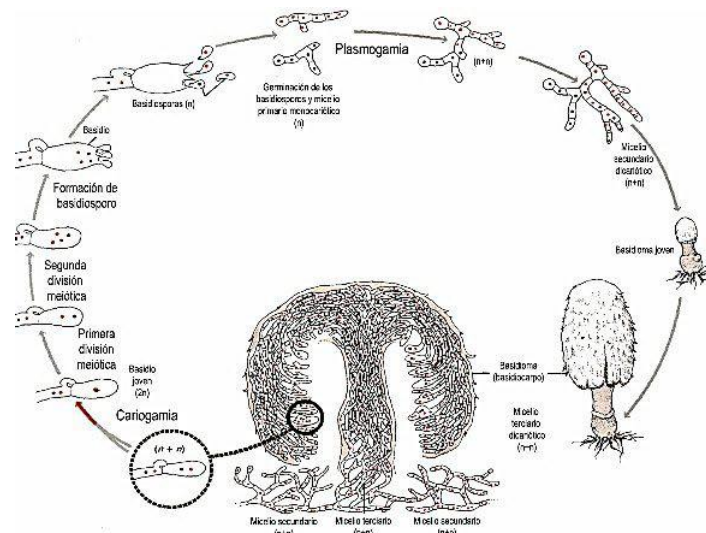


Figura 1. Ciclo de vida de un basidiomiceto típico (Pérez 2002).

Como se ha descrito, la importancia de esta especie no radica solamente en su uso como alimento, sino que se tiene un interés particular por las enzimas extracelulares que produce, debido a que su capacidad para degradar compuestos naturales recalcitrantes como la lignina, permite ejercer su actividad catalítica sobre compuestos de estructura química similar a dicho sustrato, en donde muchos de estos compuestos suelen ser xenobióticos y tóxicos. Dentro de la gama de enzimas de mayor interés biotecnológico que se han estudiado en este hongo se encuentran las lacasas.

1.2 Características de las lacasas

Las lacasas (benzenodiol: oxígeno oxido-reductasas, E.C. 1.10.3.2) son enzimas que poseen la facultad de reducir el oxígeno molecular a dos moléculas de agua y a la par, actúan en la oxidación de un electrón de una amplia gama de sustratos aromáticos (Thurston 1994).

La oxidación de sustratos por enzimas lacasas está acoplada con la reducción de oxígeno molecular, por lo que se generan dos moléculas de agua. Es decir, se requiere la oxidación de cuatro moléculas de sustrato para producir la reducción completa de oxígeno molecular a agua. Se describen como glicoproteínas que utilizan cobre como co-factor y requieren para su actividad catalítica cuatro átomos de cobre por cada proteína activa. Los cuatro átomos de cobre que contienen estas proteínas han sido clasificados por sus propiedades espectroscópicas en tres

tipos (Solomon y col. 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 el espectro 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, éste muestra un máximo de absorbancia a 330 nm (Solomon y col. 1996). 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).

El sitio activo de las lacasas es trinuclear y está formado por cobre de los tipos 2 y 3 (Thurston 1994; Claus 2004). El cobre tipo 1 actúa como primer aceptor de electrones del sustrato y transfiere los electrones al centro del sitio activo trinuclear, que tras recibir cuatro electrones reduce una molécula de oxígeno a agua. Así, la oxidación monoeléctrica del sustrato va acoplada con la reducción por cuatro electrones del oxígeno molecular (Yaropolov y col. 1994). Es por ello que la enzima requiere de cobre y oxígeno para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas y diferentes sustratos no fenólicos, lo que permite que se lleve a cabo la polimerización, despolimerización, metilación y/o desmetilación de compuestos fenólicos (Claus 2004).

El cobre tipo 1 se une a la enzima mediante dos histidinas, una cisteína y una metionina. Los primeros tres residuos son esenciales para la unión del cobre azul, formando un triángulo fuerte con el ion cobre, mientras el enlace con el cuarto residuo (una metionina axial) es más distante y débil, pudiendo ser reemplazado por otros aminoácidos, tales como leucina o fenilalanina. Los otros tres átomos de cobre están acoplados trinuclearmente junto con ocho residuos de histidina. El cobre tipo 2 se encuentra ligado a dos histidinas y una molécula de agua o a una molécula de oxígeno, en cambio el sitio binuclear de cobre tipo 3 contiene tres histidinas ligadas a cada cobre (Nakamura y Go 2005).

Las lacasas se producen como glicoproteínas monoméricas y poliméricas, aunque la mayoría de las lacasas fúngicas se presentan como monómeros, dímeros o tetrámeros. La primera estructura cristalina tridimensional de una lacasa de *Trametes versicolor* se publicó en 2002 (Piontek y

col. 2002). La masa molecular de una lacasa monomérica se encuentra típicamente en el intervalo de 60-110 kDa, con un 10-50% de glicosilación. Se cree que el alto contenido de carbohidratos en la molécula de proteína proporciona una termoestabilidad a las lacasas de hasta 70 °C (Yaropolov y col. 1994). Además, la glicosilación impacta en la secreción de las enzimas y en su actividad (Xu 1999). La mayoría de los hongos de la pudrición blanca producen y secretan más de una isoenzima lacasa, que difieren en grado de glicosilación, secuencia de aminoácidos, peso molecular, pI y especificidad de sustrato (Mansur y col. 2003).

Las lacasas presentan una amplia especificidad de sustrato, puesto que catalizan la oxidación de orto y para difenoles, amino fenoles, dímeros fenólicos de lignina e incluso compuestos no fenólicos en presencia de algunos intermediarios o mediadores redox apropiados (Kawai y col. 1987; Hatakka y col. 1991; Li y col. 1999), por lo que pueden transformar y algunas veces mineralizar por completo una gran variedad de contaminantes ambientales. Los mediadores redox suelen ser compuestos químicos pequeños, que pueden ser oxidados por lacasa y posteriormente reducidos por el sustrato, por lo que actúan como portadores de electrones entre la enzima y el sustrato superando así los impedimentos que tiene el sustrato de llegar al sitio activo de la enzima. Es decir, la reactividad de la enzima lacasa disminuye con el aumento del tamaño del sustrato, por lo que su oxidación puede verse facilitada con el uso de mediadores de lacasa oxidando al sustrato de manera indirecta (Li y col. 1999). Algunos de los mediadores redox usados en el sistema lacasa-mediador son 1-hidroxibenzotriazol (HBT) y 2,2-azino-bis-3etilenbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS), entre otros, además de los que han sido sintetizados químicamente. El HBT, por ejemplo, ha sido usado exitosamente en la degradación de lignina y en el bioblanqueo de la pulpa kraft (Call 1994). La reacción de oxidación de ABTS en presencia de lacasa, es capaz de desmetilar y deslignificar la pulpa kraft (Bourbonnais y col. 1997).

La oxidación puede estar controlada por las diferencias en potencial redox entre los sustratos reductores y el cobre tipo 1 de la lacasa (Thurston 1994). En general, las lacasas tienen baja especificidad por estos sustratos en relación con el oxígeno, la oxidación monoelectrónica de un sustrato por lacasas implica la formación de un radical libre. Luego estos radicales pueden ser oxidados a quinonas por la enzima o bien sufrir reacciones no enzimáticas variadas. La

oxidación de fenoles a menudo produce reacciones de acoplamiento carbono-carbono y carbono-oxígeno entre los radicales, lo que origina productos de mayor peso molecular que los sustratos, es decir, reacciones de polimerización. La tendencia de esta enzima de provocar polimerización no es una desventaja en los procesos de biorremediación, ya que la polimerización oxidativa de los contaminantes puede ser un método aceptable para su eliminación (Rodríguez-Rincón 2006).

1.3 Función fisiológica de las lacasas

Se ha investigado respecto a la función que desempeñan las lacasas en los diferentes organismos en los que se han encontrado (plantas, insectos, bacterias, arqueas y hongos). En plantas, por ejemplo, se ha sugerido un posible papel de las lacasas en la polimerización de compuestos fenólicos, lo que pudiera contribuir en la defensa de la planta contra infecciones (Walker y Ferrar 1998). Posteriormente, en el árbol de laca se encontró que las lacasas están implicadas en una respuesta primaria a heridas; tras la herida, el árbol de laca secreta un látex que, en contacto con el aire, polimeriza en una reacción dependiente de enzimas lacasas, formándose una película protectora (Davies y Ducros 2001). También se ha encontrado que dichas enzimas intervienen en fenómenos de pigmentación de la cubierta de la semilla de *Arabidopsis* que es causada por la polimerización oxidativa de flavonoides (Pourcel y col. 2005). Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas que actúan en la defensa contra los depredadores y patógenos en las semillas (Dixon y col. 2002), aumentan la cubierta de la semilla y su latencia (Debeaujon y col. 2000) y protegen contra la radiación UV (Winkel-Shirley, 2002). En plantas de tabaco, se encontró que las lacasas influyen en el crecimiento y desarrollo de la planta, de acuerdo con el estudio realizado por Nasrin y col. (2010) en donde se indujo la sobreexpresión de lacasas en flores de tabaco. Las flores de tabaco presentaron un color intenso, tal vez por los altos niveles de antocianinas detectados en las plantas transgénicas, también se observaron estambres y pétalos duplicados, posiblemente como resultado de los cambios en la producción de las lacasas que pueden influir en la expresión de genes para la organización y/o identidad floral, las anteras presentaron un color marrón, cambio en la coloración que podría ser en parte debido a la oxidación anormal de flavonoides (Nasrin y col. 2010).

En el caso de insectos, se ha descrito la presencia de estas enzimas en el escarabajo rojo *Tribolium castatum* (Arakane y col. 2005) y en el gusano de seda *Bombix mori* (Yatsu y Asano, 2009), en los que se ha propuesto su participación en la pigmentación de la cutícula por su capacidad para oxidar compuestos fenólicos. Por último, se ha detectado una lacasa en la saliva y glándulas salivales de *Nephotettix cincticeps* (Hattori y col. 2005 y 2010). Se considera que la saliva desempeña importantes funciones fisiológicas en la desintoxicación de sustancias tóxicas derivadas de las plantas que los insectos ingieren, por lo tanto, se atribuye que las lacasas encontradas en la saliva y en las glándulas salivales juegan un papel crucial en la determinación de la compatibilidad entre el insecto y la planta (Hattori y col. 2015).

El primer reporte de presencia de lacasas en bacterias fue en *Azospirillum lipoferum* (Givaudan y col. 1993) y posteriormente se sugirió que las lacasas estaban involucradas en la melanización (Faure y col. 1994). Después, se identificó a la lacasa CotA, que es un componente de la cubierta de las endosporas de *Bacillus subtilis* (Hullo y col. 2001). Se encontró que CotA participa en la biosíntesis de un pigmento de color pardo de la espora, probablemente del tipo de la melanina (Driks, 2004), que es el responsable de la protección frente a la radiación UV y el peróxido de hidrógeno. CotA ha sido la primera lacasa bacteriana cristalizada en la que se pudieron detectar motivos únicos que no se han observado en las lacasas de eucariotas (Enguita y col. 2003). También se han detectado lacasas en otras especies de este género, por ejemplo, *Bacillus sphaericus* (Claus y Filip, 1997), *Bacillus halodurans* (Ruijssenaars y Hartmans, 2004), *Bacillus licheniformes* (Koschorreck y col. 2008) y *Bacillus pumilus* (Reiss y col. 2011), aunque en dichos estudios se enfatizó en la detección de actividad lacasa y en algunos se ha llegado a purificar y caracterizar.

También, se han identificado y caracterizado lacasas en varias especies del género *Streptomyces*: en *S. griseus* IFO 13350, *S. cyaneus* CECT 3335, *S. lavendulae* REN-7, *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* A3(2) y *S. ipomea* CECT 3341 (Endo y col. 2002 y 2003; Arias y col. 2003; Suzuki y col. 2003; Machczynski y col. 2004; Dubé y col. 2008; Molina-Guijarro y col. 2009, respectivamente), sólo por mencionar algunas. No obstante, solo la lacasa EpoA producida por *S. griseus* ha sido caracterizada y estudiada en cuanto a su función (Endo y col. 2002 y 2003). EpoA es una lacasa homotrimérica que parece desempeñar un papel en la morfogénesis de *S.*

griseus. Se sugiere que un subproducto generado durante la biosíntesis de la melanina por EpoA sobre la oxidación de la dihidroxifenilalanina estimula específicamente la diferenciación celular. Dicha enzima contiene los tres tipos de Cu, un pH y temperatura óptima de 6.5 y 40 °C respectivamente, con un peso molecular de la proteína nativa de 114 kDa y estructura dimérica.

En el caso de arqueas, la función fisiológica de las lacasas aún no se ha esclarecido, debido a la baja concentración en la que se han encontrado. En un estudio llevado a cabo por Sharma y Kuhad (2009) se reveló la posible existencia de lacasas en diferentes grupos de arqueas como son *Haloarcula marismortui* ATCC 43049, *Natronomonas pharaonis* DSM2160 y *Pyrobaculum aerophilum* IM2, entre otras. En el año 2010, se purificó y caracterizó la primera lacasa (LccA) producida por la arquea *Haloferax volcanii*, la cual es una enzima termoestable que presenta una gran tolerancia a elevadas concentraciones de sal y disolventes orgánicos y un pH óptimo de reacción alcalino de entre 6-8.4 (Uthandi y col. 2010).

En el caso de hongos se ha descrito que las lacasas desempeñan una gran variedad de funciones. En ascomicetos como *Aspergillus nidulans*, se han caracterizado al menos dos lacasas con diferentes funciones. Una lacasa, producto del gen *yA*, se encuentra involucrada únicamente en la síntesis del pigmento verde de los conidios de *A. nidulans* (Clutterbuck 1972) y otra lacasa (lacasa II) se localizó en las hifas de los primordios cleistoteciales y en las células globosas de paredes gruesas que rodean a los cleistotecios de *Aspergillus nidulans*, en donde se sugiere que la lacasa puede participar en la síntesis de pigmento cleistotecial (Hermann y col. 1983). A las lacasas extracelulares de *Botrytis cinerea*, que es un hongo patógeno de muchas plantas hortícolas, se les ha relacionado con el proceso patogénico hacia las plantas, por ejemplo, en pepino degradan cucurbitacinas y triterpenos tetracíclicos que son compuestos que protegen a la planta de la infección (Bar-Nun y Mayer 1990). Sarmak y col. (2015) analizaron la expresión del gen *pbrB* en el hongo patógeno oportunista *Talaromyces (Penicillium) marneffeii* y encontraron que el gen codifica para una enzima lacasa expresada en altos niveles durante el desarrollo asexual, es decir, durante la formación de conidios, pero no durante el crecimiento vegetativo celular. En su estudio sugieren que la síntesis de la dihidroxinaftaleno melanina contribuye a la coloración verde de los conidios durante el desarrollo asexual, por lo que asumen

que la alta expresión del gen *pbrB* está involucrada en la biosíntesis de la melanina durante la conidiación.

Del mismo modo en basidiomicetos, en el estudio realizado por Wood (1980) se pudo observar que durante el crecimiento del micelio de *Agaricus bisporus* eran producidas grandes cantidades de lacasa extracelular y durante el desarrollo de los primeros cuerpos fructíferos ocurrió una disminución importante de estas enzimas, es decir, hubo una regulación de su producción. Por otra parte, un estudio realizado por Leatham y Stahmann (1981) reportaron un incremento de la actividad lacasa durante el crecimiento del micelio aéreo de *Lentinula edodes*, asimismo se observó un incremento gradual de dicha enzima asociado con el crecimiento de los primordios; también se observó actividad lacasa en áreas pigmentadas del cuerpo fructífero: en el píleo (ligeramente pigmentado) y cinco veces más actividad en la corteza superior (más pigmentada) que en el resto del hongo, por lo que se sugiere la posible participación de las lacasas en la formación de primordios y en la pigmentación del cuerpo fructífero en *L. edodes*. Por su parte, Das y col. (1997) reportaron que el cultivo miceliar de *P. ostreatus* var. *florida* produce al menos dos lacasas, L₁ y L₂, en su estudio indujeron la obtención de mutantes por N-metil-N'-nitrosoguanidina. Las mutantes con baja producción de lacasas L₂ tuvieron un crecimiento miceliar pobre y no pudieron formar cuerpos fructíferos, mientras que las mutantes recuperadas de la mutación desarrollaron un crecimiento miceliar y cuerpo fructífero similar al de la cepa parental por lo que sugieren que L₂ podría tener una participación importante en el crecimiento vegetativo del hongo. Continuando con los estudios en *L. edodes*, Zhao y Kwan (1999) analizaron la expresión de dos genes de lacasa, lac1A y lac1B en dicho hongo, evaluando su presencia en diversas etapas de desarrollo. Encontraron que la actividad lacasa en el píleo del hongo fue de 1.113 U/g, 34 veces más alta que en el estípite (0.033 U/g) y 13 veces mayor que en los primordios (0.083 U/g), por lo que sugieren que las lacasas pueden jugar un papel en la morfogénesis del basidioma de esta especie. En el basidiomiceto de pudrición blanca *Pycnoporus cinnabarinus* se identificó la producción de una sola isoenzima lacasa y trazas de una peroxidasa que no es LiP ni MnP (Eggert y col. 1996; Bermek y col. 1998), por lo que se le atribuye casi exclusivamente a la lacasa la función de degradación de la lignina en este hongo. Además, Temp y Eggert (1999) reportaron que el característico pigmento rojo producido por *P.*

cinnabarinus se forma por la oxidación del precursor ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) a ácido cinabárico (que le sirve como agente antimicrobiano), durante la formación del cuerpo fructífero, en una reacción catalizada por lacasas. Generalmente, se ha atribuido a las lacasas un papel importante en la degradación de la lignina en hongos de pudrición blanca (Hatakka, 1994; Leonowicz y col. 2001). Sin embargo, el hongo degradador más importante de la lignina, *Phanerochaete chrysosporium*, no produce una lacasa típica, sino que produce una enzima con actividad de ferroxidasa (Larrondo y col. 2003).

Otro estudio realizado en *P. ostreatus* var. *florida* fue el de Chakraborty y col. (2000) en donde evaluaron la actividad e isoenzimas presentes en diversas estructuras del cuerpo fructífero de dicho hongo (laminillas, estípites y píleo). Encontraron un mayor número de isoenzimas, pero menor actividad de lacasas en las laminillas, en contraste con el estípites y el píleo por lo que los autores sugirieron que existe una regulación de la actividad lacasa durante la fase de esporulación. Posteriormente, Ohga y Royse (2001), reportaron que la actividad lacasa y el nivel de transcritos de genes de lacasa en el hongo *L. edodes* fue máxima durante la etapa de colonización del micelio y después disminuyó rápidamente durante el desarrollo del cuerpo fructífero. Los autores sugieren que la disminución de actividad lacasa puede ser necesaria para que se lleve a cabo el desarrollo del cuerpo fructífero en *L. edodes*. Nagai y col. (2003) aislaron y purificaron a la isoenzima intracelular Lcc2, a partir de laminillas de cuerpos fructíferos de *L. edodes* a los cuatro días de preservación postcosecha, ya que se encontró una mayor actividad de lacasa en dicha estructura durante este periodo en comparación con la encontrada en el píleo y estípites. Por lo que los autores sugieren un papel de las lacasas en la pigmentación de la corteza del píleo, así como una participación compartida por la Lcc2 y tirosinasa en la síntesis de melanina en las laminillas durante la conservación posterior a la cosecha. Por otro lado, Chen y col. (2004) realizaron la clonación y caracterización de un gen para lacasa denominado *lac4* en *Volvariella volvacea*, realizaron el análisis de su transcripción y encontraron el nivel más bajo de transcritos durante la colonización, mientras que al inicio de la formación de primordios se incrementó el nivel de transcritos, hasta alcanzar el nivel más alto en la formación de la denominada cabeza de alfiler, para volver a reducirse con el desarrollo del cuerpo fructífero, lo

que sugiere que la expresión del gen puede ser importante para el desarrollo de la morfogénesis en el hongo.

También se han identificado y caracterizado algunas isoenzimas de lacasa a partir de cuerpos fructíferos frescos de *Pleurotus eryngii* (Wang y Ng 2006) y en *Pleurotus cornucopiae* (Wong y col. 2010). Sin embargo, en estos estudios no se aborda el tema de la posible función fisiológica que tienen estas enzimas en los cuerpos fructíferos. Lettera y col. (2010) identificaron una nueva isoenzima lacasa (LACC12) en el cuerpo fructífero de *P. ostreatus*. Por otro lado, Sun y col. (2011) realizaron un estudio en donde demuestran que existe una correlación entre la producción de enzimas lacasas con la duración del ciclo de desarrollo en diferentes hongos comestibles. Las cepas con ciclos de desarrollo más cortos presentaron altos niveles de actividad lacasa secretada, mientras que las cepas con largos ciclos de desarrollo presentaron niveles de lacasa bajos o indetectables. También observaron que hubo una disminución gradual de la actividad lacasa conforme el micelio va madurando. Entre los hongos que mostraron las más altas actividades se encuentran: *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *Pleurotus eryngii* var. *nebrodensis*, *P. tuber-region*, *P. eryngii* y *Coprinus comatus*.

Por último, las lacasas también han sido identificadas en ascomicetos saprofitos como *Curvularia* y *Penicillium* y hongos formadores de ectomicorrizas como *Cantharellus cibarius* y *Telephora terrestris* (Dwivedi y col. 2011), estudios en los que no se abordan cuestiones acerca de su posible función fisiológica. Actualmente, existen diversas herramientas moleculares que permiten, además de la manipulación de organismos, el estudio de la función génica y para este fin se usa el mecanismo de silenciamiento génico por RNA interferente.

1.4 Silenciamiento génico por RNA interferente (RNAi)

Dentro del campo de la genómica funcional, el silenciamiento por RNAi ha sido considerado como una poderosa herramienta para la identificación de la función de los genes en una amplia gama de organismos eucariotas, incluyendo a los hongos. A través del silenciamiento de los genes codificantes para enzimas de interés, se puede comprobar el papel que desempeñan dichas enzimas en la fisiología del hongo. Para ello, se requiere previamente del estudio y conocimiento de los genes responsables de la codificación de dichas proteínas, de acuerdo con la hipótesis de

que 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, evaluando el fenotipo obtenido (Bhadauria y col. 2009). Diversos métodos en ingeniería genética han sido utilizados para este fin, algunos de ellos son: disrupción/reemplazo del gen objetivo (knock-out), uso de RNA de interferencia (knock-down), mutagénesis insercional (transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, integración mediada por enzimas de restricción) o *Targeting induced local lesions in genomes (TILLING)*, sólo por mencionar algunos (Weld y col, 2006; Bhadauria y col. 2009).

El RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) el cual se desencadena por la presencia de RNA de doble cadena (dsRNA) homólogo a un gen endógeno. Estos RNA son procesados por una endonucleasa del tipo RNAsa III (*Dicer*), generando RNA pequeño maduro dúplex también llamado RNA pequeño interferente (siRNA), que contienen tanto la secuencia sentido, como la secuencia antisentido de la molécula bicatenaria original (Catalanotto y col. 2004). El siRNA producido tiene una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, de los que 19 de ellos se encuentran formando RNA de doble cadena y otros dos se encuentran sin aparearse en los extremos. El siRNA es incorporado en un complejo multiproteico con actividad ribonucleasa: el complejo inductor del silenciamiento por RNA (RISC) (Hammond y col. 2001). Dicho complejo contiene el gen QDE-2 que codifica a la proteína Argonauta. Normalmente, esta proteína presenta los dominios PAZ y PIWI que funcionan como sitio de unión de siRNA y como núcleo catalítico de la maquinaria de corte respectivamente (Song y col. 2004; Chang y col. 2012). La separación del siRNA en hebras individuales es esencial para la activación de RISC. Derivado de la purificación bioquímica de QDE-2 en *N. crassa* se identificó la proteína QIP, que presenta un dominio exonucleasa. Se sugiere que QIP escinde y elimina a la hebra pasajera del siRNA dúplex en una vía dependiente de QDE-2 (Maiti y col. 2007). Una vez activado el complejo RISC reconoce a los mRNA con sitios complementarios al siRNA incorporado, resultando en el silenciamiento de genes ya sea por escisión del mRNA o por represión de la traducción.

Los miRNA son moléculas endógenas de dsRNA, que surgen a partir de precursores pequeños de RNA de cadena simple (ssRNA) con una estructura de horquilla. Estas moléculas, que

también son procesadas por Dicer, tienen una longitud aproximada de 21 nucleótidos y desempeñan diversas funciones reguladoras en animales y plantas (Bartel, 2004). Se pensaba que los miRNA estaban ausentes en hongos, hasta que se realizó la identificación de ssRNA tipo miRNA denominados milRNA en *Neurospora*. Estas moléculas se producen por mecanismos similares a los de otros eucariotas, pero no son idénticos a los miRNAs convencionales. Ambas moléculas surgen a partir de precursores de RNA altamente específicos con estructuras de horquilla. Dicer procesa la mayoría de milRNAs examinados y pueden silenciar secuencias objetivo-endógenas con complementariedad imperfecta, no obstante, aún se desconoce la función que desempeñan en la célula (Lee y col. 2010).

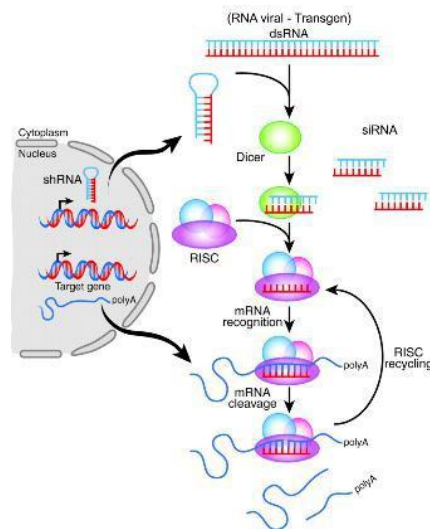


Figura 2. Silenciamiento mediado por RNAi (Dominska y Dykxhoorn 2010).

Dentro de las principales ventajas que tiene el uso del RNAi en la investigación de la genética funcional, es que puede ser aplicado para el análisis de la función de familias multigénicas (Salame y col. 2010). Por otra parte, el silenciamiento con promotores inducibles o el silenciamiento transitorio por siRNA permiten la expresión de un gen en una etapa específica durante el desarrollo del organismo o en diferentes partes del organismo. Además, se ha demostrado que el silenciamiento puede ser utilizado como alternativa para degradar específicamente los mRNA con *splicing* alternativo en células cultivadas de *Drosophila* (Bhadauria y col. 2009). Del mismo modo, el silenciamiento puede ser utilizado para el análisis de genes cuya eliminación sea letal, ya que en muchos casos sólo induce la disminución de la

expresión, pero no la inactivación por completo (Schmidt 2005). Cabe hacer hincapié en que la expresión génica no es un proceso automático una vez iniciado, sino que existen niveles de control intermedios que van desde la activación de la estructura del gen hasta procesos post-traduccionales tales como la eliminación de secuencias peptídicas por acción de proteasas, o la glicosilación en las proteínas que lo requieren para hacerlas funcionales (Jiménez y Merchant 2003). La aplicación de estas estrategias en los estudios de genética funcional requiere de un buen acervo de información respecto a los genes que se desea silenciar, por lo que no son muchos los trabajos en los que se ha utilizado. Para el caso de los genes de lacasas de *P. ostreatus* es factible debido a que existe una gran cantidad de información al respecto de los genes que las codifican.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudios moleculares de las lacasas en *Pleurotus*

Pleurotus ostreatus se ha convertido en un hongo de interés biotecnológico debido a su capacidad de producción de enzimas, entre ellas las lacasas. Incluso, se ha reportado que las lacasas producidas por este hongo presentan mayor actividad que las de otros hongos ligninolíticos (Márquez-Araque y col. 2007). Lo anterior, aunado a que se cultiva con facilidad *in vitro*, hacen de *P. ostreatus* un buen modelo de estudio. Por otra parte, las lacasas tienen muchas aplicaciones a nivel biotecnológico y medioambiental (Arora y Sharma, 2010; Viswanath y col. 2014) por lo tanto, existen muchos estudios respecto a estas enzimas. Algunas de estas investigaciones están relacionadas con el estudio en el ámbito genómico del género *Pleurotus*. El desarrollo de diversas estrategias de manipulación genética ha permitido ampliar sus aplicaciones en una gran cantidad de organismos, entre ellos, los hongos.

Entre los estudios realizados hasta el momento, se encuentran aquellos que han brindado información acerca de los genes que codifican para lacasas en esta especie, mismos que se citan a continuación: Giardina y col. (1995) clonaron y secuenciaron un gen de lacasa al que denominaron *pox1* a partir de cDNA en el genoma de *P. ostreatus* var. *florida*, desarrollado en un medio líquido usando glucosa como fuente de carbono. Giardina y col. (1996) realizaron el aislamiento de un segundo gen de lacasa denominado *pox2*, a partir de un segundo cDNA aislado

durante la obtención del primer gen en 1995, el cual mostró el 84% de similitud con respecto al primero y los correspondientes clones genómicos truncados demostraron la existencia de una familia multigénica para isoenzimas de lacasa en la misma cepa de *P. ostreatus*. Giardina y col. (1999) identificaron, clonaron y secuenciaron el gen *pox1b* de la misma cepa de *P. ostreatus* var. *florida*; la comparación de su estructura con la de los genes *pox1* y *pox2* sugiere que provienen de dos subfamilias diferentes. En 2003, Palmieri y col. identificaron el gen *poxa3* a partir de la misma cepa de *P. ostreatus* var. *florida* junto con sus correspondientes cDNA. Okamoto y col. en 2003 obtuvieron la secuencia completa del gen *lccK* a partir de DNA genómico de *P. ostreatus* cepa K16-2, la cual es una cepa de tipo silvestre que fue recolectada en la prefectura de Kanagawa, Japón. En 2008, el genoma completo de *P. ostreatus* N001 fue secuenciado por el *Join Genome Institute* (JGI, Walnut Creek, California, USA) [http://genome.jgi-psf.org/PleosPC15_1/PleosPC15_1.home.html] y contiene 34 Mpb organizados en 11 cromosomas (Ramírez y col. 2011), dicha información es de suma importancia ya que permite, entre otros muchos estudios, el análisis y rastreo de genes de interés. Pezzella y col. en 2009, identificaron y describieron tres nuevos genes de lacasa (*pox3*, *pox4* y *pox5*) derivados de *P. ostreatus* ATCC no. MYA-2306. En 2012, Castanera y col. analizaron los perfiles de expresión de 10 genes de lacasas y obtuvieron un alto porcentaje de respuestas transcripcionales alteradas en los genes de lacasa, es decir, un incremento en su expresión, durante su cultivo en presencia de extracto de paja de trigo. Los genes que presentaron un incremento más alto fueron los genes para *lacc2* (4.2 veces en promedio) y *lacc10* (3.5 veces en promedio) y hubo una fuerte inducción de la actividad enzimática lacasa, por lo cual, los autores sugieren que estas enzimas en particular son sensibles a los compuestos fenólicos y azúcares presentes en el extracto inductor y que pudieran tener un papel importante en la maquinaria degradadora de lignina en *P. ostreatus*. Finalmente, Pezzella y col. (2013) realizaron el análisis transcripcional de nueve genes de lacasa identificados y diferenciados entre sí a partir del genoma completo disponible de *P. ostreatus* N001. Dicho análisis fue realizado en la cepa de *P. ostreatus* ATCC no. MYA-2306 para intentar desentrañar el papel fisiológico que desempeñan las diferentes isoenzimas lacasas producidas en este hongo. Los resultados obtenidos mostraron un complejo cuadro de respuestas transcripcionales exhibidas por los genes de lacasa analizados. Los cebadores utilizados en este estudio fueron diseñados a partir del

genoma secuenciado en 2008 de *P. ostreatus*. Entre las lacasas producidas, la denominada como LACC10 (POXC) parece jugar un papel importante durante el crecimiento vegetativo, ya que su transcripción está regulada de manera negativa cuando el hongo inicia el proceso de fructificación. Además, la subunidad pequeña de la lacasa heterodimérica LACC2 (POXA3) parece jugar un papel fisiológico adicional durante la etapa de fructificación. Debido a estos resultados, los autores sugieren que la manipulación genética de sistemas fúngicos para el silenciamiento de lacasas o su hiper expresión *in vivo* junto con la identificación de los sustratos endógenos naturales de estas enzimas y las rutas metabólicas relacionadas, serían útiles para desentrañar aún más el enigma de la función de las enzimas lacasas.

Del mismo modo, gracias a la información generada y disponible a nivel genético acerca de las enzimas lacasas, ha sido posible estudiar su expresión heteróloga en otros microorganismos, con el fin de mejorar su producción y con vistas a su aplicación industrial. En el caso de levaduras, Madzak y col. en 2005 lograron la expresión de una lacasa proveniente de *P. cinnabarinus* en el hospedero *Yarrowia lipolytica* y la secreción de su producto activo con niveles similares de actividad en el medio de cultivo, resultado de la correcta maduración de la lacasa recombinante. Sin embargo, la respuesta obtenida al usar promotores de *P. cinnabarinus* en el hospedero fue menos eficiente que en la que usaron los promotores del hospedero. Por lo que los autores recomiendan el uso de promotores que no requieran estrictas condiciones de cultivo, ya que pueden originar recombinantes menos eficientes, con producción de enzima variable y en ocasiones ausente sobre todo en los periodos iniciales del cultivo. También se han utilizado hongos filamentosos como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sojae* y *Trichoderma reesei*, y levaduras como *Pichia pastoris* y *Pichia methalonica* (Kunamneni y col. 2008) sólo por mencionar algunos ejemplos.

En 2005, Piscitelli y col. realizaron la expresión heteróloga de las lacasas POXC y POXA1b en las levaduras *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae*; por un lado, las actividades específicas de las proteínas nativas y recombinantes de POXA1b resultaron similares, por el otro, la actividad específica de la proteína recombinante de POXC fue mucho menor que la de la proteína nativa, los autores mencionan que pudiera deberse al plegado incompleto o incorrecto de la proteína recombinante.

Alves y col. en 2004, llevaron a cabo la expresión homóloga de una lacasa activa en el basidiomiceto *P. cinnabarinus* como hospedero, quien exitosamente la pudo sobreexpresar. En este caso, en el hongo recombinante se obtuvieron altas eficiencias de producción de lacasas: de 1 a 1.2 g de lacasas por litro, representando las más altas actividades reportadas para cepas de hongos recombinantes.

Como puede observarse que existe una gran variedad de organismos que producen diversas isoenzimas de lacasa. Su expresión es regulada dependiendo de muchos factores como pueden ser: el organismo que las produce, las condiciones de desarrollo e incluso la etapa de desarrollo del organismo. No obstante, el significado fisiológico de esta multiplicidad continúa siendo poco entendido. Estos antecedentes han incrementado el interés por entender la función de las lacasas en los hongos, principalmente, como una manera de contribuir al conocimiento básico acerca de su función fisiológica, lo que podría contribuir en el ajuste de estudios que buscan incrementar la producción de las lacasas. En este sentido, diversos autores han propuesto el uso de técnicas como el silenciamiento génico para determinar su papel fisiológico (Mayer y Staples 2002, Pezzella y col. 2013).

Gracias a la información obtenida a partir de la secuenciación del genoma de *P. ostreatus* ha sido posible su estudio en relación con el mecanismo de RNA interferente. De tal modo que Salame y col. (2010) identificaron nueve genes que codifican para los miembros de la familia multigénica de las MnP (ya se habían descrito antes cuatro genes). Posteriormente, llevaron a cabo el silenciamiento por la vía del RNAi usando el vector pTMS1, que expresa una secuencia corta de dsRNA de horquilla del gen diana *mnp3* de *P. ostreatus*, con la finalidad de evaluar la capacidad de decoloración del naranja II y los niveles de abundancia de los productos de la transcripción de los genes de *mnp* en las transformantes obtenidas. Los resultados de la transformación indican que el silenciamiento de *mnp3* induce un fuerte silenciamiento de los dos genes dependientes de Mn²⁺ peroxidasa: *mnp3* y *mnp9*, y aumenta la reducción de la transcripción de *mnp4* en el tratamiento, sin afectar sustancialmente la expresión de otros miembros de la familia. Además, encontraron que el nivel de silenciamiento del gen *mnp3* está muy correlacionado con el nivel de inhibición en la capacidad de decoloración del naranja II de las transformantes. Esta es la primera prueba genética directa de una asociación entre los niveles

de expresión génica de *mnp3* y la capacidad de decoloración del tinte azo en *P. ostreatus*, lo que puede tener implicaciones importantes en la comprensión de los mecanismos que rigen la biodegradación de la lignina. Además, con este estudio queda demostrado que dicho hongo posee el mecanismo de silenciamiento por RNAi, lo que posibilita su aplicación como herramienta potencial para el estudio de la función génica en investigaciones con organismos del género *Pleurotus* (Salame y col. 2010). Cabe resaltar que todos los estudios relacionados con las cuestiones moleculares de las lacasas han hecho posible la construcción de vectores de silenciamiento específicos para lacasas, debido a que se requiere de secuencias conservadas de zonas exónicas, es decir, codificantes, para dirigir el silenciamiento. En cuanto a la generación de vectores de silenciamiento Marcial (2011) realizó la construcción del vector pGpdPki-RNAi el cual contiene el promotor *gdp* de *A. nidulans* y el promotor *pki* de *A. niger* los cuales se encuentran colocados en sentido opuesto y enfrentados, separados por un sitio de restricción *NcoI* el cual permite la inserción de la secuencia que contendrá el vector, es decir, la secuencia del dsRNA del gen que se pretende silenciar. Asimismo, el vector contiene un marcador de resistencia a fleomicina utilizado como marcador de selección en hongos.

Como antecedentes directos de la cepa de *P. ostreatus* PoB, se amplificó y clonó un fragmento de DNA de una zona codificante de 317 pb aproximadamente. Se realizó un análisis de dicha secuencia en las bases de datos BLAST y se encontró que corresponde con un 77% de similitud con el exón 10 del gen de lacasa *pox4* (número de acceso FM202670) de *P. ostreatus* ATCC no. MYA-2306. A partir de este fragmento se realizó la construcción del plásmido de silenciamiento para genes de lacasa pRNAi-LAC (Quiroz, 2014) usando el plásmido GdpPki-RNAi (Marcial, 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

La información disponible acerca de la posible función fisiológica que tienen las enzimas lacasas para *Pleurotus ostreatus* es escasa, tanto en la identificación de enzimas lacasas a partir del cuerpo fructífero del hongo como en estudios que tienen la finalidad de entender cuál es su papel en la fisiología del hongo. Por un lado, se sugiere que las enzimas lacasas están involucradas en la degradación de lignina y que por ello el hongo puede desarrollarse cuando se cultiva sobre diversos sustratos ligninocelulósicos. Esto indica una posible función de las lacasas

en la asimilación de lignina como una fuente de carbono en su hábitat natural. Sin embargo, en la mayoría de estudios realizados *in vitro* para producir lacasas se usa glucosa, la cual es una fuente de carbono de fácil asimilación, lo que no concuerda con la aseveración anterior, lo que sugiere que la participación fisiológica de las lacasas podría ser diferente. Para estudiar lo anterior puede utilizarse el silenciamiento génico por RNA interferente (RNAi) estrategia que ha mostrado ser efectiva para determinar la función biológica de una proteína dentro de cualquier organismo, siempre y cuando el organismo presente dicho mecanismo de silenciamiento. En el caso específico de *P. ostreatus* se ha comprobado que cuenta con este mecanismo, por lo que es factible realizar el silenciamiento de genes de lacasa para evaluar los fenotipos obtenidos derivados de la interferencia del RNA y de esta manera contribuir con información al respecto de la participación fisiológica de la enzima lacasa en este organismo.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis 1: Las lacasas están involucradas en el desarrollo micelial de *Pleurotus ostreatus* cuando se cultiva *in vitro* en medio sólido y en medio líquido

Predicciones:

- La producción de biomasa será menor en las transformantes respecto a la cepa testigo.
- Disminuirán en número las isoenzimas producidas en las transformantes con respecto a la cepa testigo.
- La velocidad media de crecimiento de las cepas transformantes será menor con respecto a la cepa testigo.
- Las transformantes presentarán modificaciones en la morfología colonial a nivel macro y micromorfológico.

Hipótesis 2: Las lacasas están involucradas en el aprovechamiento de lignina para usarla como fuente de carbono durante el cultivo en paja de trigo y durante su cultivo líquido *in vitro* usando lignina.

Predicciones:

- Las transformantes presentaran un desarrollo miceliar irregular en comparación con la cepa testigo durante su cultivo en paja de trigo.
- Las transformantes presentaran cuerpos fructíferos anormales en comparación con la cepa testigo.
- Las transformantes presentarán una disminución en la producción de biomasa y una menor capacidad de aprovechamiento de lignina durante su cultivo *in vitro* usando lignina como fuente de carbono en medio líquido.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

Obtener cepas transformantes de *P. ostreatus* con diferentes niveles de afectación en su actividad enzimática usando un vector de silenciamiento de genes de lacasa y evaluar el aprovechamiento de dos fuentes de carbono y los cambios que presenten en el proceso de morfogénesis.

5.2 Específicos:

1. Obtener cepas transformantes de *P. ostreatus* con un vector de silenciamiento afectadas fenotípicamente de manera severa, media y ligera respecto a la capacidad de oxidación de 2,6-dimetoxifenol (DMP).
2. Obtener los transcritos correspondientes con genes de lacasas a partir del cDNA, así como la producción y perfil de isoenzimas con actividad lacasas producidas por las transformantes en cultivo sólido sobre agar y en cultivo líquido, usando como testigo a la cepa parental.

3. Evaluar los cambios macro y micro-morfológicos, así como la velocidad media de crecimiento en las transformantes de *P. ostreatus*, cultivadas en medio sólido, usando como testigo a la cepa parental.
4. Evaluar los cambios fenotípicos presentes durante el proceso de morfogénesis de las transformantes cultivadas sobre paja de trigo, con respecto a la cepa parental.
5. Determinar el grado de afectación que muestren las cepas transformantes en cuanto al aprovechamiento de dos fuentes de carbono, una de fácil asimilación (glucosa) y otra compleja (lignina) en medio líquido, utilizando como testigo a la cepa parental y la generación de biomasa como criterio.

6. METODOLOGÍA

A continuación, en la figura 3 se muestra el diagrama de flujo de la metodología empleada para alcanzar los objetivos planteados.

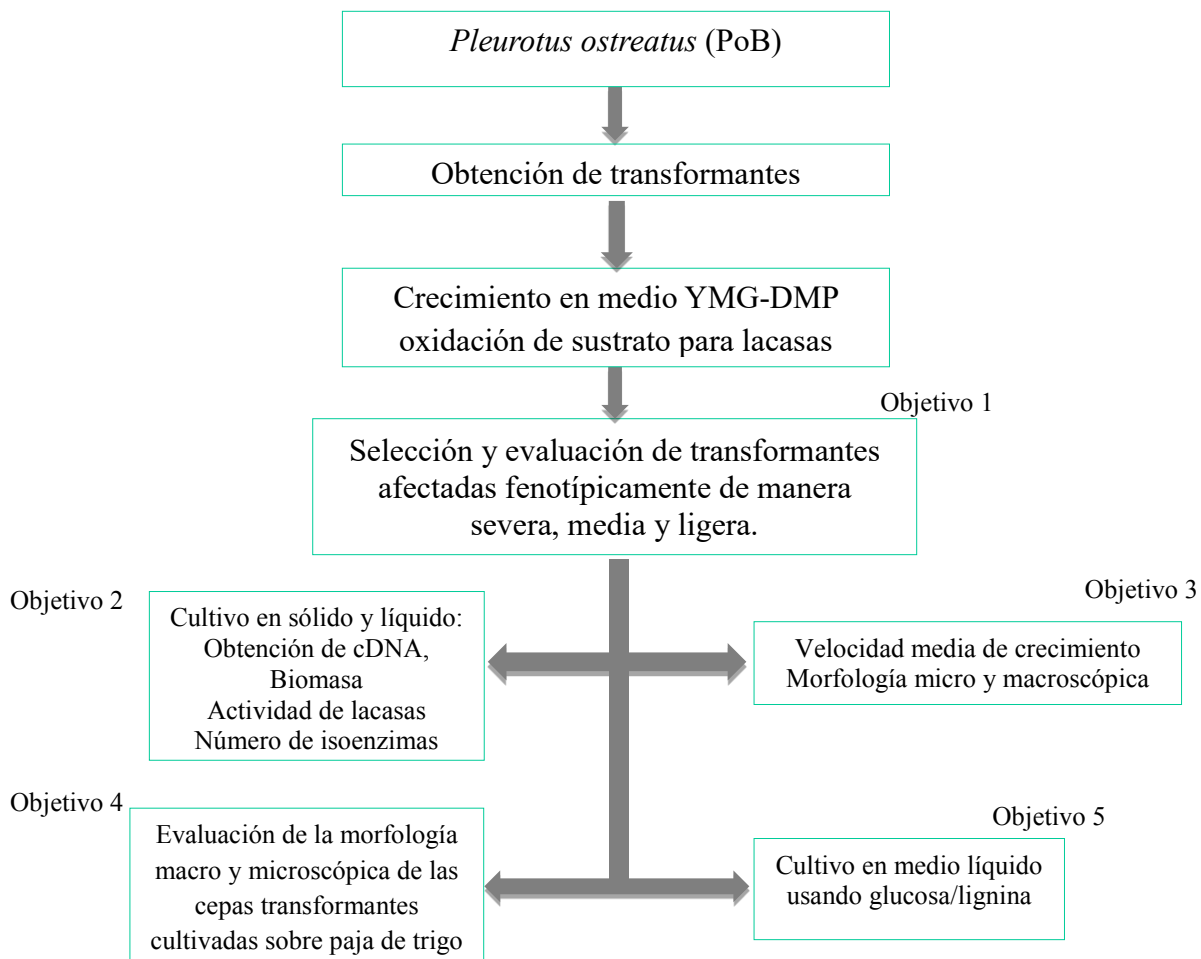


Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología a emplear.

6.1 Microorganismos utilizados

Se utilizó una cepa de la especie *P. ostreatus* denominada como PoB, perteneciente a la colección del Laboratorio Institucional de Hongos Comestibles de la Universidad Autónoma de Chapingo y donada al Laboratorio de Biología Molecular del CIGyA de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. La conservación de la cepa se realizó en agar extracto de malta a 25 °C en cajas de Petri de 90 mm de diámetro durante 10 días y posteriormente se almacenó a 4 °C.

6.2 Vectores utilizados

El vector pRNAi-LAC (figura 4) contiene el promotor del gen gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa A (*gdh*) de *Aspergillus nidulans*, el terminador del gen que codifica la citocromo oxidasa 1 (*cyc1*) de *Saccharomyces cerevisiae* y el gen de resistencia a fleomicina (*ble*), que fue usado como marcador de selección. Además, este vector posee los promotores de los genes *gpd* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y *pki* (piruvato quinasa), colocados en sentidos opuestos y enfrentados, de tal manera que la transcripción desde cada promotor genera un RNA de doble cadena complementaria a partir de un fragmento del gen insertado entre ellos. Para este propósito, el plásmido tiene dos sitios de restricción *NcoI* entre los cuales fue insertado el fragmento de DNA de 317 pb. A continuación, en la secuencia del fragmento, se observan en negritas los sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *NcoI*:

```
5'_CGGCCATGGATGTCGTGGCCCCTCAAATGCGGGGCTCGCCCCTCCCGATAG  
ACACTCATCAATGGCATAGGTCGCTACGCTGGGGGTCCTACTTCCCCTCTGGCCGT  
CATCAACGTCGAAAGCGGCAAGCGATATCGTTTCCGACTCATCTCCATGTCTTGCG  
ACCCCAATTACACGTTCTCGATCGACGGTCACACTTTGCCGGTTATTGAAGCAGAT  
GCAGTCAATATTGTGCCCTTGACGGTATGTTTCATATACTGACAACACAAACACA  
TTCTGAATCATCTTGATGTAGTGGATAGTATCCATGGCGC-3'
```

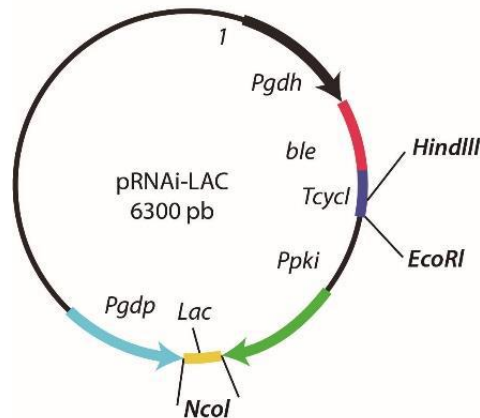


Figura 4. Vector de silenciamiento pRNAi-LAC (Quiroz 2014).

6.3 Medios de cultivo

6.3.1 Medio agar extracto de malta (EMA)

Se empleó para la propagación y conservación de micelio de *P. ostreatus*. Se utilizaron 30 mL de medio agar extracto de malta (Dibico) en cajas de Petri de 90 mm de diámetro, de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

6.3.2 Cultivo en líquido para la obtención de transformantes (YMG)

Se emplearon cinco matraces de 125 mL con 25 mL de medio YMG (Rühl y col. 2013) [(por litro: 4 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta y 4 g de glucosa (Difco)] para la propagación de aproximadamente 0.05 g de micelio, previamente homogeneizado con una batidora eléctrica (Aerolatte®). Fueron incubados a 25 °C y 120 rpm durante 60 horas. Este cultivo se realizó por triplicado.

6.3.3. Cultivo en sólido para evaluar el efecto de la transformación y seleccionar las transformantes en medio YMG-DMP

Posterior a la regeneración de las transformantes, se llevó a cabo su cultivo en medio sólido, por triplicado durante 7 días. Para ello se emplearon cajas de Petri de 60 mm de diámetro, cada una de las cuales contenía 10 mL de medio YMG, agar-agar [1.5% (p/v)] y 2,6- dimetoxifenol (DMP) [0.5 mM concentración final] como sustrato para lacasas, de tal manera que se pudiera observar el halo de oxidación del sustrato tanto por el testigo como por las transformantes.

6.3.4. Cultivo para la evaluación del silenciamiento de genes de lacasa

El cultivo se llevó a cabo en sólido y en líquido. El cultivo sólido se realizó en cajas de Petri de 90 mm de diámetro con 25 mL de YMG-agar. Para el cultivo líquido, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de YMG. Fueron incubados a 25 °C durante 7 días en la oscuridad. Ambos experimentos se llevaron a cabo por sextuplicado. Tres réplicas fueron usadas para obtener el RNA total y el resto fueron usadas para estimar la biomasa producida.

El inóculo para ambas condiciones de cultivo fue un pellet de micelio de 8 mm de diámetro tomado del borde del micelio de colonias de la cepa recientemente propagada. En ambos experimentos la producción de biomasa fue cuantificada como peso seco [usando un horno de secado a 40 °C (Luzeren®) toda la noche y posteriormente registrando el peso constante].

6.3.5. Cultivo para la estimación de la velocidad media de crecimiento

Este cultivo se realizó por triplicado en cajas de Petri de 90 mm de diámetro con 25 ml de YMG-agar. Se incubaron a 25 °C durante 7 días en la oscuridad.

6.4 Transformación de *P. ostreatus*

Posterior al cultivo líquido en YMG durante 60 horas, se realizó la digestión del micelio mediante su centrifugación y re-suspensión en 25 mL de medio YMG, adicionando sacarosa 0.6 M como estabilizador osmótico. En seguida, se adicionaron 250 mg (10 mg/mL) de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*, las cuales contienen actividades β -glucanasa, celulasa, proteasa y quitinasa (SIGMA) y se dejó incubar durante 1.5-2.0 h a 32 °C con agitación suave. Este proceso debilita la pared celular facilitando la transformación por electroporación. El micelio tratado se lavó tres veces mediante centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos y re-suspensión en agua Milli-Q, para finalmente re-suspenderlos en 100 μ L de agua Milli-Q. La suspensión se mantuvo en baño de hielo antes y después del proceso de electroporación. El experimento de electroporación se realizó en las condiciones utilizadas por Peng y col. (1993), excepto que en este estudio se usaron 2.2-2.8 kV/cm y 100-500 ohms, en cubetas de electroporación de 0.2 cm, usando un Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems (BioRad). Para obtener las transformantes 40 μ L de la suspensión miceliar (1×10^7 protoplastos) fueron mezclados 300 ng del plásmido pRNAi-LAC seguido de la electroporación. Asimismo, 40 μ L de la suspensión miceliar (1×10^7 protoplastos) fueron mezclados con 300 ng del plásmido GpdPki-RNAi sin el inserto, seguido de la electroporación para obtener el testigo de la transformación denominada como PoB2. Los protoplastos sin mezclar con el plásmido fueron electroporados y usados como testigo del efecto de la electroporación (PoB1). Los protoplastos sin electroporar fueron usados como testigo de la digestión con enzimas líticas (PoBsine). Inmediatamente después de la electroporación cada suspensión fue trasladada a un tubo

Eppendorf y se añadieron 800 μ L de sacarosa 0.6 M, como estabilizador osmótico y se incubó en hielo. Posteriormente, se realizó la regeneración del micelio transformado en medio 25 mL de medio YMG-sacarosa a 25 ° C a 120 rpm durante 7 días. Las cepas regeneradas se cultivaron individualmente en placas con medio YMG-agar-fleomicina (fleomicina 200 μ g/mL, usado como marcador de selección) y posteriormente fueron usadas para su evaluación.

Se utilizaron los diversos testigos para que nos permitieran descartar efectos propios a causa de la formación de protoplastos, la electroporación y la introducción del plásmido de silenciamiento sin el inserto del gen para lacasas en el hongo.

6.5 Selección y evaluación de las transformantes

6.5.1 Selección de las transformantes afectadas fenotípicamente en distintos niveles

Los resultados obtenidos por las distintas transformantes en cuanto a halos de oxidación del sustrato DMP, fueron comparados con respecto a los obtenidos por la cepa nativa PoB.

A partir de dicha comparación, se seleccionaron las transformantes con distinto nivel de efecto fenotípico como se describe a continuación:

1. Una transformante afectada de manera ligera, es decir, aquella en la que se observó una capacidad de oxidación del sustrato cercana a la obtenida por la cepa nativa de PoB.
2. Una transformante afectada de manera media, es decir, aquella en la que se logró ver una disminución media en la capacidad de oxidación del sustrato respecto a la obtenida por la cepa nativa de PoB.
3. Una transformante afectada de manera severa, es decir, aquella que mostró una disminución notable en su capacidad de degradación del sustrato respecto la obtenida por la cepa nativa de PoB.

El análisis genotípico se realizó con la confirmación de la integración de los constructos en el genoma de las cepas seleccionadas mediante PCR, utilizando los cebadores Pgd_p y Ppki, seguido de un análisis de sus secuencias obtenidas, para confirmar la presencia del plásmido

pRNAi-LAC. Los siguientes experimentos se llevaron a cabo usando únicamente las transformantes seleccionadas y la cepa PoB como testigo.

6.5.2 Evaluación de los genes de lacasa expresados en cultivo sólido, en cultivo líquido, en paja de trigo y en los cuerpos fructíferos obtenidos

Extracción de RNA total, transcripción reversa y PCR. Para la extracción de RNA total de los cultivos sólidos y líquidos se utilizó la biomasa obtenida al final de cada cultivo. El RNA total de los cultivos en paja de trigo se obtuvo a partir del micelio presente en la paja a los 38 días al momento de la cosecha de los cuerpos fructíferos para todas las cepas. Se realizaron cortes en los cuerpos fructíferos obtenidos de píleo, laminillas y estípites para la obtención del RNA total. Cada muestra de biomasa fue procesada utilizando el kit RNeasy Plant Mini Kit de Qiagen™, de acuerdo con el protocolo del fabricante. A continuación, se removió el DNA genómico de las preparaciones de RNA_{Total} usando DNase I Thermo Scientific™, siguiendo el protocolo del fabricante. La integridad de las muestras de RNA se verificó después de la visualización a través de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y su concentración se determinó espectrofotométricamente usando el espectrofotómetro SmartSpect Plus (BioRad). Para la RT-PCR se utilizó el RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit de Thermo Scientific™ usando 3 µg de RNA como molde. Para realizar la amplificación por PCR, se utilizaron 2 µL del cDNA obtenido y se combinaron con 48 µL de la mezcla de reacción para PCR conteniendo: 200 µM de la mezcla de dNTPs, 2 µM de MgCl₂, 0.1 U de *Taq* DNA polimerasa recombinante con KCl (Thermo Scientific), 0.4 µM de cada uno de los oligonucleótidos. Los pares de cebadores que se usaron en este estudio para evaluar la expresión de los genes de lacasa son los correspondientes a los genes *lacc1*, *lacc2*, *lacc3*, *lacc4*, *lacc6*, *lacc7*, *lacc8*, *lacc10*, *lacc12* y *actina* este último, fue usado como control endógeno (Pezzella y col. 2013). No se analizó la expresión del gene *lacc5* ya que el producto de este gen no es una lacasa sino una ferroxidasa y del gen *lacc11* no se han detectado transcritos en todas las condiciones probadas según lo reportado por Pezzella y col. (2009). Tampoco se analizó la expresión del gen *lacc9* debido su alta identidad de su secuencia con el gen *lacc10* que no permite distinguir entre sus perfiles de expresión, por lo que en este estudio únicamente se utiliza uno de ellos, el gen *lacc10* (Pezzella y col. 2009).

La PCR se realizó en un termociclador T100 Thermal Cycler de Bio-Rad® con las siguientes condiciones para los pares de cebadores de lacasa: 95 °C durante 4 min para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos a 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min, seguido de 72 °C durante 7 min. Se utilizó como control el gen de actina (gen de expresión constitutiva) para su amplificación se usaron las mismas condiciones mencionadas anteriormente, pero en lugar de usar 55 °C para la etapa de anillamiento se usaron 58 °C durante 1 min. El resultado de las amplificaciones se visualizó en geles de agarosa usando TAE 1X, teñidos en una solución de bromuro de etidio con una concentración final de 0.5 µg/mL. El DNA en los geles se visualizó en un fotodocumentador DigiDoc-it (UVP®). Los marcadores de tamaño molecular de referencia que permitieron determinar el tamaño de los amplicones resultantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder (Thermo Scientific). La intensidad normalizada de los amplicones obtenidos se obtuvo utilizando el programa ImageJ que es un programa de procesamiento de imagen digital programado en Java desarrollado en el *National Institutes of Health*. Con el programa, se obtienen datos de intensidad relativa y al dividir la intensidad relativa de cada mRNA y cada cepa entre la intensidad relativa respectiva de actina, se obtuvo el valor de la intensidad normalizada.

6.6 Evaluación del silenciamiento de genes de lacasa en cultivo sólido y líquido

6.6.1 Obtención de la biomasa y extracto enzimático (EE)

El micelio de cada muestra al final del cultivo sólido fue separado del agar con un asa de platino y colocado en tubos Eppendorf estériles para estimar la biomasa. Para la obtención de las enzimas excretadas después de retirar el micelio, se cortó el agar en cuadrados de 1 cm con un bisturí y fue transferido a matraces con 15 mL de buffer de fosfatos 0.1 M y pH 6.5, sometándose a agitación durante 15 min. Para obtener el extracto enzimático del cultivo líquido, éste fue filtrado usando una bomba de vacío (Weg) y un filtro de papel Whatman No. 1, el líquido filtrado se colocó en tubos Falcon de 15 mL. Los extractos enzimáticos resultantes se almacenaron a -20 °C hasta su uso para la obtención del número de isoenzimas y la actividad enzimática de lacasas. La biomasa obtenida de tres réplicas en ambos cultivos fue cuantificada

como peso seco (se secó en un horno a 40 °C y posteriormente se registró su peso constante) y las réplicas restantes fueron procesadas para la obtención de los transcritos.

6.6.2 Obtención del número de isoenzimas de lacasa por zimografía

Para observar el número de isoenzimas presentes en ambos cultivos, producidas por las cepas transformantes y la cepa PoB, su actividad lacasa fue detectada *in vitro*, usando 10 µg de proteína de cada EE en zimogramas basados en la técnica modificada de SDS-PAGE de Laemmli (1970). El gel de separación contenía 12 % de acrilamida y 2.7% de *bis*-acrilamida. El gel de empaquetamiento contenía 4 % de acrilamida y 2.7 % de *bis*-acrilamida. La concentración de SDS fue de 0.1% en el gel. La composición del buffer de muestra fue: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 35% glicerol, 0.01% de azul de bromofenol y 10% de SDS. Las muestras de los extractos enzimáticos se corrieron en geles de 0.75 mm de espesor en un sistema de electroforesis Mini PROTEAN Tetra cell (BioRad) a 150 voltios durante 1-2 h. Después de la corrida, los geles se lavaron con agua destilada y desionizada durante 1-1.5 h, con un cambio de agua cada 15 min para eliminar el SDS y renaturalizar las proteínas. Para terminar, los geles se incubaron durante 12-18 h, a temperatura ambiente, en 50 mL de DMP 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 M a pH 6.5.

6.6.3 Determinación de la actividad enzimática de lacasa

La actividad enzimática lacasa presente en los EE se determinó con la siguiente mezcla de reacción: 800 µL de DMP 2 mM en tampón de fosfatos 0.1 M pH 6.5 y 200 µL de EE, el producto fue medido siguiendo una cinética de reacción durante 1 min a 39 °C a 468 nm en un espectrofotómetro SmartSpec Plus Spectrophotometer (BIO-RAD). La actividad enzimática fue expresada en Unidades Internacionales (UI), donde 1 UI se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 µM de sustrato en producto por minuto, estimada utilizando la ecuación:

$$UI/L=(\Delta Abs \times V_t)/(t \times \epsilon \times \lambda \times V_m) (1000000)$$

Donde:

Δ Absorbancia = Absorbancia final - Absorbancia inicial.

t = Tiempo de reacción en minutos.

ϵ = Valor del coeficiente de extinción molar del sustrato.

λ = Espesor de la cubeta.

V_t = Volumen total de reacción en mL.

V_m = Volumen de la muestra en mL.

La cual se basa en la Ley de Lambert-Beer y considera que la reacción es de orden 0. Los datos analizados representan la media de tres mediciones.

6.6.4 Determinación de proteína total por el método de Bradford

La proteína total soluble contenida en los extractos extracelulares se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976), usando seroalbúmina bovina como proteína estándar. A 100 μL de EE se les adicionaron 200 μL del reactivo de Bradford (Bio-Rad), el volumen se ajustó a 1 mL con agua destilada y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro SmartSpec™ Plus spectrophotometer Bio-Rad a 595 nm.

6.7 Estimación de la velocidad media de crecimiento (VMC) y caracterización de la morfología macroscópica y microscópica de las transformantes

Para estimar las diferencias en el crecimiento radial de las transformantes con respecto a la cepa testigo PoB se realizaron cultivos por triplicado en medio YMG en placas de 90 mm de diámetro, tanto de las transformantes como del testigo. Cada 24 h y durante un periodo de 7 días se midió el diámetro de cada colonia de manera vertical y horizontal (diámetro más largo y más corto) para calcular un diámetro promedio, utilizando un vernier digital.

El crecimiento radial de las cepas se ajustó a una ecuación lineal. Se fijó el valor de la ordenada en el origen (b) en el diámetro del fragmento inoculado (8 mm) y donde la VMC representa la pendiente (m) de la recta.

A partir de este cultivo también se realizó la caracterización de la morfología macroscópica del micelio en cultivo sólido, se dejaron crecer todas las cepas hasta los 13 días (312 h) para poder observar mejor el crecimiento de la cepa más lenta. En ese momento se tomó un registro de: el tipo de crecimiento (regular o irregular), presencia o ausencia de anillos de crecimiento, textura

(algodonosa, venosa), color (blanquecino, blanco), micelio aéreo (regular, escaso) densidad o placa costrosa (presente, ausente) (Guadarrama-Mendoza y col. 2014).

Por otro lado, la caracterización microscópica del micelio en microcultivos se realizó observando: presencia-ausencia de fibulas y septos. Los microcultivos se prepararon de la siguiente manera:

1. Se colocó un círculo de papel filtro dentro de una caja de Petri y sobre él una varilla de vidrio doblada en forma de V, enseguida se colocó un portaobjetos sobre la varilla y se esterilizó la caja en autoclave.
2. Se cortaron círculos de medio YMG de 3 mm de grosor en una caja de Petri con la ayuda de un horador de 8 mm de diámetro interno.
3. Se colocó el círculo en el portaobjetos y se tomó con un asa de platino el inóculo del micelio del hongo que se quería observar. Se inoculó por picadura, cada uno de los lados del círculo de YMG.
4. Se colocó sobre el círculo de YMG inoculado un cubreobjetos presionando ligeramente para una mejor adherencia al medio.
5. Se adicionaron 1.2 mL de glicerol al 10% sobre el papel filtro de la caja de Petri.
6. Se incubó a 25 °C durante 96 horas o hasta que se observó el crecimiento del micelio.
7. Se desprendió con sumo cuidado el cubreobjetos y fue colocado sobre un nuevo portaobjetos, previamente adicionado con una gota de azul algodón mezclado con alcohol polivinilo lactofenol (PVL) en una proporción de 2:1.
8. También se desprendió el círculo de medio YMG del portaobjetos sobrante. Se agregó el mismo colorante en el micelio y se colocó un cubreobjetos.
9. Para permitir la penetración del colorante en el micelio y el secado del PVL para su fijación se dejó en reposo 24 h. A continuación, se sellaron ambas preparaciones con

barniz transparente. La morfología de las hifas se observó con un microscopio de campo claro marca Zeiss modelo Axioscop “2” con contraste interferencial de Nomarski, conectado a un sistema de digitalización de imágenes compuesto por una cámara digital Infinity 1, controlada por una computadora a través del software Image Pro-plus versión 4.5. Las preparaciones del micelio se observaron con aumentos de 20X y 40X, capturando las imágenes en fotografías con una resolución de 1024 X 768 pixeles.

6.9 Cultivo de las transformantes seleccionadas y de la cepa PoB sobre paja de trigo

6.9.1 Preparación y siembra del inóculo en granos de trigo

Se utilizaron semillas de trigo lavadas e hidratadas por inmersión en agua de 8 a 12 h. Después, se dejaron escurrir hasta que al tocar con la mano ésta no quedara húmeda (70-80% de humedad). Se colocaron 300 g de semilla húmeda en bolsas de polipapel de 18 × 25 cm y se esterilizaron en autoclave a 15 psi, durante 20 min y una temperatura de 121 °C. Posteriormente, las bolsas se dejaron enfriar a 25 °C aprox., en un área estéril y se inocularon con tres fragmentos de micelio de 0.5 cm² (se dejó un poco de aire en la bolsa y se hizo un nudo en la parte superior para cerrar). Se incubaron a 25 °C hasta que colonizaran la mayor parte de las semillas. Al micelio desarrollado sobre las semillas se le denominó inóculo primario y fue utilizado como inóculo para sembrar en paja de trigo.

6.9.2 Preparación y siembra del inóculo primario en paja de trigo

Se utilizó paja de trigo como sustrato, cortada en trozos de entre 2-5 cm de longitud aproximadamente. La paja se puso en remojo durante 18 h y se dejó escurrir hasta obtener un 70-80 % de humedad. Después, se pesaron 30 g de paja húmeda y se colocaron en cristalizadores de 9 cm de diámetro × 5 cm de altura. Los cristalizadores se esterilizaron en autoclave a 15 psi, durante 20 min y una temperatura de 121 °C y posteriormente se dejaron enfriar a 25 °C aprox., en un área estéril para inocularse con 35 semillas invadidas de micelio provenientes del inóculo primario. Los cultivos fueron incubados a 25 °C y se llevaron a cabo por quintuplicado.

Se realizaron dos experimentos para la obtención de los cuerpos fructíferos, uno de ellos se llevó a cabo en cristalizadores para las observaciones al microscopio óptico y para el registro de las

observaciones de crecimiento y otro se llevó a cabo en las mismas condiciones para la observación por microscopia electrónica de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscope*).

Las muestras de paja de trigo, micelio y cuerpos fructíferos fueron observadas en el microscopio electrónico modelo JEOL-JSM 5600 LV, en el Laboratorio de Microscopia Electrónica del Instituto de Ecología AC - Xalapa.

Para analizar muestras en el microscopio electrónico de barrido se requieren dos condiciones: que se encuentren libres de humedad y que sean conductoras. En este caso, las muestras fueron liofilizadas a bajo vacío dentro del microscopio electrónico de barrido y posteriormente fueron preparadas con el sistema Denton Vacuum DESK V® donde fueron sometidas a metalización mediante un revestimiento conductor compuesto de oro/paladio.

6.9.3 Condiciones de incubación y producción en cristalizadores

La incubación se llevó a cabo a 25 °C en oscuridad. Se hicieron revisiones a partir de los 8 días, para evitar la manipulación y permitir la colonización del micelio sobre la paja. Para cubrir todo el sustrato, el micelio requirió de 2 a 3 semanas. Posterior a este periodo de incubación, se inició la fase de fructificación. Para ello los cristalizadores fueron expuestos al ciclo natural de luz y oscuridad (aproximadamente 12 h luz/12 h oscuridad) y temperatura ambiental, se cambió la tapa de aluminio por plástico tipo Egapack® y se hicieron orificios con un bisturí con el fin de permitir la oxigenación, asimismo, fueron atomizados con agua destilada estéril (80-90% humedad relativa) para promover la formación del cuerpo fructífero del hongo.

6.10 Morfología macro y microscópica de las transformantes y de la cepa nativa, cultivadas sobre paja de trigo

Se llevó a cabo el registro del tiempo de invasión del sustrato, tiempo de aparición de primordios, tamaño de los cuerpos fructíferos, color y diámetro del píleo. Los hongos se cosecharon en su estado adulto cuando el píleo estaba totalmente extendido, se pesaron en fresco y se tomaron un par de fragmentos para obtener las esporas y realizar su observación al microscopio óptico. Se registró el diámetro de las hifas, presencia/ausencia de fíbulas, basidios y tamaño de las esporas. La morfología de las esporas se observó con un microscopio de campo

claro marca Zeiss modelo Axioscop “2” con contraste interferencial de Nomarski, conectado a un sistema de digitalización de imágenes compuesto por una cámara digital Infinity 1, controlada por una computadora a través del software Image Pro-plus versión 4.5. Las preparaciones de las esporas se observaron con un aumento de 100X, capturando las imágenes en fotografías con una resolución de 1024 X 768 pixeles.

6.11 Cultivo de las transformantes y de la cepa nativa de PoB usando glucosa y lignina como fuentes de carbono

6.11.1 Cuantificación de biomasa y consumo de glucosa y lignina

En esta fase se determinó que 0.01 % (p/v) es el porcentaje máximo soluble de lignina en agua. Asimismo, se determinó en pruebas piloto que las cepas son capaces de desarrollarse en agar-agar, por lo que el tipo de cultivo para la evaluación del aprovechamiento de las diferentes fuentes de carbono se realizó en líquido, usando un medio mínimo en nutrientes. Lo anterior, con la finalidad de evitar que el hongo aprovechara otras fuentes de carbono que no fueran las que nos interesara evaluar. Se usó el medio Czapek en el cultivo líquido tanto para la cepa parental como para las transformantes seleccionadas, en un experimento por triplicado. Para ello se emplearon matraces de 125 mL con 25 mL de medio Czapek, en cuya composición se sustituyó, dependiendo del caso, la lignina o glucosa como fuente de carbono. Se incubaron a 25 °C durante 20 días a 125 rpm.

Tabla 1. Composición del medio Czapek (modificada).

Compuesto	g/L
Glucosa/lignina	2.5/0.1
Nitrato de sodio	2
Fosfato dipotásico	1
Sulfato de magnesio	0.5
Cloruro de potasio	0.5
Sulfato ferroso	0.01

La biomasa de ambos cultivos se determinó por peso seco y para la cuantificación de glucosa y lignina se realizaron las correspondientes curvas de calibración. La estimación del consumo de glucosa se realizó mediante la cuantificación de azúcares reductores totales utilizando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). El análisis se efectuó en tubos de vidrio de 10 mL a los cuales se agregaron 500 μ L de la muestra, previamente diluida a razón de 1:10 y 500 μ L del reactivo DNS. Los tubos fueron colocados en baño de agua a 95 °C durante 5 minutos. En seguida, se dejaron enfriar hasta llegar a temperatura ambiente. Una vez fríos, se añadieron 5 mL de agua destilada estéril, se agitaron en vórtex y se leyeron las absorbancias a 540 nm por triplicado.

La concentración de lignina se determinó de manera indirecta a partir de los extractos del cultivo líquido, se midió como contenido de fenoles por absorción UV a 220 nm. La mezcla de reacción contenía 100 μ L de muestra, previamente filtrada a través de un papel filtro de membrana de 0.45 μ m y 2 mL de buffer de fosfato a pH 6.0 (Rubilar y col. 2009).

6.12. Análisis estadístico

Los parámetros estimados durante la evaluación del efecto de la transformación para biomasa, actividad enzimática específica y velocidad media de crecimiento fueron analizados empleando un ANDEVA de un factor ($\alpha= 0.05$) y las diferencias entre las transformantes y la cepa PoB fueron valoradas mediante la prueba pos-hoc Dunnett ($P \leq 0.05$). Para este análisis fue usado el complemento de excel XLSTAT.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Transformación, evaluación del efecto de la transformación y selección de las transformantes afectadas en diferentes niveles

Del experimento de transformación se regeneraron 27 transformantes en YMG.

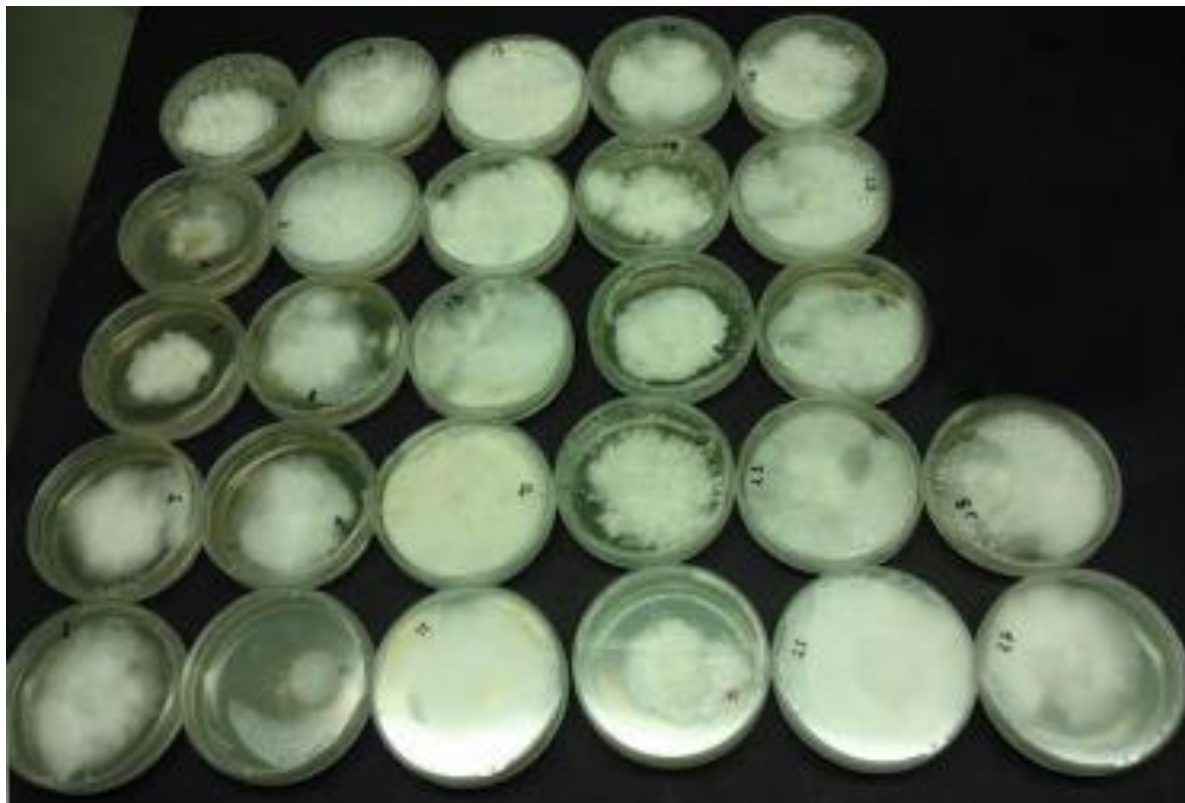


Figura 5. Transformantes regeneradas en placa.

Una vez que se regeneraron las transformantes, se procedió a evaluar el fenotipo obtenido, es decir, la capacidad de oxidación del DMP en medio YMG-agar-DMP. Esto permitió seleccionar a las transformantes afectadas fenotípicamente de manera severa, media y ligera con respecto a su capacidad de oxidación de DMP.

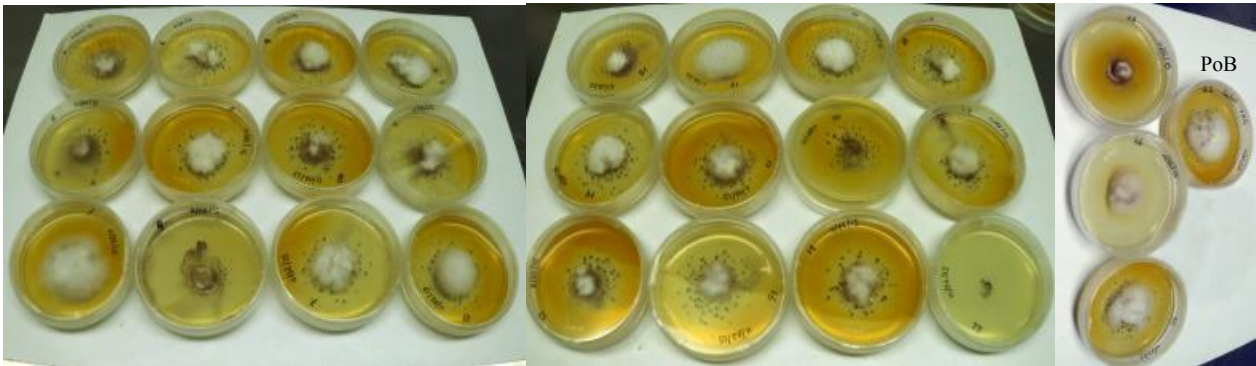


Figura 6. Evaluación del efecto de la transformación sobre la capacidad de oxidación de DMP.

En la figura 6, se puede observar a la mayoría de las transformantes con un halo de oxidación similar al testigo PoB, entre ellas, T7 (elegida al azar) fue considerada como una transformante con afectación fenotípica ligera. Se seleccionó a T21 como transformante con afectación fenotípica media, porque mostró un halo de oxidación menor con respecto a la cepa parental PoB y a la transformante T7. Se obtuvieron dos cepas con nivel de afectación severa: T27 la única transformante que produjo un halo de oxidación tenue y T26 la transformante que presentó un halo de oxidación casi nulo.

Posterior a la selección de las transformantes se llevó a cabo un cultivo por triplicado para el seguimiento de su desarrollo y se muestra en la figura 7 para una mejor apreciación de las cepas seleccionadas. En las imágenes se muestran fotografías en diferentes tiempos de desarrollo de las cepas que fueron seleccionadas y asimismo se muestran los resultados obtenidos por los testigos: PoB = cepa parental de PoB, PoBsine = protoplastos de PoB sin electroporar, PoB1 = protoplastos de PoB electroporados, PoB2 = protoplastos de PoB electroporados con el plásmido de silenciamiento sin el inserto.

En la figura 7 se observan los halos producidos para cada cepa en tres diferentes tiempos. Por un lado, la transformante T7 tiene un halo de oxidación más parecido al halo desarrollado por los testigos a las 48 h. Por otro lado, las transformantes T26 y T27 tienen un halo de oxidación apenas perceptible; al observarse las placas más de cerca se puede visualizar que existe una ligera coloración que va a la par con el crecimiento del micelio, también a las 48 h. Mientras que a las 48 h la transformante T21 muestra un halo de oxidación ligeramente más tenue respecto a los testigos, pero más intenso que el de las transformantes T26 y T27 (figura 7a).

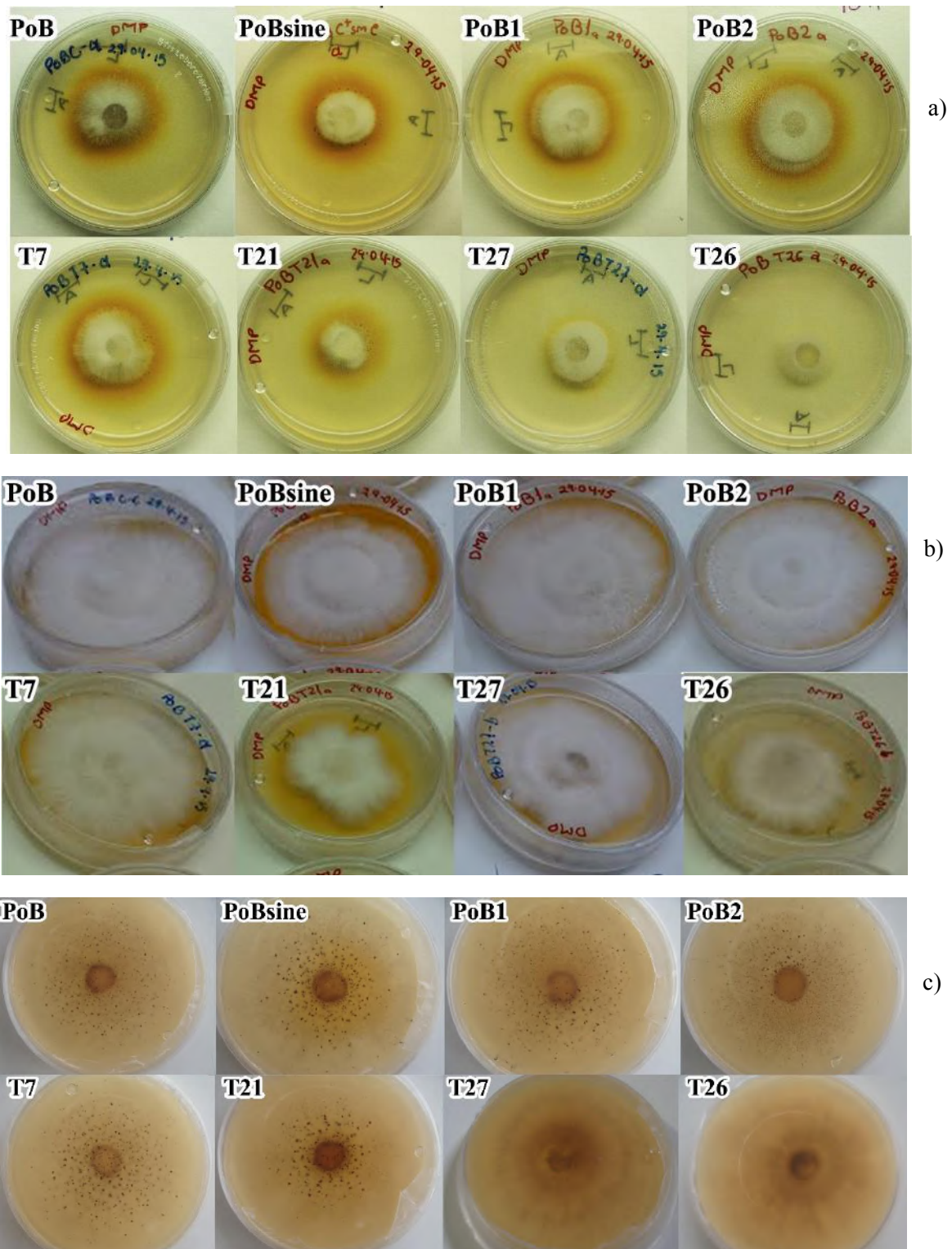


Figura 7. Cultivo en placa usando YMG-DMP. a) a las 48 h, b) a las 168 h y c) a las 192 h (vistas desde la parte inferior).

A las 120 h (figura 7b), la transformante T7 presenta un halo de oxidación más intenso que T21 la cual sigue mostrando un halo de oxidación tenue, T27 también presenta un ligero halo de oxidación, mientras que T26 presenta, aunque muy tenue, halo de oxidación. En la figura 7c, se muestra la parte inferior de las placas, en los testigos y en las transformantes T21 y T7 se observa la presencia de precipitados de color café resultado de la oxidación del DMP. En cambio, en T26 y T27 no se observan dichos precipitados: si hay oxidación, pero no se logra precipitar el sustrato. Los testigos de la transformación se muestran similares entre sí, respecto a la capacidad de oxidación del DMP, lo que indica que no hubo efecto debido al tratamiento de obtención de protoplastos, electroporación o a efectos propios de la inserción del plásmido, sino que los efectos que se observan en las transformantes son resultado de la introducción del plásmido con el inserto, es decir, de la introducción del plásmido pRNAi-LAC.

7.2 Evaluación del silenciamiento en medio sólido y líquido

7.2.1 Evaluación de los genes de lacasa expresados

Para el análisis de la expresión de lacasas, se obtuvieron los productos de RT-PCR con los cebadores para genes de lacasas mencionados anteriormente. Los tamaños aproximados para los amplicones son de aproximadamente entre 50-100 pb. A la derecha en la figura 8 se observan los amplicones obtenidos para las cinco cepas y los nueve cebadores, así como los amplicones obtenidos para actina de cada cepa, a la izquierda se muestran los datos de intensidad normalizada correspondientes, en los cultivos sólidos (a) y líquidos (b).

El mRNA de PoB tuvo una mayor intensidad de expresión para los genes *lacc1*, *lacc2*, *lacc4*, *lacc8*, *lacc10* y *lacc12* en cultivo sólido (figura 8, inciso a). Las transformantes expresaron el mRNA para los nueve pares de cebadores probados en el cultivo sólido, aunque la intensidad de mRNA del gen *lacc7* fue muy baja en todas las cepas, a excepción de la intensidad mostrada para T27. La expresión del mRNA para los genes *lacc1*, *lacc3*, *lacc4* y *lacc6*, con respecto al testigo PoB, no presenta un patrón que sugiera disminución de acuerdo con el nivel de afectación de los transformantes. Exceptuando T27, la expresión de mRNA para el gen *lacc10* disminuyó de una manera importante conforme al grado de afectación de los transformantes.

Mientras tanto, en cultivo líquido (figura 8, inciso b), se expresó en PoB el mRNA para casi todos los genes de lacasa a excepción del gen *lacc7*, cuya intensidad es casi nula. Se observó la expresión de mRNA para *lacc2*, *lacc8*, *lacc10* y *lacc12* en el cultivo líquido para todas las cepas, pero en los casos de *lacc4* y *lacc6*, se observó una disminución importante en su expresión en las transformantes T21 y T26.

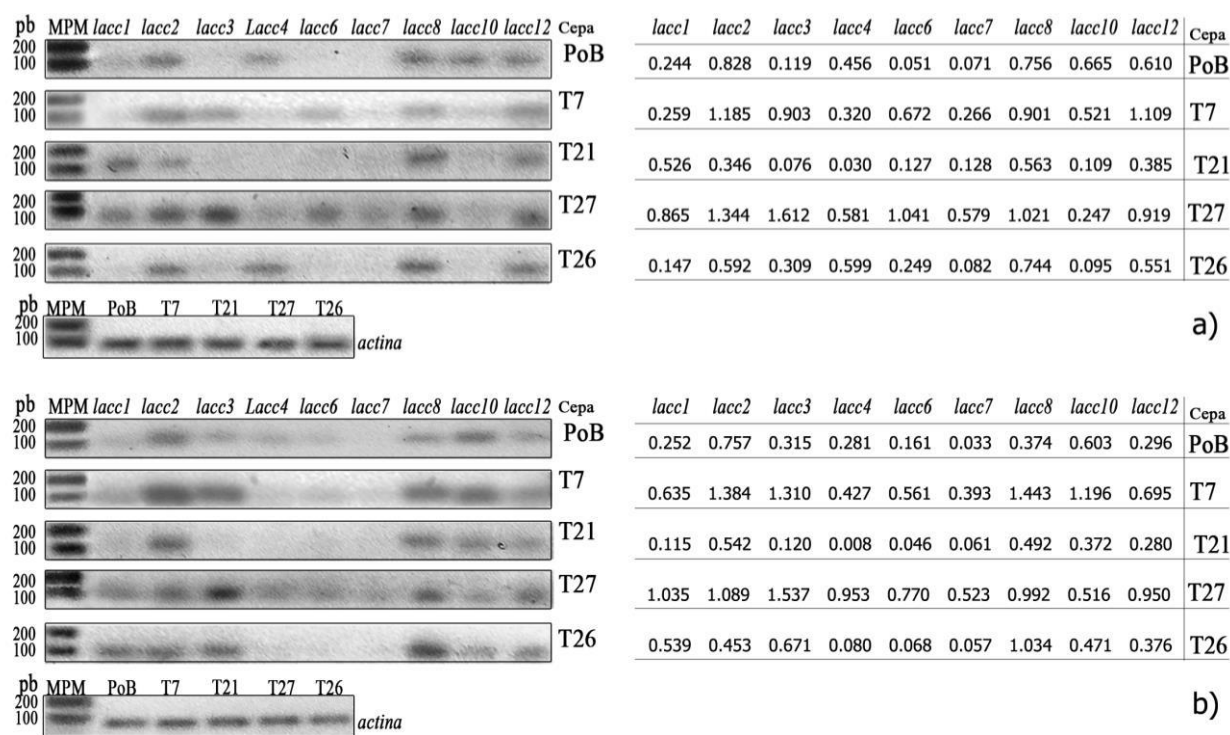


Figura 8. A la derecha: mRNA de genes para lacasas. A la izquierda: datos de intensidad normalizados. a) cultivos sólidos y b) cultivos líquidos

Se observó que, tanto en cultivos sólidos como líquidos, PoB y las transformantes expresan mRNA para *lacc10*, aunque T21, T26 y T27 presentan una disminución en intensidad, especialmente en cultivo sólido. La expresión de mRNA para los genes *lacc2*, *lacc8* y *lacc12* tiene las intensidades más altas para el testigo PoB y los transformantes en ambos cultivos, además, T27 expresó los nueve mRNA para lacasa, aunque algunos menos intensos que otros. Este ha sido un comportamiento inesperado, es probable que T27 esté utilizando un mecanismo de compensación inducido por el silenciamiento. En este sentido, Kafri y col (2005) han sugerido que existe un mecanismo de reprogramación que es llevado a cabo por genes parálogos,

que se considera que tienen una función de respaldo. Se ha reportado que los genes de lacasa pertenecen a una familia multigénica, es decir, que cuentan con genes homólogos que podrían realizar funciones similares (Pezzella y col. 2009). Esta podría ser la razón de la respuesta observada en cuanto a producción de mRNA de los genes de lacasa para T27 en ambas condiciones, aunque no todos los mRNAs producidos son funcionales, ya que la cepa T27 mostró un cambio fenotípico grave en cuanto a su capacidad de producción de lacasa.

7.2.2 Biomasa producida

En la figura 9, se observa la biomasa producida por el testigo y las transformantes en los cultivos sólidos y líquidos. Los resultados del ANDEVA realizado para ambos cultivos señalan que existen diferencias significativas entre las cepas con respecto a la biomasa obtenida (con una $F_{4, 10} = 79.6941$, $P < 0.0001$ para el cultivo sólido y con una $F_{4, 10} = 26.8504$, $P < 0.0001$ para el cultivo líquido), por lo que se realizó la prueba de Dunnett para analizar dichas diferencias entre el testigo PoB y las transformantes.

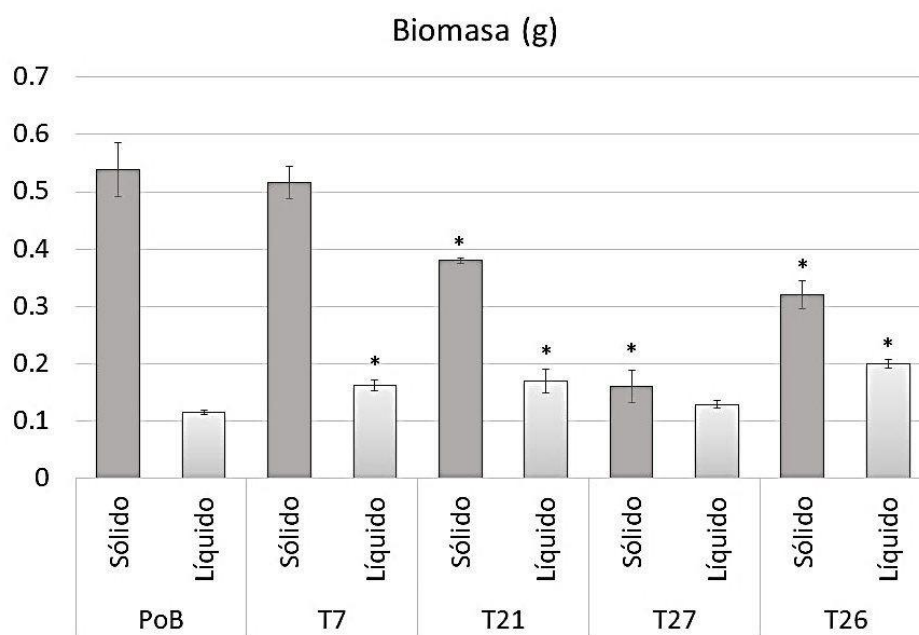


Figura 9. Biomasa (g) producida en cultivo sólido y líquido en medio YMG. Las barras representan el error estándar de tres experimentos independientes. Las transformantes con diferencias estadísticas significativas respecto al testigo PoB (Dunnett, $P < 0.05$) están marcadas con un (*)

Para el cultivo sólido, no hay diferencias significativas entre la biomasa de la transformante T7 respecto al testigo PoB, mientras que las transformantes T21, T26 y T27 muestran diferencias significativas vs el testigo PoB, es decir, hubo un efecto en cuanto a la producción de biomasa en las transformantes con afectación media y severa. Estos resultados de biomasa obtenidos por las transformantes T21, T27 y T26 podrían estar relacionados con los datos obtenidos de intensidad para el gen *lacc10* y su papel en el crecimiento vegetativo en medios sólidos (Pezzella y col. 2013).

Para el cultivo líquido, no se encontraron diferencias significativas entre la biomasa de la transformante T27 respecto al testigo PoB, mientras que las transformantes T21, T26 y T7 muestran diferencias significativas vs el testigo PoB.

7.2.3 Efecto sobre la actividad de lacasas

La actividad específica mostrada en la figura 10, se obtuvo a partir de la relación de actividad volumétrica y proteína total, las cuales se cuantificaron mediante la metodología descrita anteriormente. Se realizó un análisis de varianza de las actividades específicas de lacasas obtenidas en ambos cultivos, el cual señaló que existen diferencias significativas entre las cepas con respecto a la actividad específica obtenida (con una $F_{4, 10} = 70.9465$, $P < 0.0001$ para el cultivo sólido y con una $F_{4, 10} = 241.3444$, $P < 0.0001$ para el cultivo líquido).

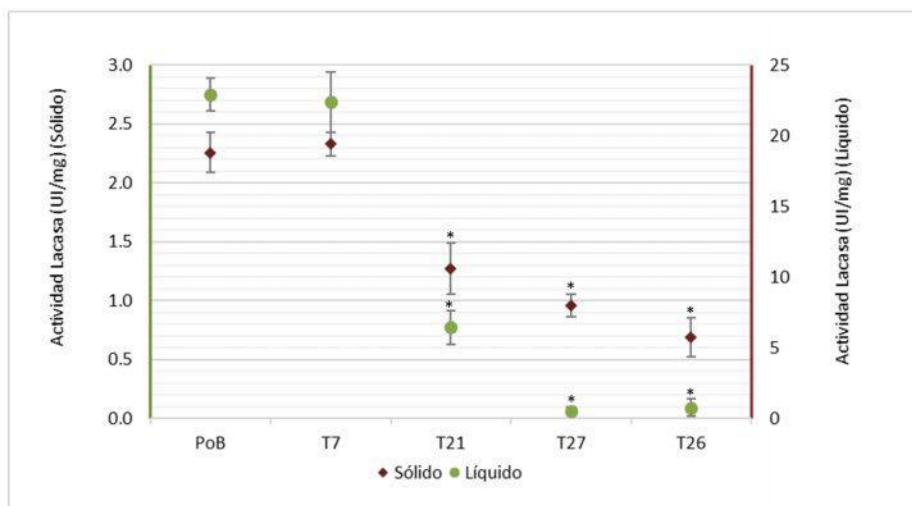


Figura 10. Actividad específica de lacasas. Las barras representan el error estándar de tres experimentos independientes. Las transformantes con diferencias estadísticas significativas respecto al testigo PoB (Dunnett, $P < 0.0001$) están marcadas con un (*).

Se analizaron las diferencias entre el testigo PoB y las transformantes mediante la prueba de Dunnett. Tanto para el cultivo sólido, como el líquido, no existen diferencias significativas entre la actividad específica de la transformante T7 respecto al testigo PoB, mientras que las transformantes T21, T26 y T27 muestran diferencias significativas vs el testigo PoB en ambos cultivos. Estos resultados concuerdan con la disminución en la biomasa en los cultivos sólidos para las transformantes T21, T27 y T26.

Por otro lado, se observó en la figura 10 en el caso del cultivo líquido que la biomasa producida por los transformantes T21 y T26 fue mayor que la producida por PoB, aunque en la figura 10 se observa que su actividad enzimática es menor. Esto concuerda con lo reportado por Castanera y col. (2012) quienes mediante un análisis transcripcional de genes de lacasa reportan que no existe una relación proporcional entre la cantidad de actividad lacasa y la producción de biomasa en *P. ostreatus* en cultivos líquidos.

Además, hubo un mayor nivel de producción de actividad de lacasa en cultivos líquidos frente a cultivos sólidos. Se ha informado de que en cultivos sólidos existe una regulación a la baja de la expresión de los genes de lacasas, pero se desconocen los elementos responsables de estas respuestas (Castanera y col. 2012).

7.2.4 Isoenzimas producidas

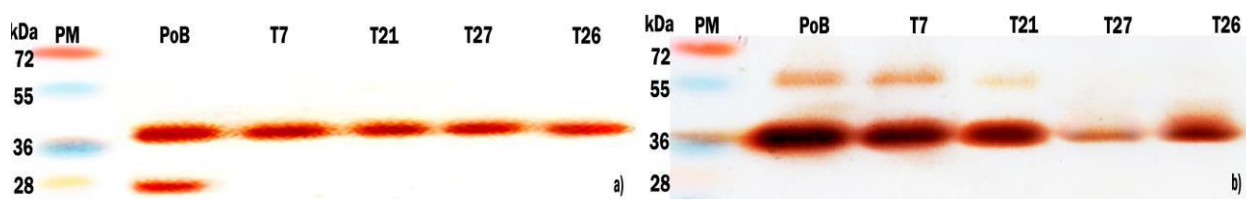


Figura 11. Isoenzimas obtenidas a las 168 h en ambos cultivos usando YMG: a) en sólido y b) en líquido.

Para el cultivo sólido, figura 11 (inciso a), se puede observar que tanto las transformantes como el testigo producen una isoenzima situada a la altura del marcador de 37 kDa aproximadamente. Asimismo, el testigo presenta otra isoenzima ubicada a la altura del marcador de 25 kDa aproximadamente. Para el cultivo líquido (figura 11, inciso b), se observa que tanto el testigo como las transformantes presentan una isoenzima posicionada a la altura del marcador de 36 kDa aproximadamente y que además el testigo y las transformantes T7 y T21 presentan una isoenzima a la altura del marcador de 55 kDa aproximadamente.

Se observó una disminución en la intensidad de la isoenzima constante en ambos sistemas de cultivo. La segunda isoenzima presente en el cultivo sólido de PoB desapareció en todos los transformantes, mientras que la isoenzima más grande observada en el cultivo líquido de PoB se atenuó en los transformantes T7 y T21 y desapareció en los transformantes T27 y T26.

Estos resultados se pueden correlacionar con la disminución de la intensidad en la transcripción del gen *lacc10*, observada en los transformantes con afectación fenotípica media y grave. Se ha sugerido que la alta respuesta transcripcional del gen *lacc10* es muy importante para la inducción de la actividad enzimática extracelular (Pezzella y col. 2013). Además, también podría haber una relación entre la isoenzima ubicada aproximadamente a 25 kDa y este gen; sin embargo, para confirmar esto, se deberían obtener más datos sobre la isoenzima producida, con la purificación de esa proteína y obteniendo su secuencia de aminoácidos.

7.3 Estimación de la velocidad media de crecimiento (VMC) y caracterización de la morfología macroscópica y microscópica de las transformantes

Se realizó un análisis de varianza de las medias de las VMC obtenidas. Los resultados señalan que existen diferencias significativas entre los promedios de VMC de las cepas ($F_{4, 10} = 97.7251$, $P < 0.0001$). Se realizó la prueba de Dunnett, tomando como referencia la cepa testigo PoB. Los resultados de la figura 12 muestran que existen diferencias significativas entre PoB vs T27 y T26.

La disminución en la expresión del gen *lacc10* en los cultivos sólidos pudiera estar relacionada con los resultados obtenidos en la VMC. En este sentido, Pezzella y col. (2013) informaron que la lacasa producida a partir de *lacc10* parece jugar un papel importante en el crecimiento vegetativo al notar la disminución de su transcripción durante la etapa de fructificación del hongo. Esta podría ser la razón por la que los transformantes presentaron problemas de desarrollo durante el crecimiento vegetativo de *P. ostreatus*, ya que los transformantes más fuertemente afectados mostraron una VMC más lenta en comparación con PoB. Se ha sugerido que, en basidiomicetos, como *A. bisporus*, las lacasas que fueron silenciadas, como el producto del gen *lacc10*, participan en el desarrollo del micelio (Wood 1980). Sin embargo, es necesario realizar otro tipo de análisis para responder a estas preguntas.

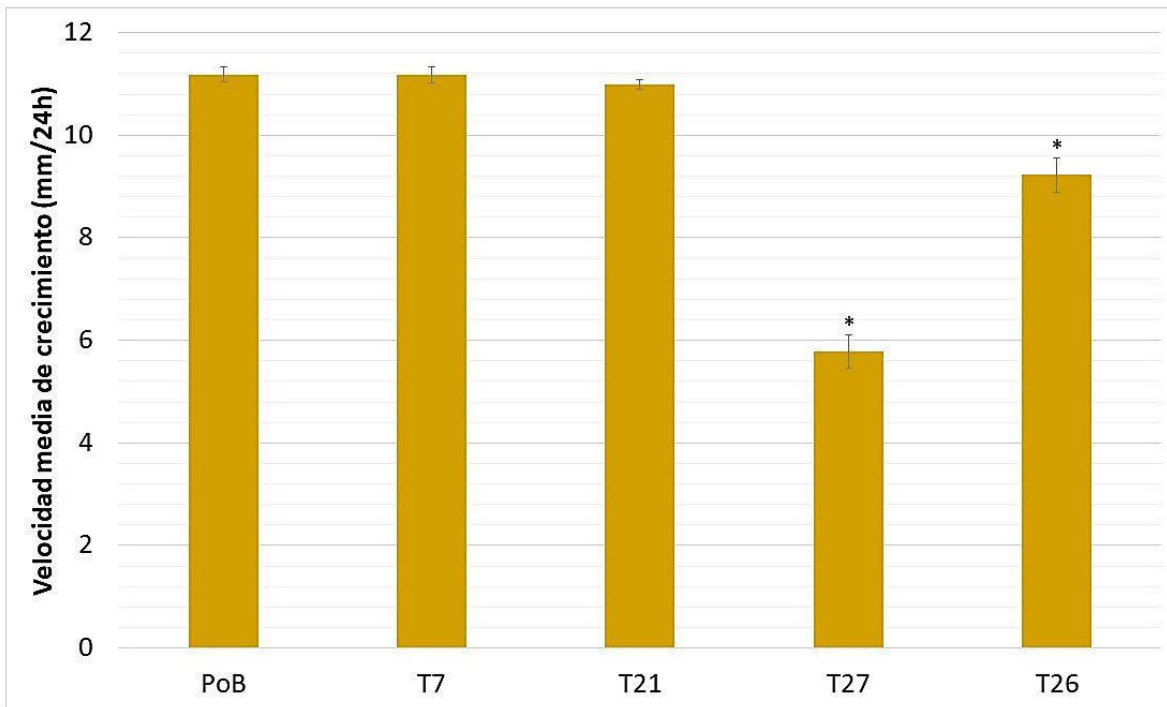


Figura 12. Velocidad media de crecimiento (mm/24h). Las barras representan el error estándar de tres experimentos independientes. Las transformantes con diferencias estadísticas significativas respecto al testigo PoB (Dunnett, $P < 0.05$) están marcadas con un (*).

A partir del mismo cultivo se realizó la caracterización de la morfología macroscópica del micelio en cultivo sólido. En la figura 13 se observan las placas de todas las cepas a los 13 días de desarrollo (312h) en la cual se observaron los siguientes parámetros: tipo de crecimiento (regular o irregular), micelio aéreo (regular o escaso), presencia o ausencia de anillos de crecimiento, textura, color y densidad trasluz (Guadarrama-Mendoza y col. 2014) dichos parámetros se registraron en la tabla 2.

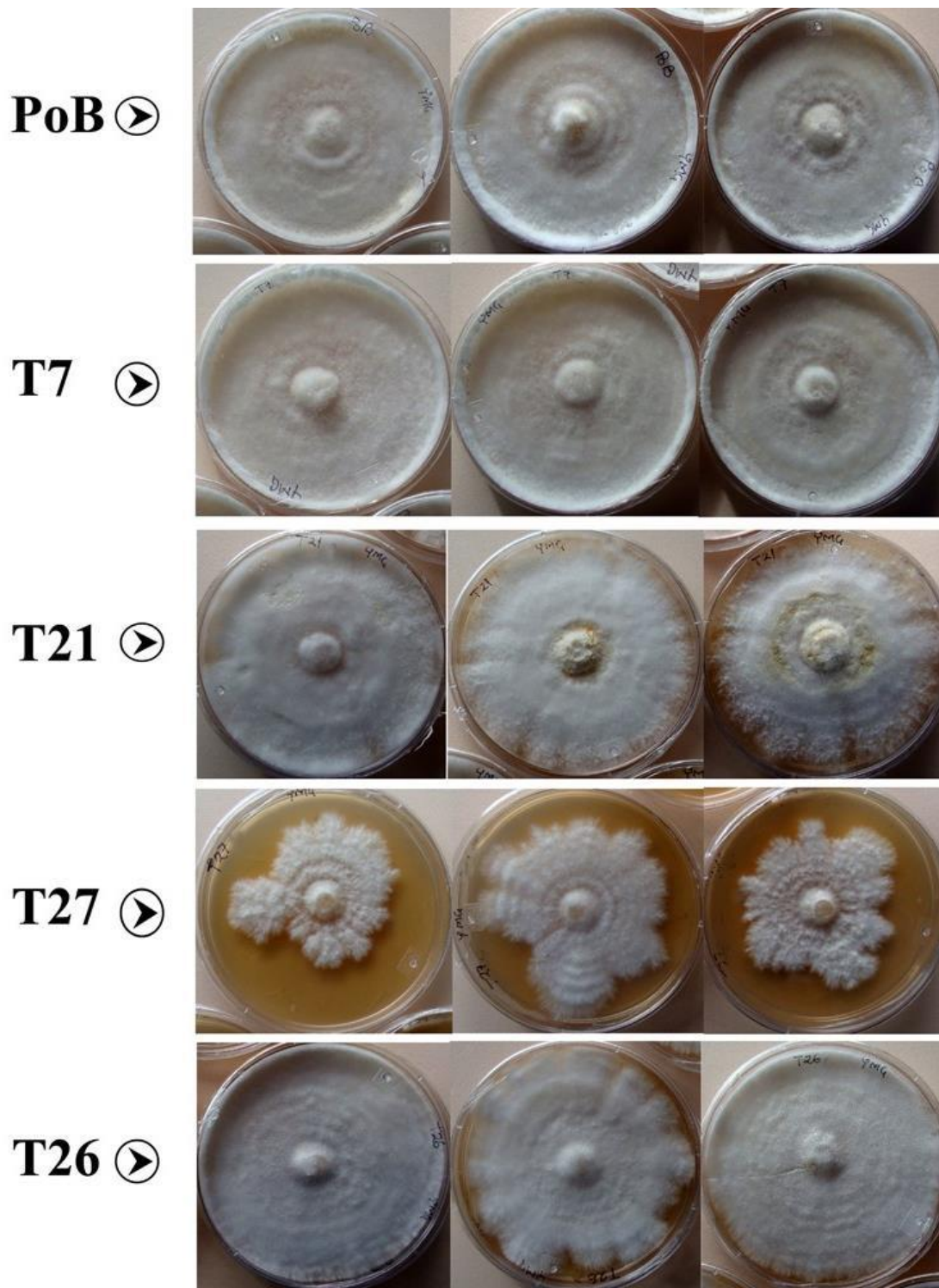


Figura 13. Cultivo en placa de todas las cepas a las 312h, usando como medio de cultivo YMG.

Tabla 2. Morfología macroscópica del testigo y las transformantes.

Morfología	Variantes	PoB	T7	T21	T27	T26
Tipo de crecimiento	Regular	x	x			
	Irregular			x	x	x
Micelio aéreo	Regular	x	x			
	Escaso			x	x	x
Anillos de crecimiento	Presentes	x	x	x	x	x
Textura	Algodonosa	x	x	x	x	x
Color	Blanquecino	x	x	x	x	x
Densidad trasluz	Placa costrosa presente	x	x	x	x	x

Se pudo observar que el crecimiento de las transformantes con afectación fenotípica media y severa es irregular y su micelio aéreo es escaso. Esto sugiere que dichas transformantes sufrieron una afectación a nivel morfológico. Por lo anterior, se procedió a la preparación de microcultivos, para la observación del micelio de todas las cepas al microscopio óptico e intentar buscar algún tipo de modificación entre el micelio del testigo y de las transformantes.

En la figura 14 se observan los resultados obtenidos, de manera general, no se observaron cambios en la morfología, ramificación o arquitectura del micelio de las transformantes en comparación con el testigo. Se observó la presencia de fíbulas y septos, pero no se observan cambios evidentes en la organización de las hifas. El ancho y largo de las hifas no se pudo comparar pues es variable aún dentro del mismo micelio en todas las cepas. Por lo que esta estrategia de observación no nos permitió ver cambios a nivel microscópico del micelio en las cepas, aunque aparentemente los hay.

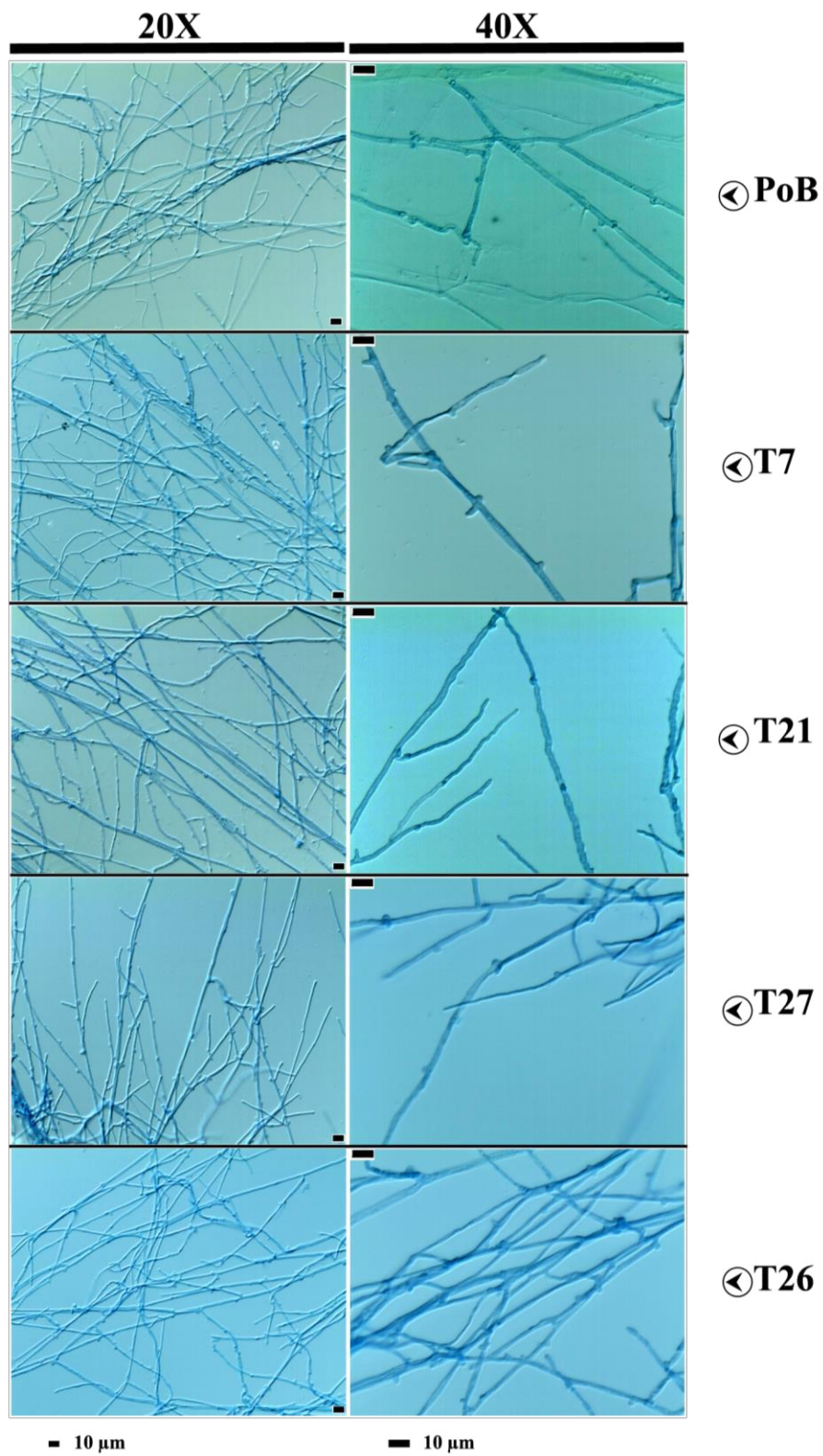


Figura 14. Micromorfología de las hifas observada al microscopio óptico.

7.4 Cultivo de las transformantes seleccionadas y de la cepa nativa sobre granos de trigo

En la figura 15 se muestran los granos de trigo usados para la obtención del inóculo primario. A los 12 días de incubación; el testigo PoB, T7 y T27 completaron la colonización de los granos de trigo por lo que se almacenaron a 4 °C. También se puede observar que al día 12, T21 colonizó aproximadamente $\frac{3}{4}$ partes y T26 apenas colonizó la mitad de los granos de trigo, por lo que ambas bolsas se dejaron en incubación 8 días más. Posteriormente dichas bolsas también fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso.

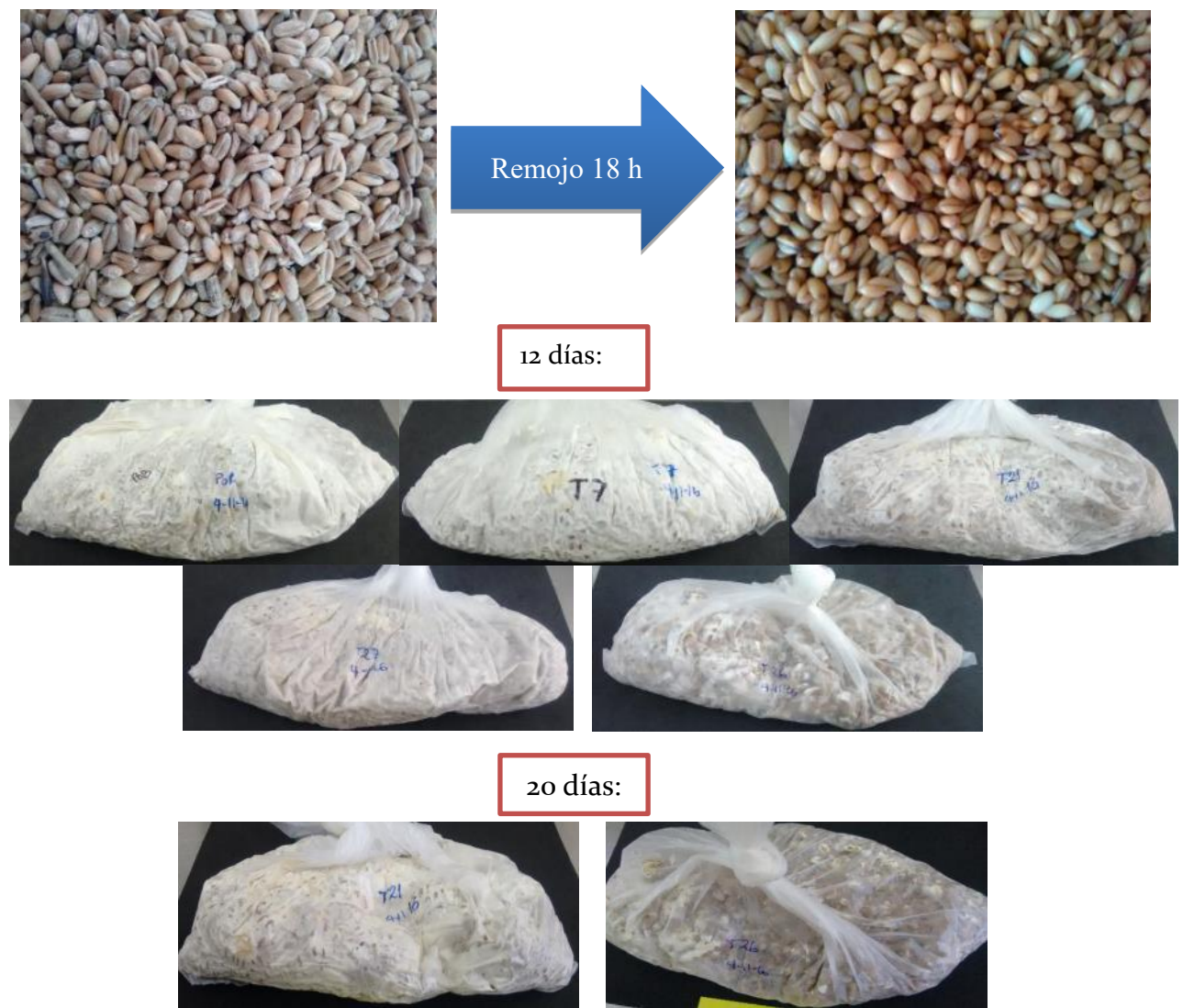


Figura 15. Preparación del inóculo primario y desarrollo a los 12 y a los 20 días.

7.5 Descripción de la morfología macro y microscópica de las transformantes y de la cepa nativa, cultivadas sobre paja de trigo

Una vez preparados los cristalizadores necesarios con la paja de trigo estéril se procedió a la siembra del inóculo primario. En la figura 16, se observa el desarrollo de PoB y de las transformantes a los 8 días de incubación.

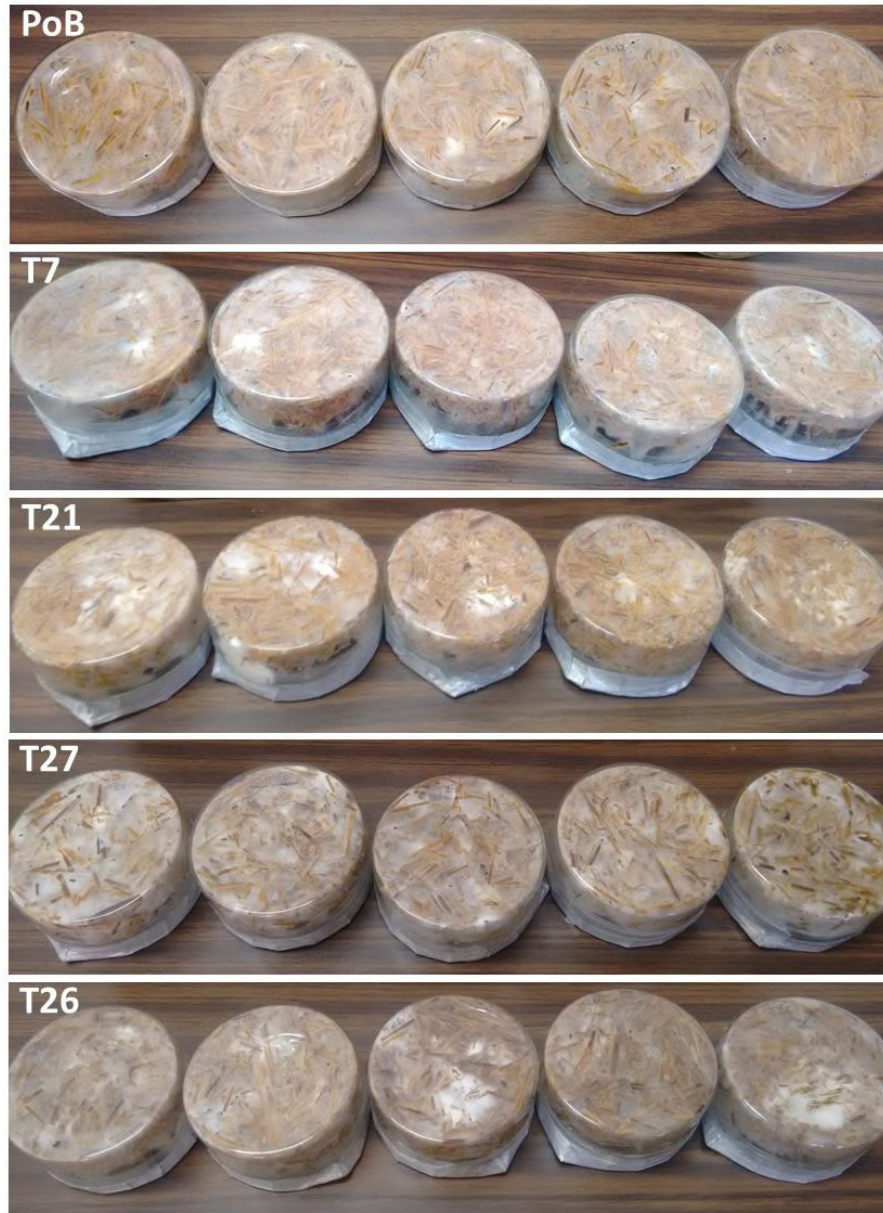


Figura 16. Vista inferior del cultivo de las cepas a los 8 días en paja de trigo.

En la figura anterior se observa que a los 8 días los cultivos de PoB, T7 y T27, presentan una invasión similar, invadiendo toda la paja del cristalizador. Mientras tanto la T21 y T26 mostraron menor invasión en la paja.

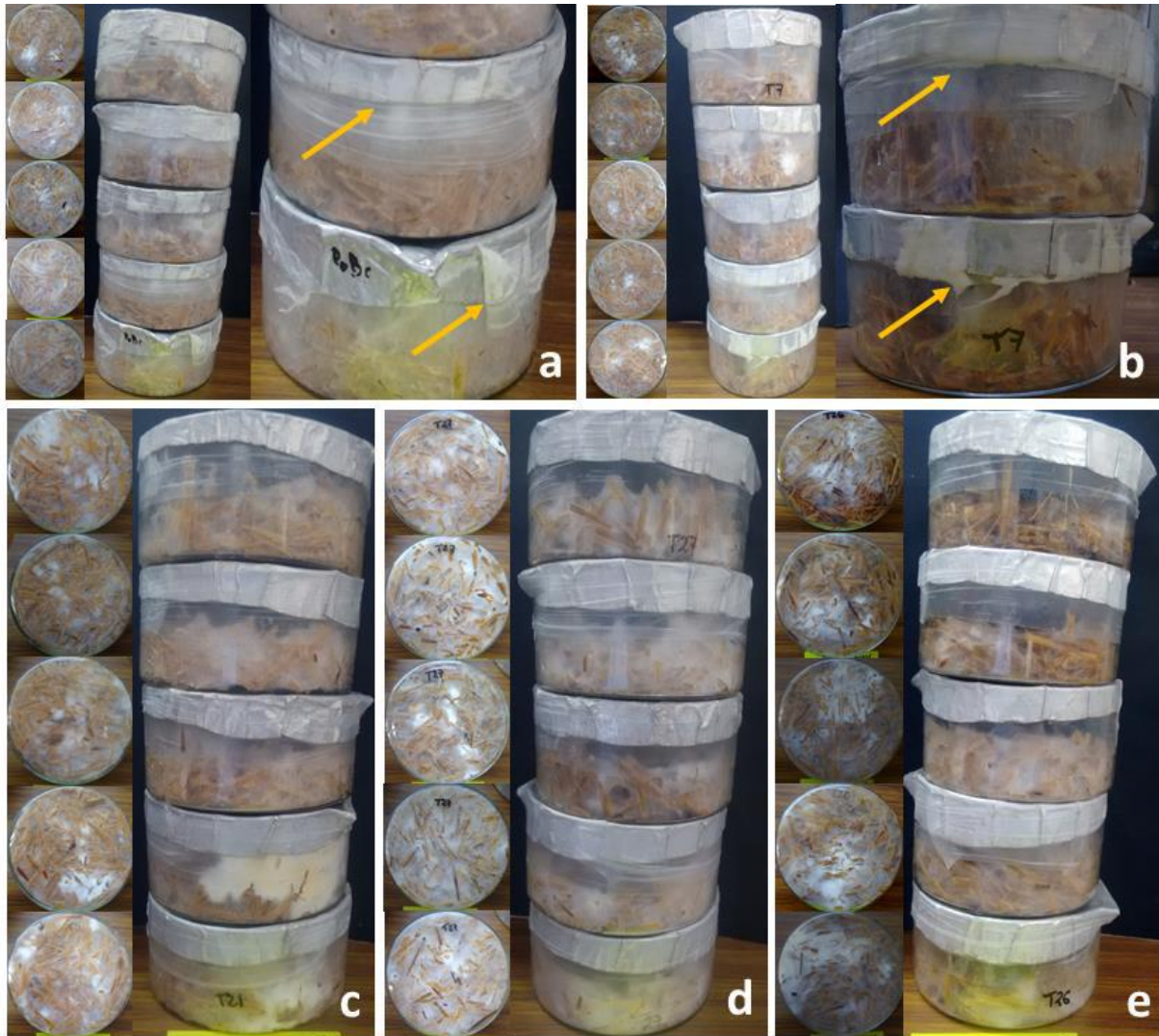


Figura 17. Cultivo en paja de trigo a los 17 días en paja de trigo. a) PoB, b) T7, c) T21, d) T27 y e) T26. Las flechas amarillas señalan el micelio saliendo del cristalizador en las cepas PoB y T7.

A los 17 días en el cultivo de PoB se pudo observar que el micelio había invadido la paja por completo y de manera abundante (figura 17). En la cepa T7, también se pudo observar micelio abundante y la colonización completa de la paja. En ambas cepas el micelio incluso comenzó a

salirse de los cristalizadores (figura 17, flechas amarillas). También en los cultivos de PoB y T7 se pudo apreciar la formación de pequeñas aglomeraciones de micelio en algunos puntos de estos cultivos, dichas aglomeraciones no se observaron en las otras transformantes. En la cepa T21 se observaron puntos de crecimiento del micelio más densos en algunas partes donde la invasión de micelio fue más densa, sin embargo, la colonización no fue uniforme, se observó micelio aéreo escaso en las paredes. En la cepa T27, aunque tuvo una invasión importante del micelio sobre la paja no se observó micelio en la pared, el crecimiento fue más denso en el sustrato, como se puede observar en la base de los cristalizadores en la figura 17, sin embargo, el micelio aéreo fue escaso. En la cepa T26 la colonización fue densa en algunos puntos, pero el micelio fue laxo, no creció de manera uniforme y todavía no invadía por completo toda la paja, el micelio aéreo fue escaso.

A los 18 días, a los cultivos de PoB y a las transformantes T7, T21, T26 y T27 se cambió la tapa de aluminio por plástico tipo Egapack® a la que se le hicieron incisiones con la ayuda de un bisturí con la finalidad de permitir la oxigenación de los cultivos. Se comenzó a rociar agua estéril con un atomizador fino a todos los cultivos con excepción de la cepa T26 ya que aún no había colonizado de manera abundante en ese tiempo. Los cristalizadores se atomizaron a partir del día 18 cada 3er día, usando aproximadamente 200 μL cada vez. A los 25 días de cultivo se comenzó a atomizar la cepa T26 igual que las demás cepas, aunque aún no había terminado de colonizar la paja estaba perdiendo humedad. A los 28 días se aumentó a 400 μL la cantidad de agua, pues se observó que los cultivos requerían mayor humedad. A los 30 días se comenzaron a observar algunos primordios en la T7 y en PoB, a partir de ese día el riego fue cada 24 h, solo para estas cepas, y el resto cada tercer día.

En la figura 18, se muestra la colonización de micelio sobre la paja de trigo a los 30 días. Como puede observarse, el cultivo de PoB y T7 son similares, se observó una decoloración de la paja esto puede ser debido a la invasión y digestión por el micelio, la invasión miceliar fue muy homogénea.

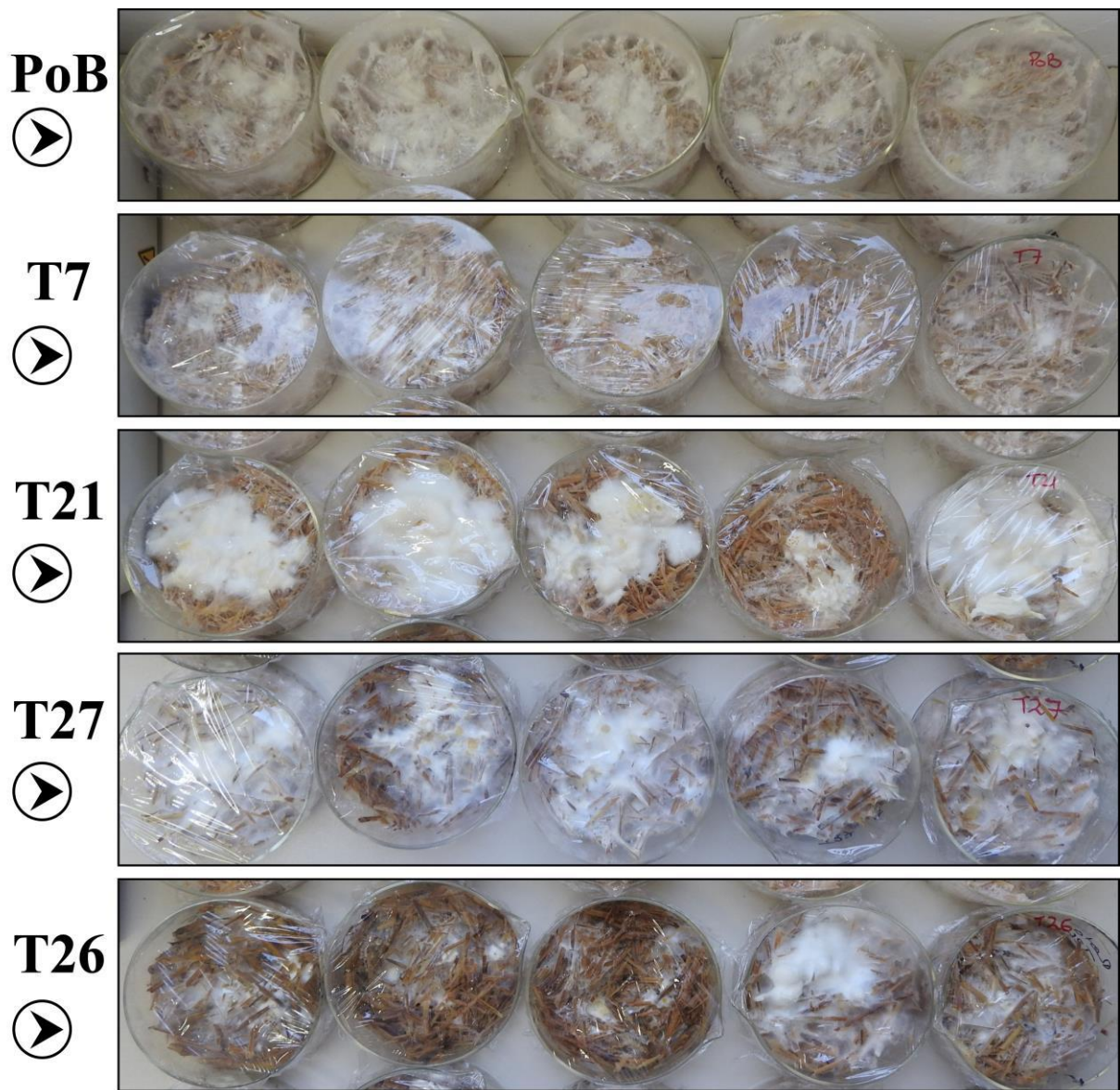


Figura 18. Micelio desarrollado en paja de trigo a los 30 días.

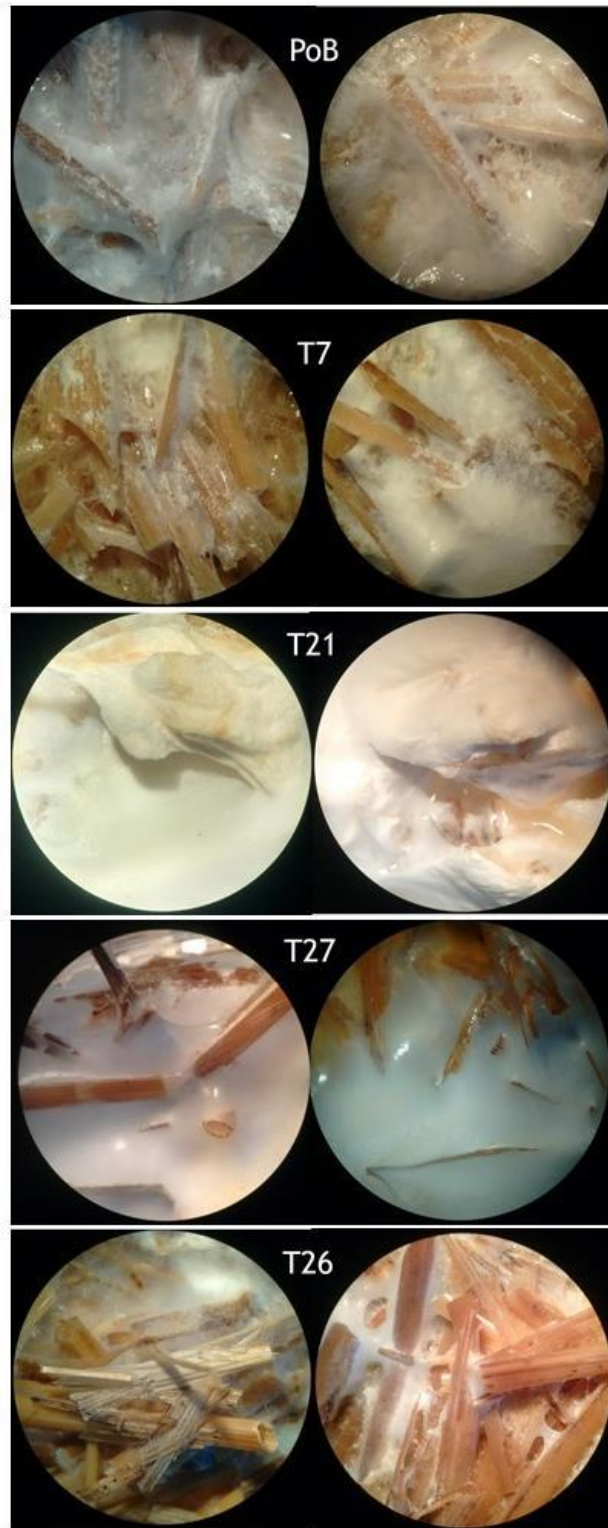


Figura 19. Acercamiento del desarrollo del micelio de cada cepa a los 30 días de cultivo.

En la figura 19, se puede observar la aglomeración de micelio en PoB y T7, lo que parecen ser grumos de micelio, lo mismo se observa en T27, pero en menor medida. La cepa T21 presentó una invasión miceliar completa, pero mucho menos densa en la paja, asimismo, se observó la concentración de micelio en un punto del cultivo en las cinco réplicas, dicho micelio fue muy denso y aéreo (Figura 19); la paja de trigo también mostró un cambio considerable en la coloración comparada con su color inicial. El desarrollo del micelio por T27 fue menos denso en comparación con PoB y T7, es decir, el micelio fue más disperso y laxo y hasta este punto aún no terminaban de colonizar dos de las réplicas, la coloración de la paja sufrió cambios ligeros. Por último, tan sólo una de las réplicas de T26 mostró invasión miceliar importante, el resto tuvo una escasa invasión, el micelio fue laxo, no se completó la invasión miceliar en la paja, asimismo, no se observaron cambios considerables respecto al color inicial. En la figura 20, se observan los primeros primordios en dos réplicas tanto de PoB, como de T7.

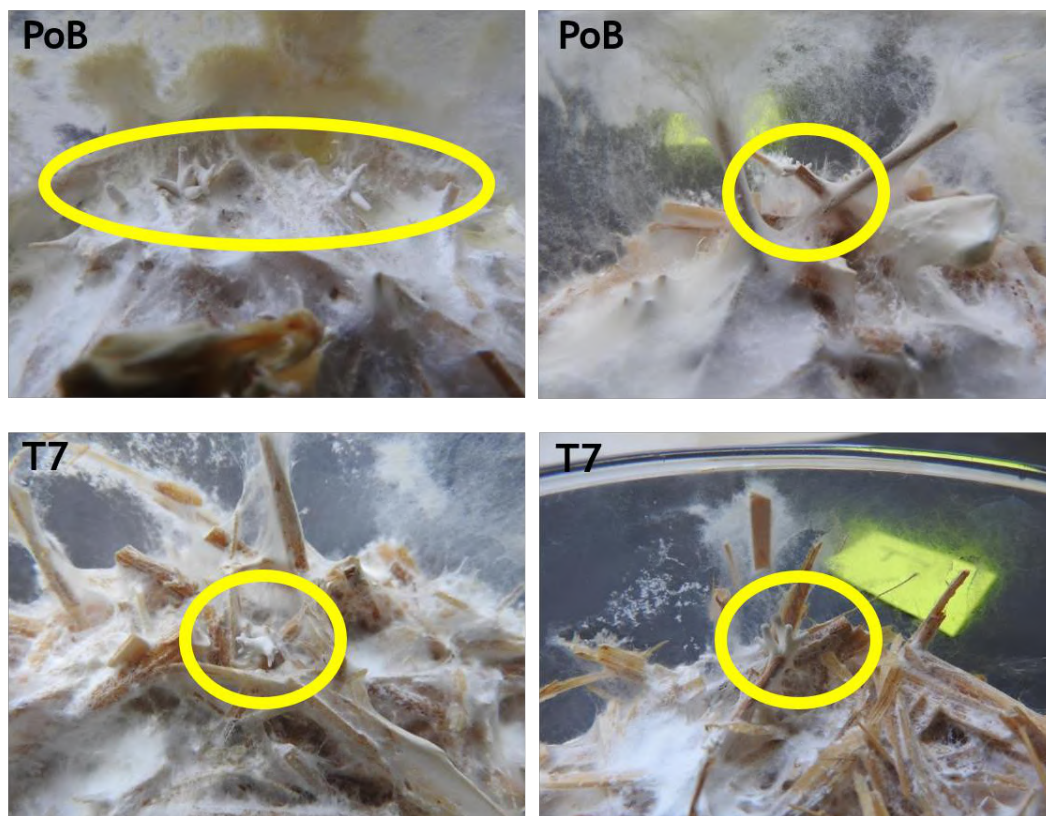


Figura 20. Primordios observados en PoB y T7 a los 30 días de cultivo en paja de trigo.

Tabla 3. Tiempo de cultivo hasta la cosecha y características de los cuerpos fructíferos

Colonia	Días	Ø estípite (mm)	Altura (mm)	Píleo (mm) Ancho-largo	Peso fresco (g)
PoB Réplica 1	35	8.49	72.68	25.98 x 19.96	3.424
PoB Réplica 2	37	9.73	82.51	33.17 x 27.55	4.4895
PoB Réplica 3	37	9.38	80.76	28.87 x 24.78	5.1533
PoB Réplica 4	37	7.36	67.28	24.04 x 23.40	2.9378
PoB Réplica 5	37	10.15	75.86	25.88 x 35.90	6.0684
T7 Réplica 1	35	8.31	77.29	26.54 x 31.01	3.8125
T7 Réplica 2	35	6.69	61.40	21.17 x 20.06	2.809
T7 Réplica 3	37	9.00	61.61	29.99 x 25.42	4.3177
T7 Réplica 4	43	8.79	69.87	28.4 x 26.32	4.2004
T7 Réplica 5	45	7.88	51.32	27.35 x 21.19	2.3209

Como se puede observar en la tabla 3, las réplicas 4 y 5 de T7 tienen un periodo mayor a 40 días. Esto se debe a que los primeros primordios se secaron y no lograron formar un cuerpo fructífero maduro, inmediatamente otros primordios brotaron, cosechando dichos cuerpos fructíferos pasados los 40 días (desde la siembra).

Los hongos se cosecharon en su estado adulto cuando el píleo estaba totalmente extendido, se pesaron en fresco y se tomó un par de fragmentos para obtener las esporas y realizar su observación al microscopio. A continuación, algunas fotografías de los cuerpos fructíferos de PoB y T7.

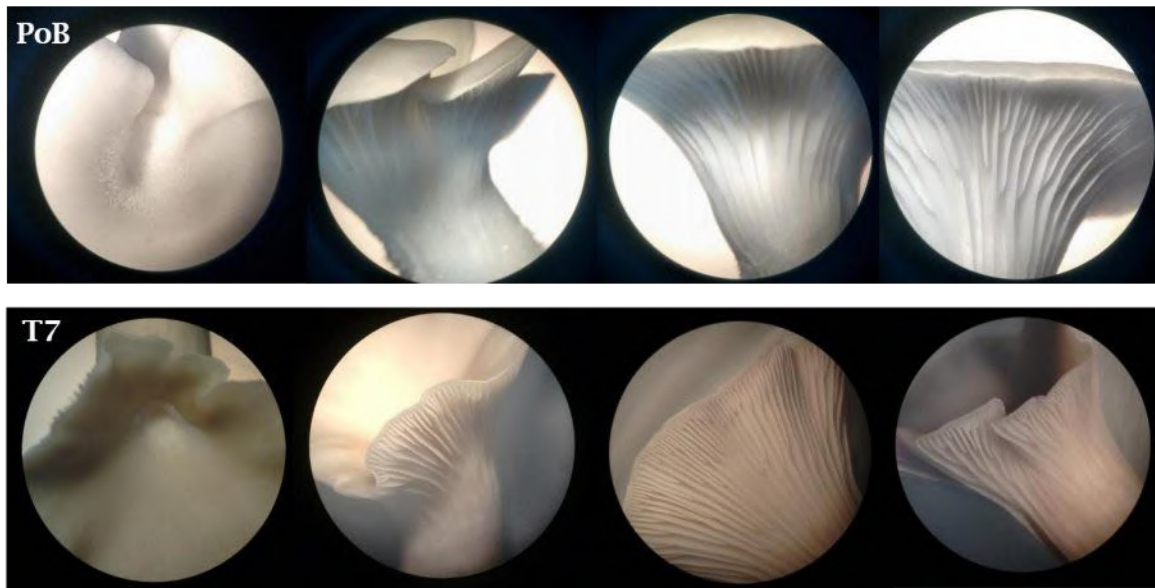


Figura 21. Cuerpo fructífero de PoB y T7.

En la figura 21 se observa el cuerpo fructífero obtenido tanto por PoB como por T7, los tamaños y tiempos de cultivo fueron similares. Ambos píleos tienen forma de embudo, su color es blanquecino, las láminas son decurrentes, ligeramente apretadas, con lamélulas y son finas. La estructura del píleo y de las laminillas es similar, de manera general no se observan cambios, por la cantidad de iluminación en la fotografía un cuerpo se ve más iluminado que otro, pero no existieron cambios en la coloración. Por un lado, el borde del píleo en PoB no está completamente abierto al momento de la captura de imagen, y por el otro lado, el borde del píleo de T7 está totalmente extendido, debido a que su desarrollo es muy rápido y a las pocas horas de observado el primer cuerpo fructífero el otro ya había madurado más. Se realizó la obtención de las esporas a partir de los píleos y se realizaron algunas observaciones al microscopio usando KOH al 10%, donde se registró el largo y ancho de las esporas obtenidas para PoB y T7.

En la figura 22, se observan algunas de las esporas obtenidas, en algunas se observa el apículo o zona basal de la espora (apéndice que queda en el punto de unión con el basidio), su forma es elipsoidal/cilíndrica. El tamaño de las esporas de PoB va de 2.3 a 3.6 μm de ancho y de 6.2 a 10.4 μm de largo y en T7 de 3.4 a 3.7 μm de ancho y de 7.3 a 10.4 μm de largo. Los tamaños obtenidos se encuentran dentro del rango reportado para el género *Pleurotus* (Guzmán 1990)

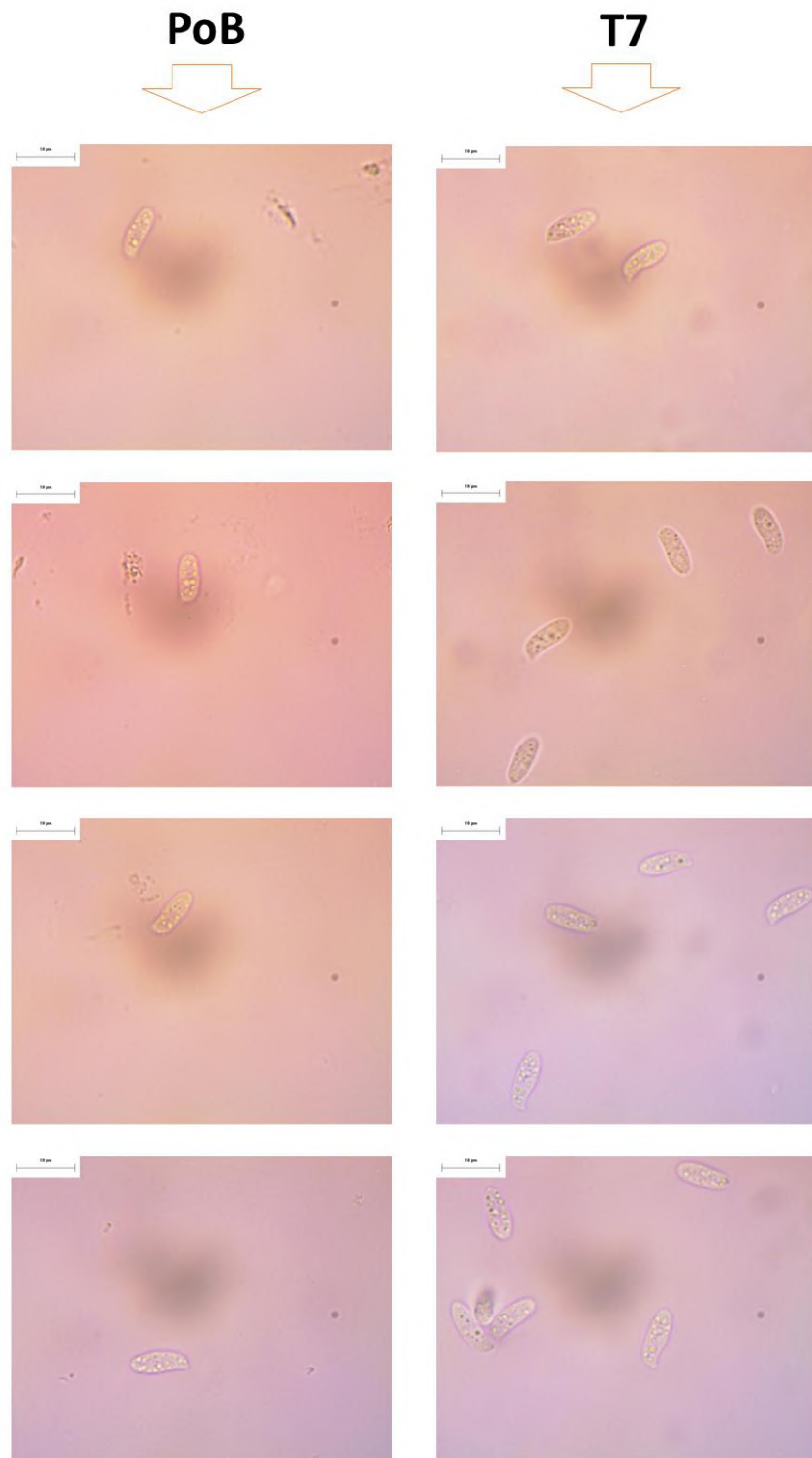


Figura 22. Observación al microscopio óptico de las esporas obtenidas (contraste interferencial Nomarski 100X).

Durante el cultivo en paja de trigo, nuevamente se observaron diferencias en el desarrollo del micelio. Las transformantes que mostraron diferencias en comparación con PoB (T21, T26 y T27), no desarrollaron primordios, por lo que no se obtuvieron cuerpos fructíferos. Por lo anterior, se procedió a realizar un segundo cultivo para realizar observaciones por microscopía electrónica de barrido del micelio desarrollado en paja de trigo y de los cuerpos fructíferos obtenidos, asimismo, para obtener la expresión de genes de lacasa en la paja de trigo y en los cuerpos fructíferos obtenidos.

7.6 Observaciones de micelio en paja de trigo y de cuerpo fructífero por microscopía electrónica de barrido

Estas observaciones se realizaron con la finalidad de observar con mayor detalle el desarrollo del micelio sobre la paja de trigo y los cuerpos fructíferos obtenidos. Dichas observaciones se realizaron al segundo cultivo en paja de trigo usando las mismas condiciones antes descritas. En este segundo cultivo se pudo observar que el desarrollo miceliar de cada cepa fue muy similar al observado en el primer cultivo, en la figura 23 se observan los cultivos a los 30 días.

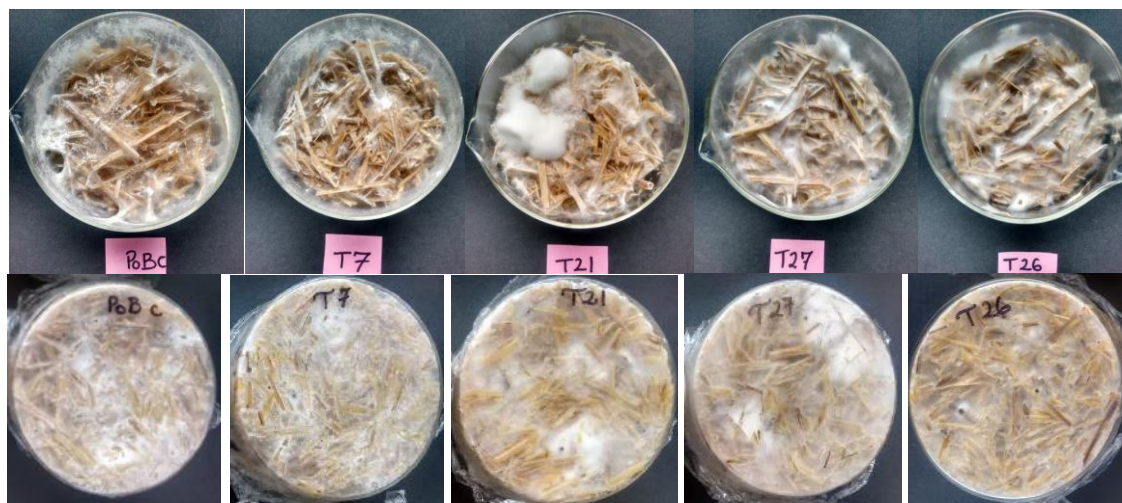


Figura 23. Cultivo en paja de trigo a los 30 días.

Para las observaciones a los cuerpos fructíferos se consideró la observación de las zonas principales: píleo, estípite e himenio. En estas zonas se puede realizar la observación de cistidios. Los cistidios son células estériles localizadas en el himenio de algunos basidiomicetos de gran tamaño, normalmente se encuentran rodeando los basidios, sobresaliendo a éstos. Se

pueden encontrar en la superficie de las diversas zonas del cuerpo fructífero. Los cistidios ayudan a la dispersión de esporas, ya que favorecen la separación entre los basidios. Se nombran según la posición y la morfología, principalmente, por ejemplo, a los cistidios que se sitúan en la capa superficial del píleo se les llama pileocistidios, a los cistidios que se encuentran en la parte superficial del estípite se llaman caulocistidios, si se encuentran en las caras del himenio, se les denomina pleurocistidios y a los que están en la arista del himenio se llaman queilocistidios (Moreno 1986). Su ubicación se puede apreciar mejor en la figura 24.

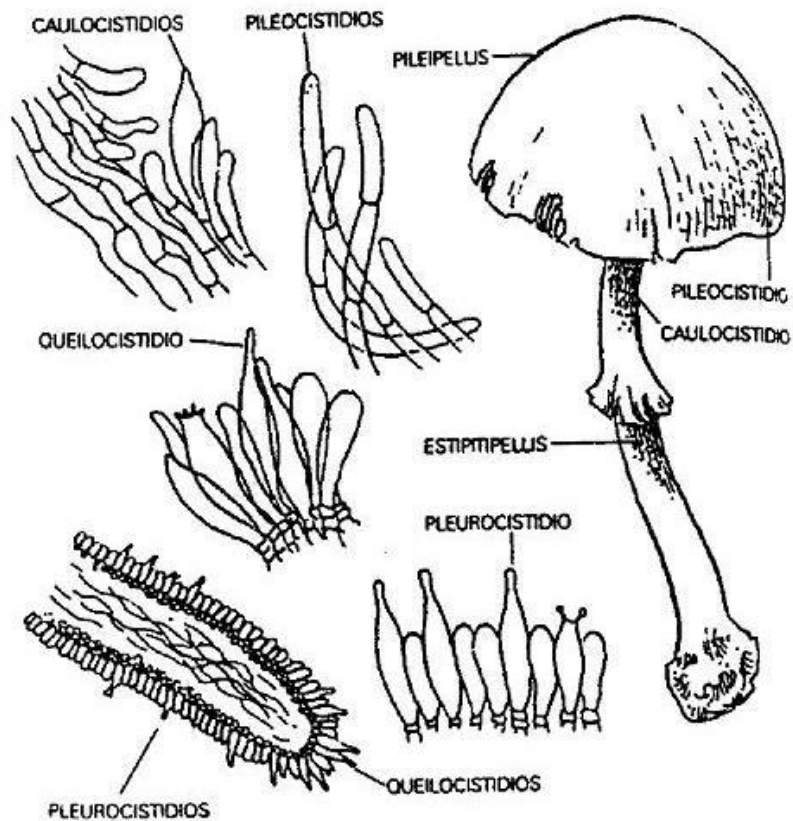


Figura 24. Ubicación de tipos de cistidios en basidiomicetos (Moreno 1986).

En la figura 25 se muestran algunas de las preparaciones listas para su observación por microscopía electrónica de barrido, una con cuerpo fructífero y otra con paja de trigo invadida por el micelio.



Figura 25. Muestras preparadas para su observación por microscopía.

A continuación, se muestran algunas de las imágenes obtenidas en el análisis para PoB (figura 26) y para T7 (figura 27).

Las imágenes obtenidas en el análisis de los cuerpos fructíferos de PoB y T7 se observan en la figura 26 y en la figura 27 respectivamente. En ellas podemos apreciar la presencia de cistidios de forma cilíndrica con ápice capitado (Moreno 1986). De manera general, se alcanzan a observar que los componentes de ambos cuerpos fructíferos son similares. Se pudieron observar pileocistidios, caulocistidios, pleurocistidios y queilocistidios en las diferentes zonas de ambas cepas.

Posteriormente, se realizó la observación de la paja colonizada por el micelio y se hicieron dos acercamientos a los micelios de todas las cepas, el segundo para la observación de hifas. Dichas observaciones se realizaron a partir de un cultivo de 9 días de incubación. En este caso se tienen observaciones tanto de PoB como de las 4 transformantes (figura 28).

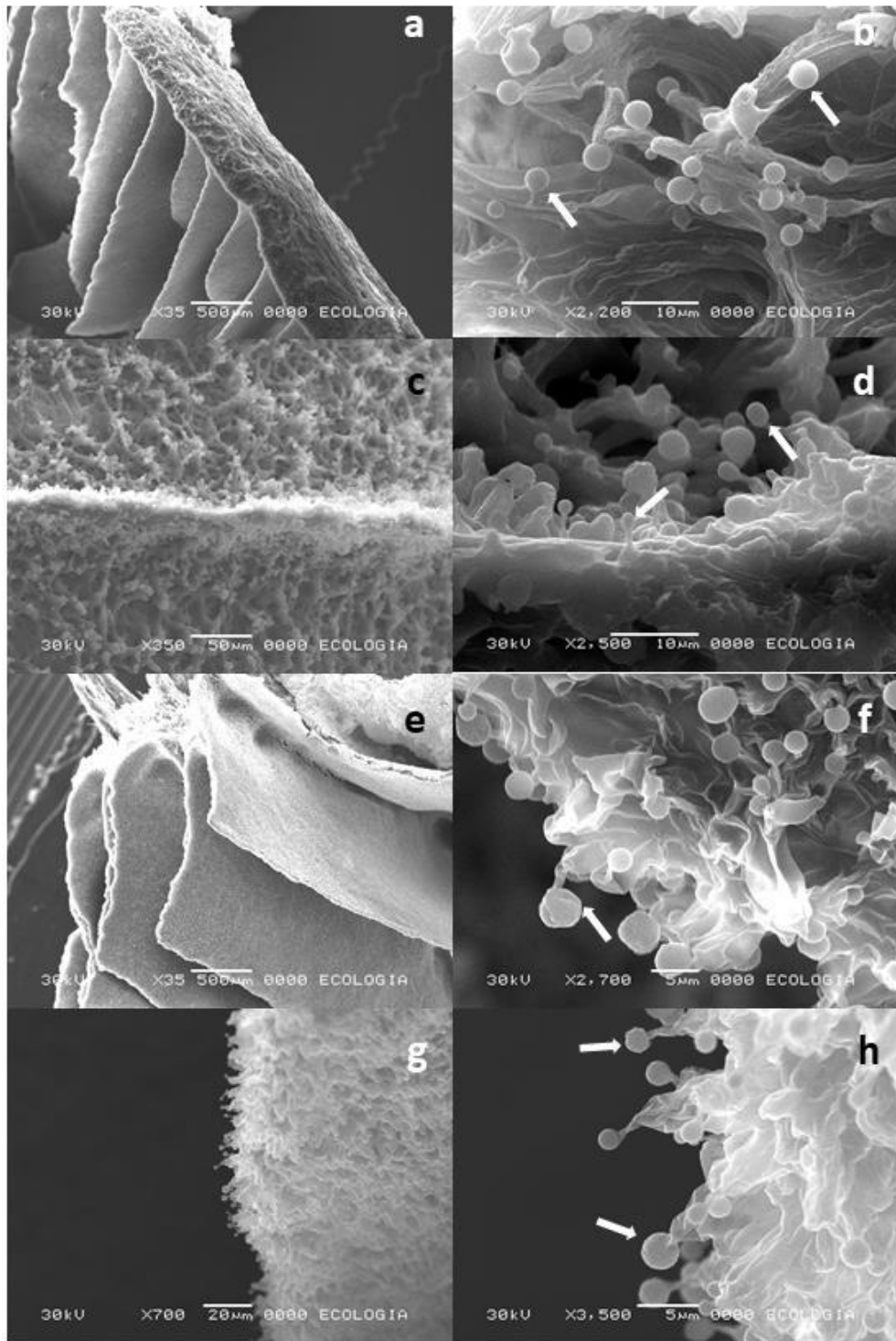


Figura 26. Cuerpo fructífero de PoB observado por microscopía electrónica de barrido: a. píleo. b. pileocistidio. c. estípite. d. caulocistidio. e. himenio. f. pleurocistidio. g. arista del himenio. h. queilocistidio. Las flechas señalan los cistidios.

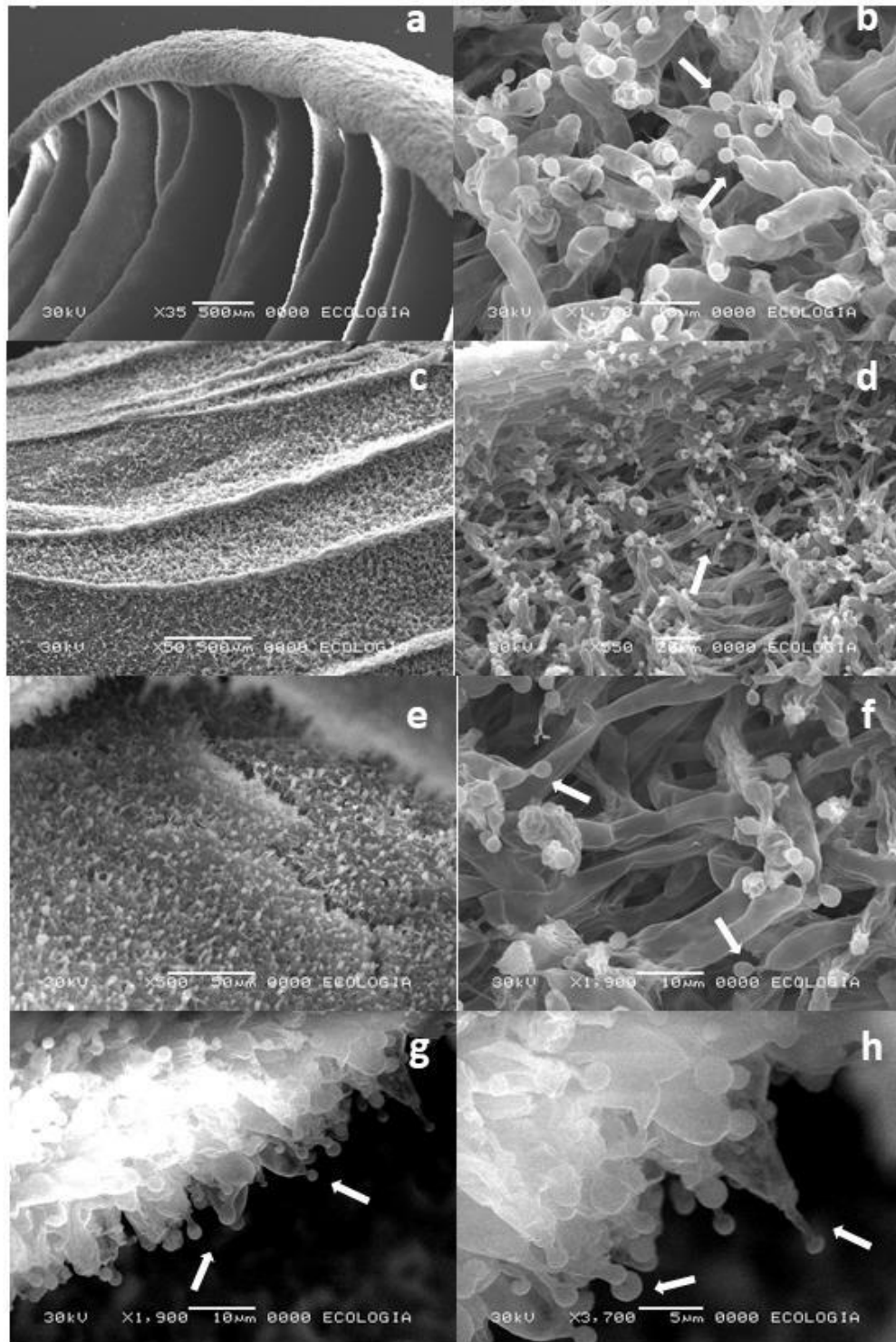


Figura 27. Cuerpo fructífero de T7 observado por microscopía electrónica de barrido: a. píleo. b. pileocistidio. c. estípite. d. caulocistidio. e. himenio. f. pleurocistidio. g. arista del himenio. h. queilocistidio. Las flechas señalan los cistidios.

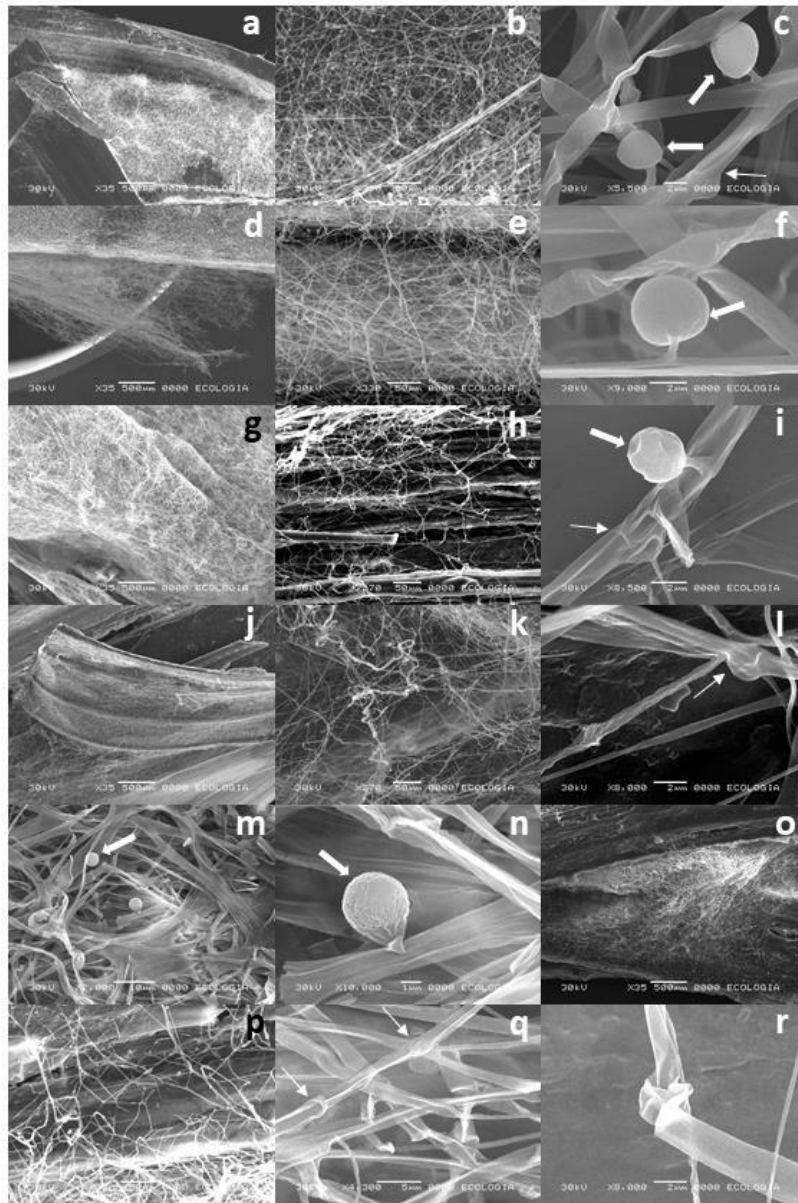


Figura 28. Micelio desarrollado en paja de trigo observado por microscopía electrónica de barrido: a. paja colonizada por micelio de PoB. b. acercamiento al micelio de PoB. c. estructuras tipo toxocisto en PoB. d. paja colonizada por micelio de T7. e. acercamiento al micelio de T7. f. estructura tipo toxocisto en T7. g. paja colonizada por micelio de T21. h. acercamiento al micelio de T21. i. estructura tipo toxocisto en T21. j. paja colonizada por micelio de T27. k. acercamiento al micelio de T27. l. fíbula del micelio de T27. m. estructura tipo toxocisto en T27. n. acercamiento a estructura tipo toxocisto en T27. o. paja colonizada por micelio de T26. p. acercamiento al micelio de T26. q. fíbula del micelio de T26. r. acercamiento al micelio de T26. Las flechas gruesas señalan las estructuras tipo toxocistos. Las flechas delgadas señalan algunas fíbulas.

En la figura 28, incisos a, d, g, j y o, se observa el desarrollo del micelio de las cepas PoB, T7, T21, T27 y T26 respectivamente sobre la paja de trigo. Para la discusión de las otras imágenes de la figura 28 y su posible explicación se realizó una búsqueda en la literatura debido a que en el micelio de las cepas PoB, T7, T21 y T27 se observaron estructuras parecidas a un cistidio capitado, pero que están adheridas o que surgen del micelio del hongo (figura 28 c, f, i, m y n).

Al respecto, existen algunos reportes acerca de la formación de estructuras denominadas como toxocistos en *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, *P. cornucopiae* y *P. sajor-caju* (Cléménçon, 2014, Sierra, 2014, Mamiya y col. 2015, Heydari y col 2006). Los toxocistos descritos en estos reportes consisten en un esterigma fino, similar a un estípote (1.5-4 μm de longitud) que sobresale de las hifas aéreas y una estructura ovoidal similar a una perilla (2.5-3.5 μm de ancho) (Truong y col. 2007).

Se ha documentado que algunas especies de *Pleurotus* complementan su nutrición con algunos compuestos nitrogenados obtenidos de nemátodos a los que atacan y parasitan a través de estructuras denominadas como toxocistos (Barron y Thorn, 1987; Barron 2003; Truong y col. 2007; Balaes y Tanase, 2016). En este sentido se ha reportado la presencia de toxocistos en *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, *P. cornucopiae* y *P. sajor-caju* (Cléménçon, 2014, Sierra, 2014, Mamiya y col. 2015, Heydari y col 2006).

En los toxocistos se han identificado diversas sustancias tóxicas que contribuyen a la acción nematicida. El contenido de la gota del toxocisto para el caso exclusivo de *P. ostreatus* se ha identificado como ácido trans-2-decanoico (Kwok y col. 1992). Este ácido dicarboxílico producido en los toxocistos por *P. ostreatus* es tóxico para nematodos, particularmente para algunas especies del género *Meloidogyne*; cuando el nematodo hace contacto con el toxocisto, la gota se desprende y se revienta, pero sigue siendo adhesiva (Kwok y col. 1992, Sierra, 2014). Para el caso de *P. pulmonarius* se han aislado varios componentes como el ácido s-coriolico, ácido linoleico, p-anisaldehído, alcohol p-anisílico, 1-(4-metoxifenil)1, 2-propanediol y 2-hidroxi-(4-metoxi propiofenona), dichas sustancias afectan a algunos nematodos, insectos y otros hongos (Kwok y col. 1992). La mayoría de los nematodos son paralizados antes del minuto

después del contacto con el toxocisto y pueden o no morir al ser invadidos por las hifas, dependiendo del tiempo de contacto (Truong y col. 2007).

Las estructuras observadas en este estudio son morfológicamente similares a los toxocistos registrados para diversas especies de *Pleurotus*, en este estudio las estructuras tienen entre 1.8-2 μm de longitud en el estípite y entre 2.2-2.6 μm de ancho en la estructura ovoide. No obstante, debido al enfoque de este estudio, en el cual no se evaluó la acción nematicida del hongo, se desconoce si las estructuras observadas son los toxocistos que se describen para esta especie. Por lo anterior, en este estudio, a las estructuras observadas se les denominó como estructura tipo toxocisto.

En la figura 28 b se puede observar la abundancia de las estructuras tipo toxocisto y en la figura 28 c se observa un acercamiento de dicha estructura. En el caso de T7, la observación de dichas estructuras es similar a PoB (figura 28 e y f). También se observan en T21 (figura 28 h e i), aunque de manera menos abundante. En T27 se tuvo que hacer una revisión más exhaustiva y se encontró una estructura tipo toxocisto similar, pero no igual a las observadas en las cepas anteriores (figura 28 m, n). Finalmente, en T26, aunque se hizo una revisión exhaustiva no se logró observar dicha estructura o alguna parecida.

De acuerdo con las imágenes obtenidas en la figura 28, las diferencias más importantes del desarrollo del micelio sobre la paja de trigo se encontraron entre la cepa testigo y las transformantes afectadas de manera media y severa. Estas diferencias radican en la abundancia de dichas estructuras, ya que fueron difíciles de encontrar en la T27 y no se encontraron en la T26 (las dos cepas con afectación fenotípica severa). Asimismo, se realizó la observación del micelio desarrollado en paja de trigo de otra cepa testigo, una cepa que serviría de control para la cepa PoB original. El micelio de la muestra de *P. pulmonarius* IE-115 se observa en la figura 29, dicho micelio también presenta estructuras muy similares a las estructuras tipo toxocisto observadas en *P. ostreatus* PoB y en las transformantes que las presentaron. Con la obtención de estos resultados, se procedió a realizar el análisis de los genes de lacasa expresados en el cultivo.

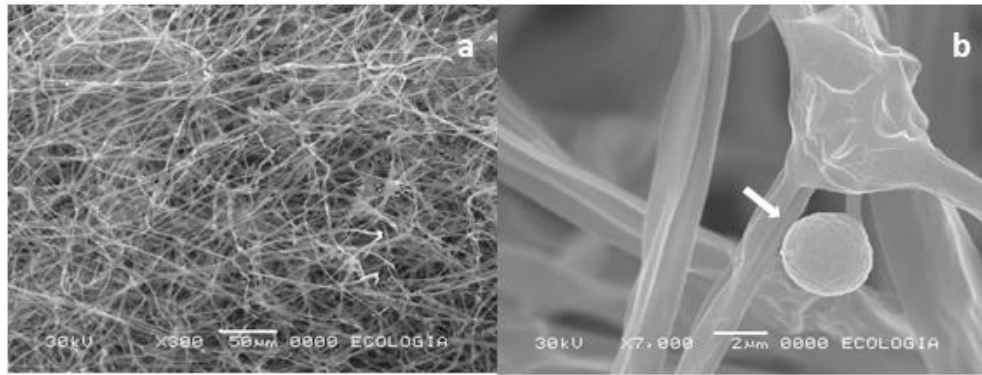


Figura 29. a. Acercamiento al micelio de *P. pulmonarius* IE-115 desarrollado en paja de trigo. b. estructuras tipo toxicisto en *P. pulmonarius* IE-115.

7.7 Evaluación de los genes de lacasa expresados en paja de trigo y en los cuerpos fructíferos

Utilizando los mismos métodos anteriormente descritos, se realizó el análisis de la expresión de lacasas a partir del micelio desarrollado sobre la paja a los 38 días de cultivo para todas las cepas, después de la cosecha de los cuerpos fructíferos de PoB y T7. Asimismo, este análisis se realizó en el píleo, laminillas y estípites de PoB y T7 de los cuerpos fructíferos. También se utilizaron los cebadores para genes de lacasa y actina mencionados previamente. Los resultados obtenidos a partir del micelio desarrollado en paja se observan en la figura 30.

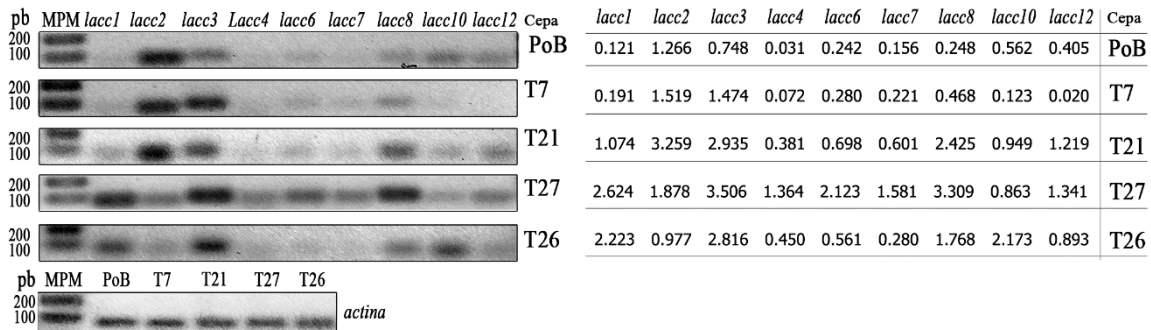


Figura 30. Amplicones obtenidos a partir del micelio crecido en paja de trigo para las cepas PoB, T7, T21, T27 y T26 a los 38 días de cultivo. A la derecha: mRNA de genes para lacasas. A la izquierda: datos de intensidad normalizados.

En la figura 30, se observa que PoB expresó mRNA con mayor intensidad para los genes *lacc2*, *lacc3*, *lacc6*, *lacc8*, *lacc10* y *lacc12*, tuvo una intensidad baja para los genes *lacc1* y *lacc7* y fue

casi nula para *lacc4*. Mientras tanto, el mRNA expresado en el micelio de T7 para los genes *lacc1*, *lacc2*, *lacc4*, *lacc6* y *lacc7* es similar a PoB, se observa la expresión más intensa para *lacc3* y *lacc8*, pero es de menor intensidad para el gene *lacc10* y casi nula para *lacc12*. Para T21 se observó un incremento en la expresión de mRNA para todos los genes con respecto a PoB, incluyendo el gen *lacc4*, aunque con menor intensidad respecto a los demás genes. La mayor intensidad de T21 la presentó para el gen *lacc2*, *lacc3* y *lacc8*. Para la transformante T27 en general, se observa una mayor expresión de todos los genes de lacasa evaluados respecto a todas las cepas, exceptuando los genes *lacc2* y *lacc10*. Los valores más altos para T27 se presentaron en los genes *lacc1*, *lacc3* y *lacc8*. Para T26 también se observó un aumento considerable en la expresión de casi todos los genes respecto a PoB, a excepción de *lacc2*. Las intensidades más altas para T26 se presentaron en los genes *lacc1*, *lacc3*, *lacc8* y *lacc10*. De los resultados cabe destacar, que en las transformantes T21, T27 y T26 se observó un aumento considerable en la expresión de los genes *lacc3* y *lacc8*. La mayor intensidad para el gen *lacc10* la presentó T26.

De acuerdo con los datos obtenidos, las transformantes con afectación fenotípica media y severa mostraron un aumento en la expresión de los genes de lacasas durante su cultivo en paja de trigo. Se pudo observar que T27 también muestra un aumento en la expresión de todos sus genes con respecto a PoB, lo que respalda lo antes mencionado, en los cultivos sólido y líquido, acerca de una posible compensación en la expresión génica. Sin embargo, hay que recordar que dichos resultados fueron obtenidos en un tiempo únicamente y estos perfiles de expresión podrían cambiar a lo largo del cultivo.

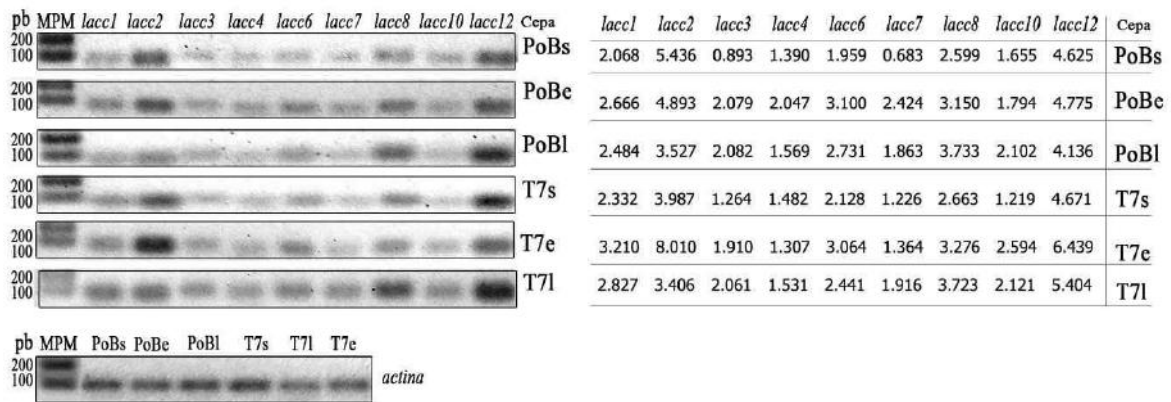


Figura 31. mRNA de genes de lacasa en 3 zonas: píleo (PoBs y T7s), estípite (PoBe y T7e) y laminillas (PoBl y T7l). A la derecha: mRNA de genes para lacasas. A la izquierda: datos de intensidad normalizados.

En la figura 31 se observa de manera general la expresión de todos los genes de lacasa, además de que para los genes *lacc2* y *lacc8* y *lacc12* hay una mayor expresión tanto en PoB como en T7 en las tres zonas. Se apreció una mayor intensidad en la expresión de *lacc2* en las zonas del píleo y del estípite en ambas cepas. También una mayor intensidad en la expresión del gen *lacc8* en la zona de las laminillas en ambas cepas.

El perfil de expresión de los genes de lacasa entre el micelio crecido sobre la paja y las estructuras del cuerpo fructífero es muy distinto, considerando una menor intensidad del gen *lacc3* en la paja de trigo y una mayor intensidad en la expresión de *lacc12* en el cuerpo fructífero. Esto sugiere que existe una participación diferencial de la expresión génica en los diferentes estadios de cultivo.

7.8 Observaciones de micelio desarrollado en EMA y PDA por microscopia electrónica de barrido

Para verificar si las estructuras tipo toxocisto observadas en el micelio desarrollado en paja de trigo también se encontraban durante su crecimiento *in vitro* se realizaron observaciones de micelio desarrollado en EMA y PDA por microscopia electrónica de barrido. Para ello se cultivó micelio de PoB y de las 4 transformantes en agar extracto de malta (EMA) las muestras se observaron a los 15 días de cultivo. Además, se utilizó el micelio desarrollado en PDA de una cepa testigo, *P. ostreatus* 240, para comparar los resultados de las observaciones realizadas, esta

cepa tenía aproximadamente 15 días de cultivo. Los resultados obtenidos del micelio desarrollado en EMA se muestran en la figura 32.

En el micelio de la cepa testigo PoB (figura 32 A, B y C) se observaron las mismas estructuras tipo toxocisto presentes durante el desarrollo en paja de trigo, no son abundantes, pero se llegaron a observar. En el micelio de T7 (figura 32 D, E y F) también se observaron, pero tampoco son frecuentes. En el micelio de T21 (figura 32 G, H e I) apenas se pudo observar una estructura tipo toxocisto aparentemente igual, sin embargo, la posición de las hifas impidió una toma adecuada, lo que sí pudimos observar fueron unas fíbulas muy pronunciadas y lo que parecía ser una extensión del micelio (véase el micelio dentro de los círculos en la figura 32 H). En el micelio de T27 también se encontraron las estructuras tipo toxocisto, aunque son poco frecuentes (figura 32 J, K y L). En el micelio de T26 no se encontraron dichas estructuras (figura 32 M, N y O).

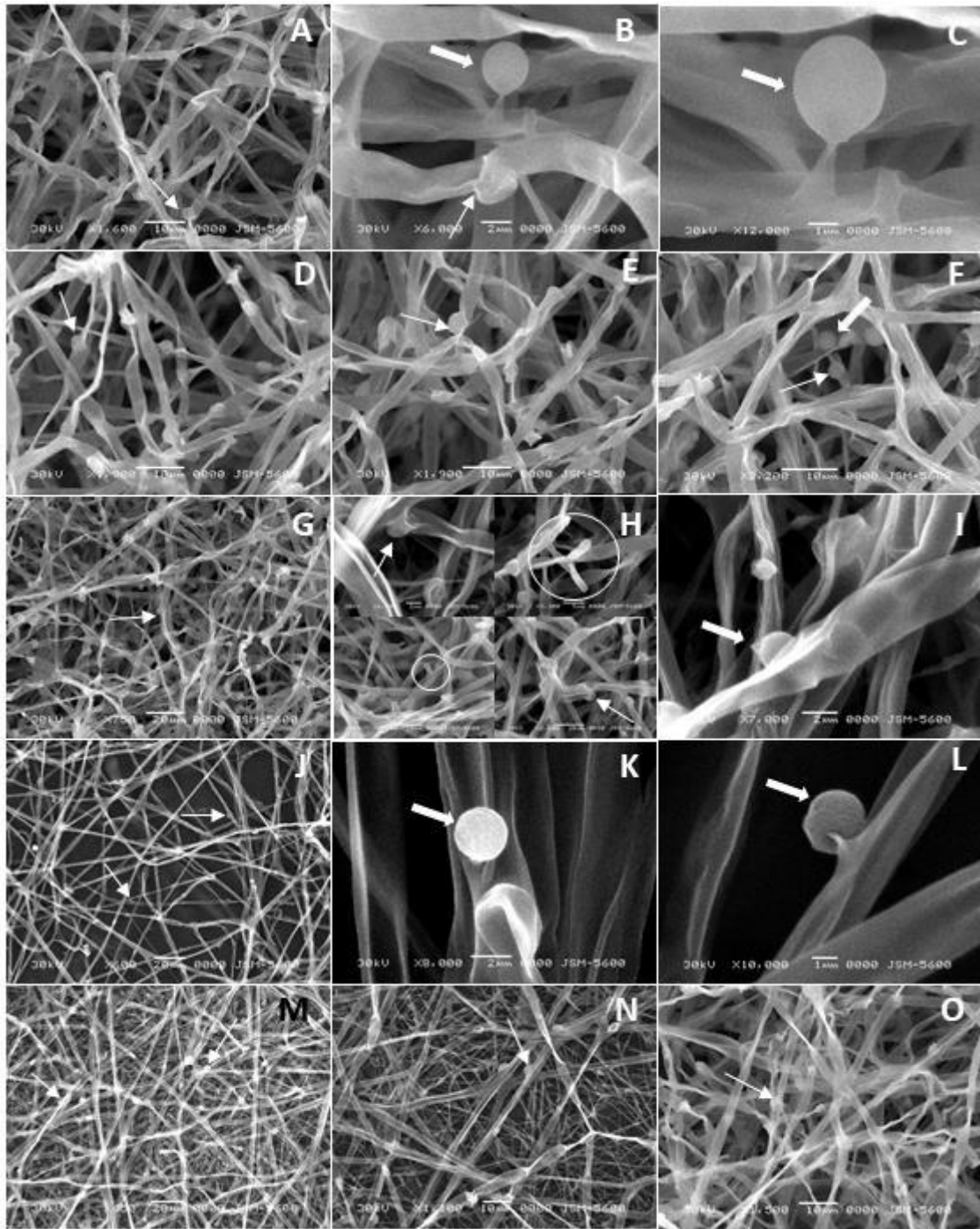


Figura 32. Observaciones por microscopía electrónica de barrido de micelio desarrollado en EMA a los 15 días de cultivo. PoB (A, B y C), T7 (D, E y F), T21 (G, H y I), T27 (J, K y L) y T26 (M, N y O). Las flechas gruesas indican algunas estructuras tipo toxocisto y las delgadas algunas fibulas presentes.

Posteriormente se observó el micelio de la cepa *P. ostreatus* 240 desarrollado en placa con medio agar dextrosa papa (PDA). Los resultados obtenidos se observan en la figura 33, las estructuras tipo toxocisto están presentes incluso de manera más abundante que en la cepa PoB.

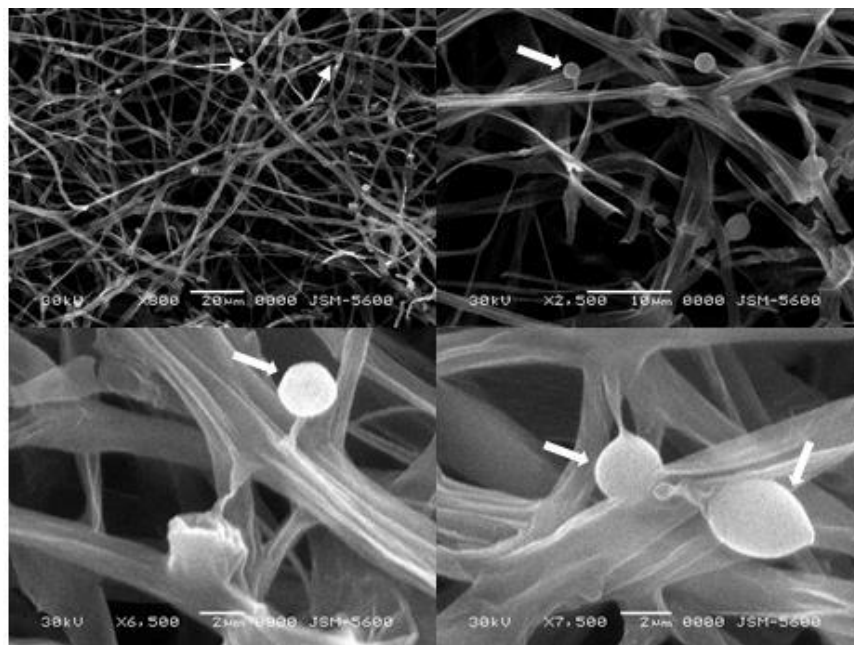


Figura 33. Observaciones por microscopía electrónica de barrido del micelio de *P. ostreatus* 240 desarrollado en PDA a los 15 días de cultivo. Las flechas gruesas indican algunas estructuras tipo toxocisto y las delgadas algunas fibulas presentes.

Los resultados anteriores mostraron que el micelio desarrollado en placa de PoB, T7, T27 y *P. ostreatus* 240 presentó las estructuras tipo toxocisto antes observadas en paja de trigo. Aparentemente T21 también presenta estas estructuras, pero la posición en la que se encontraba no permitió capturar la imagen de manera adecuada y a pesar de buscar de manera exhaustiva no se encontraron estas estructuras en T26.

Las estructuras tipo toxocisto fueron observadas en el micelio que creció en paja de trigo en *P. ostreatus* PoB y en *P. pulmonarius* IE-115 y también fueron observadas en el micelio de *P. ostreatus* PoB que creció en EMA y en el micelio de *P. ostreatus* 240 que creció en PDA.

Podemos observar que existe una relación entre la actividad lacasa y la presencia de las estructuras observadas en este estudio. Es decir, la evidencia nos muestra que cuanto menos actividad lacasa exista, menos estructuras de este tipo se producen. Además, al disminuir de

manera considerable las estructuras observadas, el hongo pierde la capacidad de formar el cuerpo fructífero. Dicho de otra manera, los resultados sugieren que la producción de enzimas lacasas en este hongo es necesaria para producir las estructuras observadas y éstas a su vez, son necesarias para llevar a cabo el proceso de fructificación, por lo que su disminución o ausencia deriva en la incapacidad para formar un cuerpo fructífero.

Por otro lado, se ha especulado con que la envoltura elástica del globo del toxocisto está compuesta de una sustancia similar al látex, ya que es estirable (Truong y col. 2007). Esta especulación relaciona al toxocisto con las lacasas, pues de acuerdo con la descripción de estas enzimas cuando el árbol de la laca sufre una herida, secreta un látex que polimeriza en una reacción dependiente de lacasas formando una película protectora (Davies y Ducros, 2001). Esto podría corroborar la propuesta anterior acerca de la participación de la lacasa en la presencia de dichas estructuras si se llegara a confirmar que son las mismas.

7.9 Cultivo de las transformantes usando glucosa y lignina como fuente de carbono

A continuación, se observan los resultados obtenidos en los cultivos realizados.

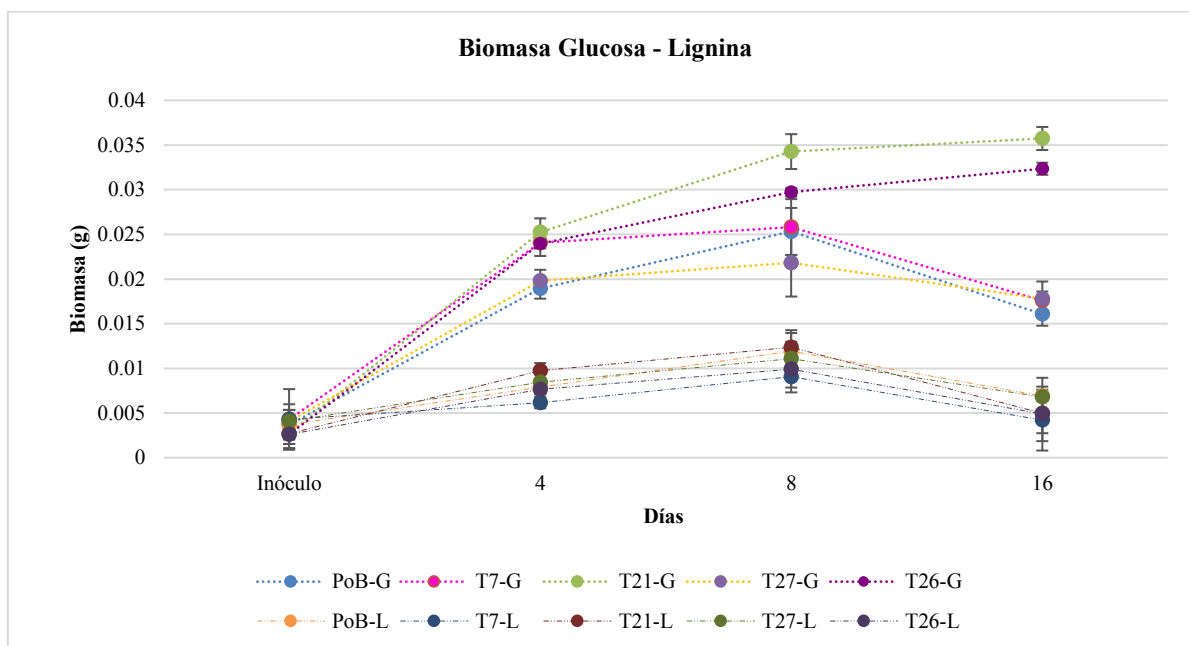


Figura 34. Biomasa producida en cultivo con glucosa vs lignina.

En la figura 34 de manera general, se puede observar que la biomasa producida en el cultivo con lignina es menor en comparación con la producida por el cultivo con glucosa. En el cultivo con lignina, se aprecia que la producción de biomasa tanto por la cepa testigo como por las transformantes es similar en los 3 días de muestreo. En el cultivo con glucosa, T21 produce valores mayores de biomasa en comparación con PoB y el resto de las transformantes. Para el día 16 del cultivo con glucosa la biomasa fue de 0.0357 g para T21 y de 0.0323 g para T26. En el cultivo con lignina la mayor producción de biomasa fue en el día 8 para todas las cepas, el valor más alto fue de 0.0123 g en T21. Los resultados obtenidos no reflejaron ninguna tendencia debido a la afectación de las transformantes, únicamente se observó que en los cultivos con glucosa se produjo mayor cantidad de biomasa y entre estos cultivos tampoco se observó tendencia alguna.

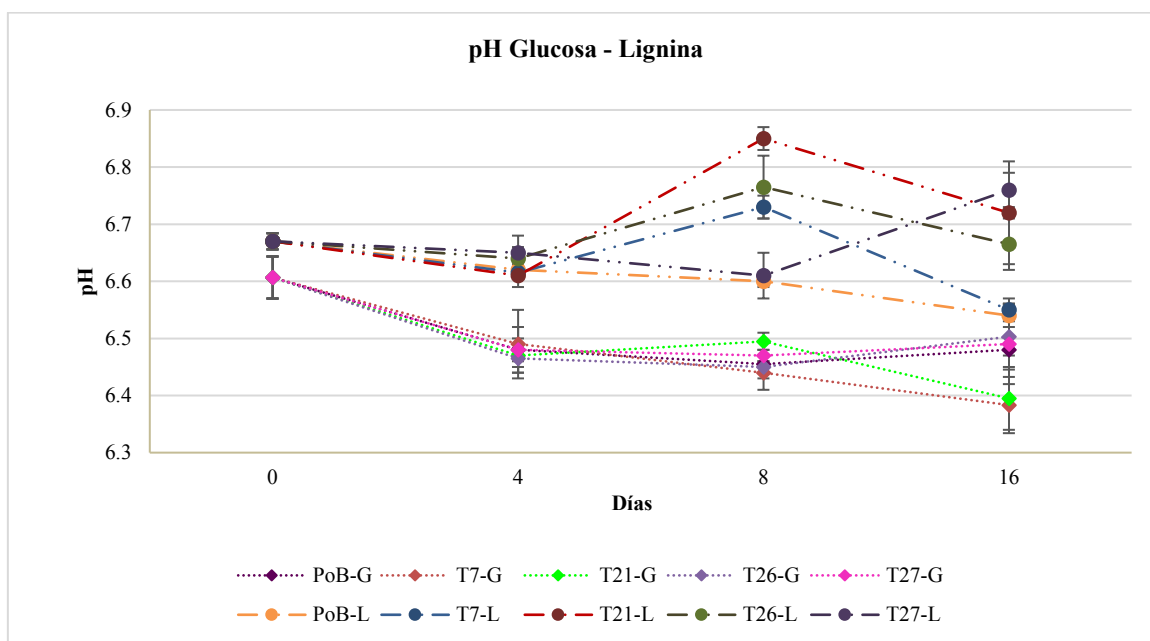


Figura 35. pH en cultivo con glucosa vs lignina.

En la figura 35, se puede observar que los valores de pH disminuyeron un poco más en el cultivo con glucosa. El pH en el cultivo con lignina fue más variable en los días 8 y 16. Mientras que en el cultivo con glucosa el pH tuvo una variabilidad mayor el día 16. Esta variabilidad en el pH es algo común, los microorganismos pueden alterar el pH del medio de cultivo como resultado de las sustancias producidas por el propio organismo. La acidificación del medio

indica la producción de ácidos orgánicos derivado del uso de carbohidratos. La tendencia a alcalinizar el medio se debe al catabolismo de proteínas lo que produce materiales nitrogenados. No obstante, los aumentos o disminuciones en los valores obtenidos en ambas condiciones no cambiaron el pH de manera extrema.

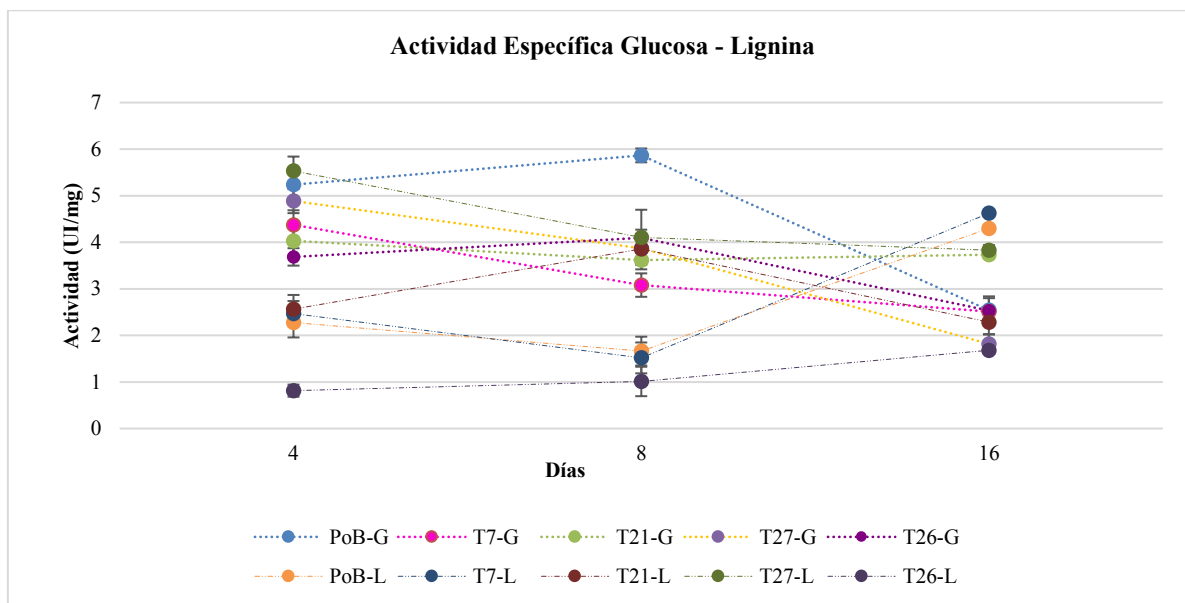


Figura 36. Actividad específica del cultivo con glucosa vs lignina

En la figura 36 podemos observar la actividad específica obtenida en ambos cultivos. La menor actividad la obtuvo T26 en cultivo con lignina durante los días 4, 8 y 16. PoB obtuvo una actividad máxima de 5.86 UI/mg en el día 8 en el cultivo con glucosa. T27 tuvo actividades altas en comparación con el resto, incluyendo el testigo durante su cultivo con lignina, en el día 4 obtuvo 5.53 UI/mg. En el cultivo con lignina PoB y T7 tuvieron valores similares en los 3 días de muestreo en cuanto a actividad específica y alcanzaron su máxima actividad en el día 16, con 4.29 UI/mg para PoB y 4.62 UI/mg para T7.

En la figura 37, se observa el consumo de glucosa por las 5 cepas. En general, se observó que el consumo de glucosa hasta el día 16 fue de entre 20 y 30%. Aunado a esto se observaron fluctuaciones en los datos.

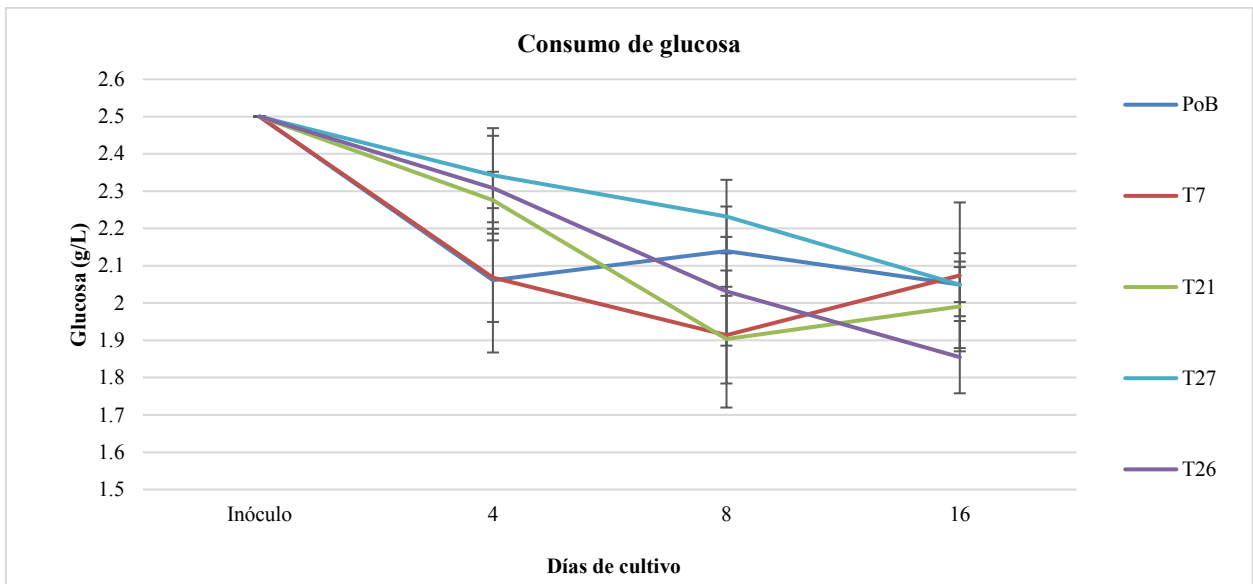


Figura 37. Consumo de glucosa

En cuanto al consumo de lignina, se observó en la figura 38 que el consumo cuantificado fue de entre el 30 y el 40%. Asimismo, se observó que el consumo de lignina fue similar para todas las cepas, incluyendo PoB.

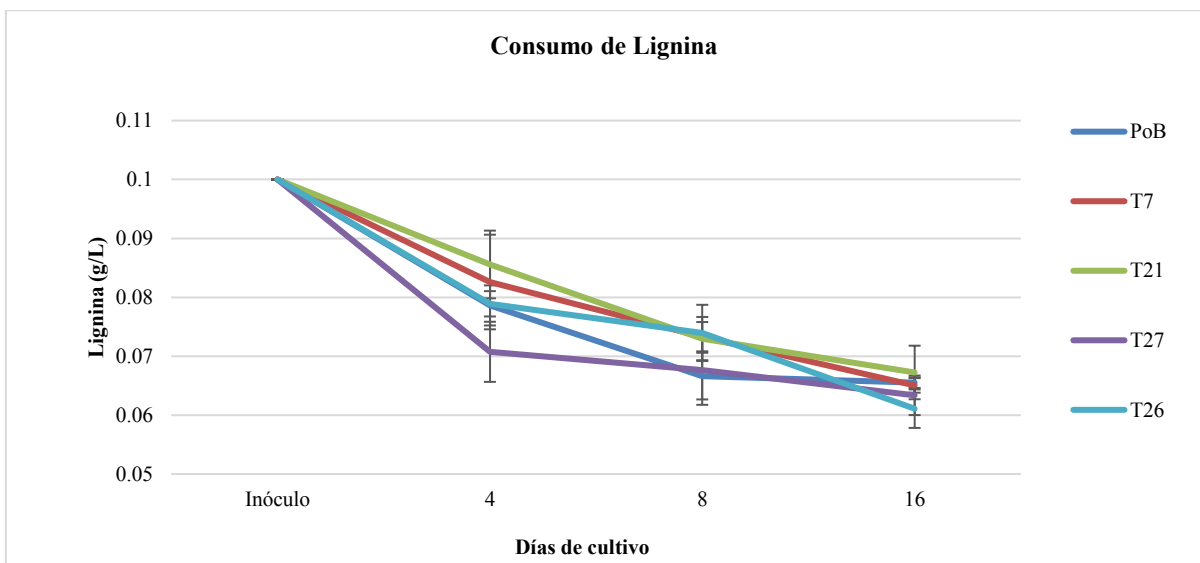


Figura 38. Consumo de lignina

En esta etapa del estudio se pudo observar que el porcentaje de consumo de lignina fue mayor al de glucosa. Asimismo, se observó que entre el día 8 y en algunos casos en el día 16 en ambos cultivos se alcanzó la máxima producción de biomasa y valores altos en el pH. La actividad específica de lacasa fue variable en ambos cultivos por las diferentes cepas, lo que nos impide diferenciar la afectación en la capacidad de aprovechamiento de las fuentes de carbono con claridad. Por un lado, esto pudiera deberse a la capacidad en sí misma de la cepa PoB para desarrollarse en el medio Czapek el cual al ser un medio mínimo no ofrece todos los nutrientes necesarios para que haya un aprovechamiento adecuado de la fuente de carbono por el hongo. Por otro lado, hubo también cuestiones técnicas de control de temperatura en el equipo utilizado para su incubación que pudieron añadir la variabilidad que afectó a los cultivos y que nos impide realizar una diferenciación en la capacidad de aprovechamiento de lignina de las transformantes durante este cultivo *in vitro*.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que las lacasas podrían estar involucradas en el desarrollo del micelio de *P. ostreatus* PoB durante su cultivo *in vitro*, ya que la disminución de su actividad enzimática produce la disminución de biomasa e isoenzimas, así como también afecta la morfología a nivel macroscópico, por otro lado, en las cepas con mayor afectación se disminuye la velocidad media de crecimiento.

Por otro lado, los cambios observados en el cultivo en paja de trigo tanto a nivel macroscópico como a nivel microscópico, resultaron en la incapacidad de formar primordios y, por ende, cuerpos fructíferos por parte de las transformantes afectadas de manera media y severa en cuanto a su producción de actividad enzimática lacasa. Además, los resultados obtenidos sugieren que la producción de enzimas lacasas en este hongo es necesaria para producir las estructuras tipo toxocisto observadas en el micelio desarrollado en paja de trigo y en EMA/PDA y podría ser que éstas a su vez, son necesarias para llevar a cabo el proceso de fructificación ya que su disminución o ausencia coincide con la incapacidad para formar un cuerpo fructífero.

Por lo que es posible que las lacasas tengan una participación importante en el proceso de morfogénesis del hongo durante su cultivo en paja de trigo.

En cuanto a los resultados obtenidos del aprovechamiento de lignina, estos no permiten evidenciar la participación de las lacasas en el aprovechamiento de lignina en cultivos *in vitro*.

9. PERSPECTIVAS

De los resultados obtenidos se derivan las siguientes perspectivas para trabajos futuros:

La identificación de la acción nematocida por las estructuras tipo toxocisto identificadas en este trabajo, corroboraría que corresponden a toxocistos.

Resultaría interesante evaluar algunas cualidades en las transformantes, por ejemplo, su actividad antagónica frente a hongos patógenos.

También podría evaluarse la actividad y capacidad de crecimiento de las transformantes en cultivos *in vitro* adicionados con compuestos tóxicos.

Para poder evaluar de manera acertada el aprovechamiento en el consumo de lignina por las transformantes en cultivos *in vitro* sería indispensable el uso de estrategias más sofisticadas para la determinación del consumo de lignina, tal es el caso de la espectrofotometría de masas acoplada a gases.

10. REFERENCIAS

Alves AM, Record E, Lomascolo A, Scholtmeijer K, Asther M, Wessels JG y Wösten HA. 2004. Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol* 70(11): 6379-6384.

Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR y Kramer KJ. 2005. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(32): 11337-11342.

Arias ME, Arenas M, Rodríguez J, Soliveri J, Ball AS y Hernández M. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl Environ Microbiol* 69(4):1953-1958.

Arora DS y Sharma RK. 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Appl Biochem Biotechnol* 160(6): 1760-1788.

Balaes T y Tanase C. 2016. Basidiomycetes as potential biocontrol agents against nematodes. *Rom Biotechnol Lett* 21(1): 11185-11193.

Bar-Nun N y Mayer AM. 1990. Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 29(3):787-791.

Barron GL. 2003. Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. *Biodiversity*, 4(1): 3-9.

Barron GL y Thorn RG. 1987. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Can J Bot* 65(4): 774-778.

Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2): 281-297.

Bermek H, Li K y Eriksson KEL. 1998. Laccase-less mutants of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* cannot delignify kraft pulp. *J Biotechnol* 66(2): 117-124.

- Bhadauria V, Banniza S, Wei Y y Peng YL. 2009. Reverse genetics for functional genomics of phytopathogenic fungi and oomycetes. *Comp Funct Genom* 09: 1-11.
- Bourbonnais R, Paice MG, Freiermuth B, Bodie E y Borneman S. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl Environ Microbiol* 63(12): 4627-4632.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Call HP. 1994. Process for modifying, breaking down or bleaching lignin, materials containing lignin or like substances. *W Pat Appl WO94/29510*.
- Castanera R, Pérez G, Omarini A, Alfaro M, Pisabarro AG, Faraco V, Amore A y Ramírez L. 2012. Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. *Appl Environ Microbiol* 78(11): 4037-4045.
- Catalanotto C, Pallotta M, ReFalo P, Sachs MS, Vayssie L, Macino G y Cogoni C. 2004. Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* 24(6): 2536-2545.
- Chang SS, Zhang Z y Liu Y. 2012. RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annu Rev Microbiol* 66: 305-323.
- Chakraborty TK, Das N, Sengupta S y Mukherjee M. 2000. Accumulation of a natural substrate of laccase in gills of *Pleurotus florida* during sporulation. *Curr Microbiol* 41(3): 167-171.
- Chen S, Ge W y Buswell JA. 2004. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. *FEMS Microbiol Lett* 230(2): 171-176.
- Claus H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35(1): 93-96.
- Claus H y Filip Z. 1997. The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. *Microbiol Res* 152(2): 209-216.

- Clémenton H, Emmett V y Emmett E. 2004. Cytology and plectology of the Hymenomycetes. *Bibl Mycol* 199: 1-488.
- Clutterbuck AJ. 1972. Absence of laccase from yellow spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 70(3): 423-435.
- Das N, Sengupta S y Mukherjee M. 1997. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Appl Environ Microbiol* 63(10): 4120-4122.
- Davies GJ y Ducros V. Laccases. Messerschmidt A, Huber R, Poulos T, Wieghardt K (Eds.). 2001. *Handbook of Metalloproteins, II* Wiley, Chichester, UK. pp. 1359–1368
- Debeaujon I, Léon-Kloosterziel KM y Koornneef M. 2000. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122(2): 403-414.
- Dixon R A, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MS y Wang L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* 3(5): 371-390.
- D'Souza TM, Merritt SC y Reddy A. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl Environ Microbiol* 65(12): 5307-5313.
- Dominska M y Dykxhoorn DM. 2010. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J Cell Sci* 123(8): 1183-1189.
- Driks A. 2004. The *Bacillus* spore coat. *Phytopathology*, 94(11): 1249-1251.
- Dwivedi UN, Singh P, Pandey VP y Kumar A. 2011. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J Mol Catal B Enzym* 68(2): 117-128.
- Dubé E, Shareck F, Hurtubise Y, Daneault C y Beaugard M. 2008. Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. *Appl Microbiol Biotechnol* 79(4): 597-603.
- Eggert C, Temp U y Eriksson KE. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 62(4): 1151-1158.

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. *Microbiology* 148(6): 1767-1776.

Endo K, Hayashi Y, Hibi T, Hosono K, Beppu T y Ueda K. 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *J Biochem* 133(5): 671-677.

Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO y Carrondo MA. 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *J Biol Chem* 278(21): 19416-19425.

Faure D, Bouillant ML y Bally R. 1994. Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4T Tn5 mutants affected in melanization and laccase activity. *Appl Environ Microbiol* 60(9): 3413-3415.

Giardina P, Cannio R, Martirani L, Marzullo L, Palmieri G y Sannia G. 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 61(6): 2408-2413.

Giardina P, Aurilia V, Cannio R, Marzullo L, Amoresano A, Siciliano R y Sannia G. 1996. The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Eur J Biochem* 235(3): 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* 1. *Biochem J* 341: 655-663.

Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P, Bouillant ML y Bally R. 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol Lett* 108(2): 205-210.

Glazer AN y Nikaido H. 1995. *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. W. H. Freeman and Company. New York.

Guadarrama-Mendoza PC, Valencia del Toro G, Ramírez-Carrillo R, Robles-Martínez F, Yáñez-Fernández J, Garín-Aguilar ME, Hernández GC y Bravo-Villa G. 2014. Morphology and mycelial growth rate of *Pleurotus* spp. strains from the Mexican mixtec region. *Braz J Microbiol* 45(3): 861-872.

Guzmán G. 1990. Identificación de los hongos: comestibles, venenosos y alucinantes. Editorial Limusa-Noriega, México.

Guzmán G, Mata G, Salmenes D, Soto-Velazco C y Guzmán-Dávalos L. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales. Instituto Politécnico Nacional. México.

Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R y Hannon GJ. 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293(5532): 1146-1150.

Hatakka A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev* 13(2-3):125-135.

Hatakka AI, Lundell TK, Tervilä-Wilo AL y Brunow G. 1991. Metabolism of non-phenolic β -O-4 lignin model compounds by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Appl Microbiol Biotechnol* 36(2): 270-277.

Hattori M, Konishi H, Tamura Y, Konno K y Sogawa K. 2005. Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *J Insect Physiol* 51(12): 1359-1365.

Hattori M, Tsuchihara K, Noda H, Konishi H, Tamura Y, Shinoda T, Nakamura M y Hasegawa T. 2010. Molecular characterization and expression of laccase genes in the salivary glands of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: *Cicadellidae*). *Insect Biochem Mol Biol* 40(4): 331-338.

Hattori M, Komatsu S, Noda H y Matsumoto Y. 2015. Proteome analysis of watery saliva secreted by green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *PloS one*, 10(4): 1-18.

Hermann TE, Kurtz MB y Champe, SP. 1983. Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. J Bacteriol 154(2): 955-964.

Herrera T y Ulloa M. 1998. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. (2da.ed.) UNAM-Fondo de Cultura Económica. México DF.

Heydari R, Pourjam E y Goltapeh EM. 2006. Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in vitro. Plant Pathol J 5(2): 173-177.

Hullo MF, Moszer I, Danchin A y Martin-Verstraete I. 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. J Bacteriol 183(18): 5426-5430.

Jiménez LF y Merchant H. 2003. Biología celular y molecular. Pearson Educación, México.

Kafri R, Bar-Even A y Pilpel Y. 2005. Transcription control reprogramming in genetic backup circuits. Nature Genet 37(3): 295.

Kawai S, Umezawa T y Higuchi T. 1987. p-Benzoquinone monoketals, novel degradation products of β -O-4 lignin mode compounds by *Coriolus versicolor* and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett, 210(1): 61-65.

Koschorreck K, Richter SM, Ene AB, Roduner E, Schmid RD y Urlacher VB. 2008. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. Appl Microbiol Biotechnol 79(2): 217-224.

Kunamneni A, Camarero S, García-Burgos C, Plou FJ, Ballesteros A. y Alcalde M. 2008. Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. Microb Cell Fact 7(1): 32.

Kwok OCH, Plattner R, Weisleder D y Wicklow DT. 1992. A nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. J Chem Ecol 18(2): 127-136.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259): 680-685.

Larrondo LF, Salas, L, Melo F, Vicuña R y Cullen D. 2003. A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. *Appl Environ Microbiol* 69(10): 6257-6263.

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(1): 147-157.

Lee HC, Li L, Gu W, Xue Z, Crosthwaite SK, Pertsemlidis A, Lewis ZA, Freitag M, Selker EU, Mello CC y Liu Y. 2010. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Mol Cell* 38(6): 803–814.

Leonowicz A, Cho N, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A... y Rogalski, J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J Basic Microbiol* 41(3-4): 185-227.

Lettera V, Piscitelli A, Leo G, Birolo L, Pezzella C y Sannia G. 2010. Identification of a new member of *Pleurotus ostreatus* laccase family from mature fruiting body. *Fungal Biol* 114(9): 724-730.

Li K, Xu F y Eriksson LK. 1999. Comparison of fungal laccase and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Appl Environ Microbiol* 65(6): 2654-2660.

Machczynski MC, Vijgenboom E, Samyn B y Canters GW. 2004. Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Sci* 13(9): 2388-2397.

Madzak C, Otterbein L, Chamkha M, Moukha S, Asther M, Gaillardin C y Beckerich JM. 2005. Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 5(6-7): 635-646.

Maiti M, Lee HC y Liu Y. 2007. QIP, a putative exonuclease, interacts with the *Neurospora* Argonaute protein and facilitates conversion of duplex siRNA into single strands. *Genes Dev* 21(5): 590-600.

Mamiya Y, Hiratsuka M y Murata M. 2005. Ability of wood-decay fungi to prey on the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner) Nickle. Nematological Research (Jpn J Nematol) 35(1): 21-30.

Mansur M, Arias ME, Copa-Patiño JL, Flärdh M y González AE. 2003. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. Mycologia 95(6): 1013-1020.

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. Doctorado en Biotecnología. Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

Márquez-Araque AT, Mendoza GD, González SS Buntinx SE y Loera O. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp.* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. Interciencia, 32(11): 780-785.

Mayer AM y Staples RC. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry, 60(6): 551-565.

Molina-Guijarro JM, Pérez J, Muñoz-Dorado J, Guillén F, Moya R, Hernández M y Arias ME. 2009. Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. Int Microbiol 12:13-21

Moreno G. 1986. La guía de INCAFO de los hongos de la Península Ibérica. INCAFO. Madrid, España.

Muñoz C. 1995. Caracterización y purificación de las lacasas de *Pleurotus eryngii*. aplicaciones biotecnológicas en relación con la degradación de la lignina. Tesis. Universidad Alcalá de Henares. España.

Nagai M, Kawata M, Watanabe H, Ogawa M, Saito K, Takesawa T, Kanda K y Sato T. 2003. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and

characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology* 149(9): 2455-2462.

Nakamura K y Go N. 2005. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell Mol Life Sci* 62(18): 2050-2066.

Nasrin Z, Yoshikawa M, Nakamura Y, Begum S, Nakaba S, Uesugi M, Osakabe Y, Sonoki T, Sato K, Funada R, Limura Y, Katayama Y y Kajita S. 2010. Overexpression of a fungal laccase gene induces nondehiscent anthers and morphological changes in flowers of transgenic tobacco. *J Wood Sci* 56(6), 460-469.

Ohga S y Royse DJ. 2001. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. *FEMS Microbiol Lett* 201(1): 111-115.

Okamoto K, Ito Y, Shigematsu I, Yanagi SO y Yanase H. 2003. Cloning and characterization of a laccase gene from the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience*, 44(11): 11-17.

Palmieri G, Cennamo G, Faraco V, Amoresano A, Sannia G y Giardina P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microb Technol* 33(2): 220-230.

Peng M, Lemke PA y Shaw JJ. 1993. Improved conditions for protoplast formation and transformation of *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 40(1): 101-106.

Pérez M. 2002. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* (Jacq:Fr.) P. Kumm. Y *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Singer, a partir del crecimiento miceliar en viruta de pino y obtención de nuevas cepas por entrecruzamiento: comparación de la producción de carpóforos. Universidad Veracruzana. Instituto de Genética Forestal.

Pérez G, Pangilinan J, Pisabarro AG y Ramírez L. 2009. Telomere organization in the ligninolytic basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 75(5): 1427-1436.

Pezzella C, Autore F, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G y Faraco V. 2009. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Curr Genet* 55(1): 45-57.

Pezzella C, Lettera V, Piscitelli A, Giardina P, y Sannia G. 2013. Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(2): 705-717.

Piontek K, Antorini M y Choinowski T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem* 277(40): 37663-37669.

Piscitelli A, Giardina P, Mazzoni C y Sannia G. 2005. Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69(4): 428-439.

Pourcel L, Routaboul JM, Kerhoas L, Caboche M, Lepiniec L y Debeaujon I. 2005. Transparent testa10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell*, 17(11): 2966-2980.

Quiroz A. 2014. Generación del vector de silenciamiento para genes que codifican para lacasas de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Ramírez L, Oguiza JA, Pérez G, Lavín JL, Omarini A, Santoyo F, Alfaro M, Castanera R, Parenti A, Muguerza E y Pisabarro, AG. 2011. Genomics and transcriptomics characterization of genes expressed during postharvest at 4 °C by the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Int Microbiol* 14(2): 111-120.

Reiss R, Ihssen J y Thony-Meyer L. 2011. *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnol* 11(1): 9.

Rodríguez-Rincón F. 2006. Análisis molecular de la lacasa de *Phanerochaete flavido-alba*: Caracterización del gen y regulación por fenoles y metales. Tesis doctoral. Universidad de Granada, España.

- Rubilar O, Elgueta S, Tortella G, Gianfreda L y Diez MC. 2009. Pelletization of *Anthracophyllum discolor* for water and soil treatment contaminated with organic pollutants. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal* 9(3): 161-175.
- Rühl M, Majcherczyk A y Kües U. 2013. Lcc1 and Lcc5 are the main laccases secreted in liquid cultures of *Coprinopsis cinerea* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 103(5): 1029-1039.
- Ruijsenaars HJ y Hartmans S. 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 65(2): 177-182.
- Salame TM, Yarden O y Hadar Y. 2010. *Pleurotus ostreatus* manganese-dependent peroxidase silencing impairs decolourization of Orange II. *Microb Biotechnol* 3(1): 93-106.
- Salame TM, Ziv C, Hadar Y y Yarden O. 2011. RNAi as a potential tool for biotechnological applications in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 89(3): 501-512.
- Sapmak A, Boyce KJ, Andrianopoulos A y Vanittanakom N. 2015. The pbrB Gene Encodes a Laccase Required for DHN-Melanin Synthesis in Conidia of *Talaromyces (Penicillium) marneffeii*. *PloS one*, 1-16.
- Schmidt FR. 2005. About the nature of RNA interference. *Appl Microbiol Biotechnol* 67(4): 429-435.
- Sharma KK, Kuhad RC. 2009. An evidence of laccases in archaea. *Indian J Microbiol* 49(2): 142-150.
- Sierra JA. 2014. Evaluación de la acción nematocida *in vitro* e *in vivo* de especies de *Pleurotus* spp., sobre los nematodos *Meloidogyne* spp. y *Radopholus* spp. asociados a los cultivos de tomate y plátano. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira.
- Solomon EI, Sundaram UM y Machonkin TE. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev* 96(7): 2563-2606.
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ y Joshua-Tor L. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305(5689): 1434-1437.

- Sun S.J, Liu J.Z, Hu KH y Zhu H.X. 2011. The level of secreted laccase activity in the edible fungi and their growing cycles are closely related. *Curr Microbiol* 62(3): 871-875.
- Suzuki T, Endo K, Ito M, Tsujibo H, Miyamoto K y Inamori Y. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci Biotechnol Biochem* 67(10): 2167-2175.
- Temp U y Eggert C. 1999. Novel interaction between laccase and cellobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungi *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol* 65(2): 389-395.
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140(1): 19-26.
- Truong BN, Suzuki A, Okazaki K, Fukiharu T, Takeuchi Y, Futai K y Le XT. 2007. Characterization of the nematocidal toxocyst in *Pleurotus* subgen. *Coremiopleurotus*. *Mycoscience* 48(4): 222-230.
- Uthandi S, Saad B, Humbard MA y Maupin-Furlow JA. 2010. LccA, an archaeal laccase secreted as a highly stable glycoprotein into the extracellular medium by *Haloferax volcanii*. *Appl Environ Microbiol* 76(3): 733-743.
- Viswanath B, Rajesh B, Janardhan A, Kumar AP y Narasimha G. 2014. Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme res* 2014. Article ID 163242, 21 p.
- Walker JR y Ferrar PH. 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnol Genet Eng* 15(1), 457-498.
- Wang HX y Ng TB. 2006. Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69(5): 521-525.
- Weld RJ, Plummer KM, Carpenter MA y Ridgway HJ. 2006. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Res* 16(1): 31-44.
- Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5(3): 218-223.

- Wong JH, Ng TB, Jiang Y, Liu F, Cho S, Sze W y Zhang KY. 2010. Purification and characterization of a laccase with inhibitory activity toward HIV-1 reverse transcriptase and tumor cells from an edible mushroom (*Pleurotus cornucopiae*). *Protein Pept Lett* 17(8): 1040-1047.
- Wood DA. 1980. Inactivation of extracellular laccase during fruiting of *Agaricus bisporus*. *J Gen Microbiol* 117: 339-345.
- Xu F. 1999. Laccase, In Flickinger MC y Drew SW. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, Bioseparation*, John Wiley & Sons Inc., New York. 1545-1554.
- Yaropolov AI, Skorobogatko OV, Vartanov SS y Varfolomeyev SD. 1994. Laccase-properties, catalytic mechanism and applicability. *Appl Biochem Biotechnol* 49(3): 257-280.
- Yatsu J y Asano T. 2009. Cuticle laccase of the silkworm, *Bombyx mori*: purification, gene identification and presence of its inactive precursor in the cuticle. *Insect Biochem Mol Biol* 39(4): 254-262.
- Zhao J y Kwan HS. 1999. Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Appl Environ Microbiol* 65(11): 4908-4913.

11. PUBLICACIONES

Medellín - Colombia, 2014



VIII Congreso Latinoamericano de Micología / RESUMENES Presentaciones orales (Oral presentations)(Po)

Po 2.2

Construcción de un vector de silenciamiento para genes de lacasa en *Pleurotus ostreatus*

Anahí Armas-Tizapantzi¹, Altayra Quiroz-Lucas¹, Jaime Marcial-Quino², Arturo Estrada-Torres³, Alba M. Montiel-González^{3,*}

¹Posgrado en Ciencias Biológicas. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Km 1,5 carretera Tlaxcala-Puebla. C. P. 90070. Tlaxcala, Tlax. México. ²Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Sur 3700, Col. Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, D. F. México. C. P. 04530. ³Centro de Investigación en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Km 10,5 autopista San Martín Texmelucan-Tlaxcala, San Felipe Ixtacuixtla, C. P. 90120. Tlaxcala, México. Correo electrónico: * <amonicmg@yahoo.com>.

Pleurotus ostreatus es un hongo saprófito cuyo cultivo sobre sustratos lignocelulósicos, como pajas de cereales, entre otros residuos del tipo agroindustrial, se atribuye a la producción de enzimas lacasas, que forman parte del complejo enzimático capaz de degradar lignina y que son de gran interés para diversas aplicaciones biotecnológicas. A las lacasas se les ha relacionado con la morfogénesis, la pigmentación de los conidios, la formación de rizomorfos y el desarrollo de cuerpos fructíferos en gran diversidad de especies fúngicas, sin embargo, algunas de estas funciones no se han comprobado de manera contundente. Una alternativa para estudiar la participación fisiológica de estas enzimas en el hongo es la utilización de lo que se conoce como genética funcional, que consiste en lesionar o abatir la expresión de una proteína para evaluar los efectos que esto tiene sobre el organismo. Para ello es necesario contar con vectores que permitan la integración del ADN de interés en los organismos. Por este motivo, en el presente estudio se construyó un vector de silenciamiento para genes de lacasas que pueda ser utilizado para abatir su expresión y permita verificar posteriormente su participación en la fisiología de *P. ostreatus*. El vector de silenciamiento obtenido contiene dos promotores *Pgpd* y *Ppki*, colocados en sentido opuesto y enfrentados, separados por un sitio de restricción *NcoI*, útil para la integración del fragmento de interés, y un gen de resistencia a fleomicina como marcador de selección en hongos. El fragmento de genes para lacasas tiene un tamaño de 318 pb, seleccionado mediante el alineamiento de secuencias de ARN de genes de lacasas de varios hongos, diseñado con extremos que contienen la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *NcoI*. Posteriormente a la digestión del vector y fragmento con *NcoI*, se realizó la ligación utilizando ligasa T4, cada paso fue confirmado por electroforesis en geles de agarosa. Como resultado se generó el plásmido pRNAi-LAC, con un tamaño de 6300 pb. El silenciamiento de genes de lacasa en *P. ostreatus* permitirá estudiar la función de las enzimas lacasas sobre su desarrollo y morfología.

Palabras clave: genética funcional, enzimas, plásmidos, ARNi





CAMBIOS MICROMORFOLÓGICOS MICELIALES Y DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN MUTANTES DE *PLEUROTUS OSTREATUS* TRANSFORMADAS CON UN VECTOR DE SILENCIAMIENTO PARA LACASAS

Anahí Armas-Tizapantzi¹, Francisco J. Fernández Perrino², Jaime Marcial-Quino³, Arturo Estrada-Torres^{1,4}, Alba M. Montiel-González^{1,4}.

¹Universidad Autónoma de Tlaxcala. Doctorado en Ciencias Biológicas. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. C.P. 90070, Tlaxcala, México.

²Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Departamento de Biotecnología. C.P. 09340. Iztapalapa, D.F. México.

³Instituto Nacional de Pediatría. C.P. 04530. Coyoacán, D.F. México.

⁴Universidad Autónoma de Tlaxcala. Centro de Investigación en Ciencias Biológicas. C.P. 90120. Tlaxcala, México. amonicamg@yahoo.com

Palabras clave: *Pleurotus*, lacasas, silenciamiento.

Introducción. *Pleurotus ostreatus* es un hongo saprófito que crece sobre sustratos lignocelulósicos gracias a su complejo enzimático encargado de la degradación de la lignina, el cual incluye a las lacasas. En trabajos de producción de lacasas, se ha expuesto la necesidad de conocer su participación fisiológica dentro de *Pleurotus ostreatus* con el fin de redirigir las estrategias y mejorar dicha producción (1). En diversas especies fúngicas, las lacasas se han relacionado con pigmentación de conidios, formación de rizomorfos, esporulación, desarrollo de cuerpos fructíferos, producción de pigmentos y patogénesis de plantas (2,3), sin embargo, dichas funciones no han sido comprobadas. El estudio de esta participación puede realizarse a través del uso de la genética funcional, específicamente, del silenciamiento génico, que permite sólo abatir la expresión de una proteína y evaluar los cambios fenotípicos derivados de la interferencia del ARN durante su traducción.

Este trabajo pretende determinar los cambios micromorfológicos y de actividad enzimática en colonias mutantes de *Pleurotus ostreatus* transformadas con un vector de silenciamiento para lacasas.

Metodología. Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* PoB. Se obtuvieron protoplastos a partir de cultivo líquido compuesto por extracto de levadura, extracto de malta, glucosa y sacarosa como estabilizador osmótico, adicionado con 10mg/ml de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*. Posteriormente fueron transformados con el vector de silenciamiento para genes de lacasa pRNAi-LAC, en un electroporador Gene Pulser Xcell™ (BioRad). Las mutantes se seleccionaron en medios con Fleomicina y 2-6-dimetoxifenol (DMP). La morfología de las hifas se observó con un microscopio Zeiss con contraste interferencial de Nomarski. Se evaluaron la actividad lacasa y el número de isoenzimas, usando DMP como sustrato, por espectrofotometría y mediante la técnica modificada de SDS-PAGE, respectivamente.

Resultados. En la figura 1 se pueden observar hifas birrefringentes en las mutantes obtenidas ausentes en

las hifas de la cepa nativa, lo que indica cambios en el contenido citoplasmático.

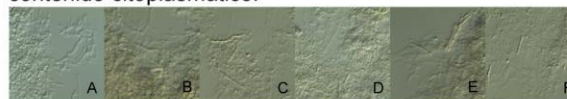


Fig. 1. Morfología de las hifas de las colonias nativas A) y 5 mutantes B), C), D), E) y F).

Se observa una variación bidireccional en la actividad de lacasas en las mutantes, sugiriendo la aparición de mecanismos de compensación. Los perfiles zimográficos de la mayoría de ellas, en donde se observa la aparición de otras isoenzimas, aunque con actividad atenuada (figura 2), refuerzan esta posibilidad.

Tabla 1. Actividad lacasa en U/L usando DMP como sustrato.

Cepa	A	B	C	D	E	F
Actividad lacasa (U/L)	5.06 ±	8.29 ±	6.4 ±	3.93±	1.86±	11.11±

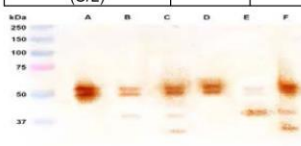


Fig. 2. Perfil zimográfico de isoenzimas de lacasa en la cepa nativa A) y mutantes B), C), D), E) y F).

Conclusiones. Se observaron cambios en el contenido citoplasmático en las colonias mutantes, sugiriendo la acumulación aparente de alguna sustancia. Hubo cambios en la actividad y perfil de isoenzimas. En varias colonias se abatió la actividad lacasa, mientras que la aparición de nuevas isoenzimas puede sugerir que es importante compensar la actividad perdida, lo que, probablemente, puede conseguirse expresando enzimas diferentes que oxiden DMP.

Agradecimiento. Al fondo de Ciencia Básica SEP-CONACyT a través del financiamiento del proyecto 167759.

Bibliografía.

- Salame TM, Ziv O, Hadar Y y Yarden O. (2011). *Appl. Microbiol Biotechnol.* 89:501–512.
- Thurston CF. (1994). *Microbiol* 140: 19-26.
- Mansur M, Suárez T, Fernández-Larrea J, Brisuela M y González A. (1997). *Appl Environ Microbiol* 63: 2637-2646.



British Mycological
Society promoting fungal science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fbr



Review

RNAi silencing: A tool for functional genomics research on fungi



Anahi ARMAS-TIZAPANTZI^{a,b}, Alba Mónica MONTIEL-GONZÁLEZ^{a,*}

^aLaboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 90120 Tlaxcala, Mexico

^bDoctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 90120 Tlaxcala, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2016

Received in revised form

27 May 2016

Accepted 31 May 2016

Keywords:

Functional genomics

Quelling

RNAi

Silencing in fungi

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) is a mechanism of post-transcriptional gene silencing which is triggered by the presence of double stranded RNA molecules homologous to a gene, resulting in degradation of the messenger RNA produced attenuating thereby the target gene expression, as a mechanism of regulation of gene expression. The potential use of this mechanism in several areas of life sciences is tangible. In the case of biotechnology, the use of fungi as production models of human interest compounds, invites studies on the mechanisms of regulation of gene expression, for the better use of its qualities. This review tries to concentrate most of the existing information about the mechanism and components that direct the silencing, using RNAi to fungus as a model organism. Also, it was included available information about the role of RNAi in organisms that contain it. Strategies that have been developed as tools for the study of gene function using the RNAi mechanism are mentioned, too. Finally, some of the research in fungi where RNAi silencing has been used to assess gene function is included.

© 2016 British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

RNA silencing, also known as RNA interference (RNAi) or gene silencing in eukaryotes is a conserved mechanism where small double stranded RNA (siRNA) molecules are involved in regulating the gene expression of a target gene. This mechanism was first observed in 1990 in petunia plants, when trying to over-express the enzyme chalcone synthase (CHS), a key enzyme in the anthocyanin pathway that produces a purple pigment in these plants. In this study, an additional copy of the CHS gene was introduced into the genome of petunias with the expectation that over-expression of CHS would

produce a more intense purple color. However, only white petunias were observed, with white patches or pale flowers (Napoli et al., 1990; Van der Krol et al., 1990). This finding suggested to the authors that the overexpression of the transferred gene (transgene) caused both the introduced gene, and their endogenous counterparts to be suppressed. This process was therefore called "co-suppression" or post-transcriptional gene silencing (PTGS) of the endogenous CHS gene.

The first report of RNA silencing in fungi was released by Romano and Macino in 1992, where they worked with two genes; albino -1 and albino -3 (al-1, and al-3), encoding

* Corresponding author. Tel./fax: +52 248 48 154 82.

E-mail address: amonicamp@yahoo.com (A. M. Montiel-González).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.003>

1749-4613/© 2016 British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.



Gene Regulation, Epigenetics and Functional Genomics

1. Effect of decreased of laccase activity on micelial morphology and growth rate of *Pleurotus ostreatus* PoB transformants

Anahí Armas-Tizapantzi, Francisco J. Fernández-Perrino, Jaime Marcial-Quino, Arturo Estrada-Torres, Alba Mónica Montiel-González*

Universidad Autónoma de Tlaxcala, Doctorado en Ciencias Biológicas.

*Universidad Autónoma de Tlaxcala. Campus Ixtacuixtla. Km. 10.5 autopista San Martín Texmelucan-Tlaxcala, San Felipe Ixtacuixtla. C.P. 90120. Tlaxcala, México. Tel. 012484815500. amonicamg@yahoo.com

Pleurotus ostreatus is a saprotroph fungus capable of growth on various lignocellulosic substrates due to that it produced an extracellular enzymatic complex in charge of lignin degrading, which laccases are included. These enzymes have several applications in biotechnological and industrial field, so its production has been widely studied. At a biological level, they have been assigned different functions between the principals are their participation in complex carbon source assimilation, nevertheless, multiples isoforms production on cultures with glucose as carbon source, does not agree with this assessment. Therefore, it is has been suggested that their physiological participation can be distinct. A strategy for the study of the physiological role that enzymes can exert into the organism, is based on the gene regulation mechanism, way interference RNA (iRNA), which provides the possibility of abate the expression of a target gen at different levels and subsequently evaluate the changes on the phenotype obtained, providing data about their real function. In this sense, the aim of present research was to generate transformant strains of *P. ostreatus*, using the strategy of iRNA, in order to abate the laccase genes expression and be able to observe the manifest changes in the macro and microscopic phenotype that shown the strains during their vegetative growth on solid medium with agar, as well as the rate growth average changes and biomass generation, having as referent the fungus without transforming. The *P. ostreatus* PoB transformation was carried out with the laccases silencing vector pRNAi-LAC. Four transformant strains, with different affectation levels of their extracellular laccases production, were selected. Affectation was determinate through of their qualitative ability to form oxidation halos whit 2,6-dimethoxyphenol and it was characterized the extracellular laccase activity and the isoenzymes number. The cultivation of each strain was characterized in respect to the macro and microscopic morphology of their mycelial growth, the average growth rate and the biomass production. It was observed in the transformant strains that, as it increases its level of involvement, they shown changes in the mycelial from during the culture and decreased the average growth rate and biomass, with regarded the same parameters in the reference strain. These results suggested a possible participation of the laccases on the development of mycelium of *P. ostreatus*.

Palabras clave: Función fisiológica, hongos, RNAi