



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Identificación molecular de la cepa HEMIM 51 utilizando como marcador molecular el gen lacasas**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**B I O L O G O**  
**P R E S E N T A:**  
**MARIA LUISA MONTAÑO MORALES**

**DIRECTORA DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**FEBRERO, 2021**

## ÍNDICE

ABREVIATURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

RESUMEN

1.	INTRODUCCIÓN .....	10
1.1.	BASIDIOMICETOS .....	10
1.2.	HONGOS DE LA PUDRICION BLANCA.....	11
2.	ANTECEDENTES.....	12
2.1.	CARÁCTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>Pycnoporus</i> .....	12
2.2.	DISTRIBUCION DE <i>Pycnoporus</i> .....	13
2.3.	USOS DE <i>Pycnoporus</i> .....	15
2.4.	METABOLITOS SECUNDARIOS .....	16
2.5.	MORFOLOGÍA <i>Pycnoporus</i> .....	17
2.5.1.	HIFAS .....	18
2.5.2.	MORFOLOGÍA DEL CUERPO FRUCTÍFERO .....	19
2.6.	LACASAS .....	20
2.6.1.	CLASIFICACION DE LAS MULTICOBRE OXIDASAS .....	21
2.6.2.	PROPIEDADES MOLECULARES DE LAS LACASAS .....	21
2.6.3.	ESTRUCTURA DE LAS LACASAS.....	22
2.6.4.	APLICACIONES .....	23
2.7.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR .....	25
2.7.1.	ITS y 5.8S .....	26
3.	JUSTIFICACIÓN.....	29
4.	HIPOTESIS .....	30
5.	OBJETIVOS.....	30
5.1.	OBJETIVO GENERAL .....	30
5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
6.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
6.1.	MATERIAL BIOLÓGICO .....	30
6.2.	MEDIOS DE CULTIVO.....	30
6.3.	OBTENCION DEL MICELIO .....	30
6.4.	EXTRACCION DE ADN .....	31
6.5.	AMPLIFICACIÓN.....	32
6.6.	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA .....	32
6.7.	PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR.....	33
6.8.	SECUENCIACIÓN.....	33
6.9.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO .....	33
6.10.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....	34
7.	RESULTADOS .....	34
7.1.	EXTRACCIÓN DE ADN CEPA 51 .....	34
7.2.	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA .....	35
7.3.	CUANTIFICACIÓN DE ADN .....	36
7.4.	AMPLIFICACION DEL GEN LACASAS.....	36

7.4.1.	FRAGMENTO 1 <i>lac 1</i> .....	38
7.4.2.	FRAGMENTO 2 <i>lac 1</i> .....	39
7.4.3.	FRAGMENTO 3 <i>lac 1</i> .....	40
7.5.	ANALISIS BIOINFORMATICO .....	41
7.5.1.	FRAGMENTO 1 <i>lac 1</i> .....	41
7.5.2.	FRAGMENTO 2 <i>lac 1</i> .....	42
7.5.3.	FRAGMENTO 3 <i>lac 1</i> .....	43
7.6.	ANALISIS FILOGENETICO .....	43
8.	DISCUSIÓN.....	45
9.	CONCLUSIÓN .....	46
10.	PERSPECTIVAS .....	46
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	47

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
ARN	Ácido ribonucleico
CEIB	Centro de investigación en Biotecnología
CIB	Centro de investigaciones biológicas
HEMIM	Herbario Micológico de Morelos
HPB	Hongos de la podredumbre blanca
ITS	Espaciador transcrito interno (Internal transcribed spacer)
LiP	Lignino peroxidasa
MCO	Multicobre oxidasas
ml	mililitro
µl	microlitro
MgCl <sub>2</sub>	Dicloruro de magnesio
MnP	Manganeso peroxidasa
ng	nanogramo
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
RAPD's	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
spp.	Varias especies del mismo género
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TM	temperatura de deshibridación
UV	Ultravioleta

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hongos de la podredumbre blanca	9
Figura 2. Madera en diferentes estados de pudrición	10
Figura 3. Pigmentos característicos de <i>Pycnoporus</i>	11
Figura 4. Distribución del género <i>Pycnoporus</i>	12
Figura 5. Cuerpo fructífero de <i>Pycnoporus</i>	15
Figura 6. Representación de los colores de Munsell	16
Figura 7. Diferentes tipos de hifas	17
Figura 8. Píleo e himenoforo de <i>P. sanguineus</i> , <i>P. cinnabarinus</i> , <i>P. coccineus</i> y <i>P. puniceus</i>	18
Figura 9. Estructura cristalina de la lacasa de <i>P. sanguineus</i>	21
Figura 10. Representación esquemática de las regiones estudiadas del ADNr y los diferentes oligonucleótidos	24
Figura 11. Árbol filogenético en base a las secuencias de ITS de la cepa HEMIM-51	26
Figura 12. Árbol filogenético en base a las secuencias de $\beta$ -tubulina de la cepa HEMIM-51	27
Figura 13. Ingredientes del medio de cultivo HIT	29
Figura 14. Tubos eppendorf con ADN extraído de la cepa HEMIM-51	32
Figura 15. Gel de agarosa de la extracción de ADN de la cepa HEMIM-51	33
Figura 16. Gel de agarosa de la amplificación del fragmento 1	36
Figura 17. Gel de agarosa de la amplificación del fragmento 2	37
Figura 18. Gel de agarosa del producto de purificación del fragmento 2	37
Figura 19. Gel de agarosa con amplificación de 250pb	39
Figura 20. BLAST alineación de la secuencia del fragmento 1	39
Figura 21. BLAST alineamiento de la secuencia del fragmento 2	39

Figura 22. Construcción del árbol filogenético del fragmento 1 del gen lacasas *lac1* (o *lcc3-1*) de la cepa HEMIM 51

Figura 23. Construcción del árbol filogenético del fragmento 2 del gen lacasas *lac1* (o *lcc3-1*) de la cepa HEMIM 51

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos presentes en <i>Pycnoporus spp.</i>	14
Tabla 2. Superfamilias de las MCO	19
Tabla 3. Cantidades para el medio de cultivo HIT	
Tabla 4. Oligonucleótidos para el gen de las lacasas	30
Tabla 5. Cuantificación de muestras de extracción de ADN de la cepa HEMIM-51	33
Tabla 6. Cantidades utilizadas para la amplificación del gen de las lacasas	34
Tabla 7. Condiciones para la amplificación del fragmento 1	34
Tabla 8. Condiciones para la amplificación del fragmento 2	35
Tabla 9. Condiciones para la amplificación del fragmento 3	35
Tabla 10. Oligo FL4 rediseñado y sus características	38

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a la Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal por haberme permitido formar parte de LEFIP en el Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM y por todo su apoyo y dirección en mi proyecto de tesis, también quiero agradecer a cada uno de mis sinodales, Dra. Ma. De Lourdes Acosta Urdapilleta, Dr. Gerardo Díaz Godínez, M. en C. María Luisa Barroso García y M. en B. Mariel Adame Román, cada uno me apporto grandes conocimientos y los admiro y respeto. A mis compañeros de laboratorio Liz, Moni, Dani, Chivis, Naye, Eli, Mariel por haberme ayudado con su experiencia y transmitirme distintos conocimientos.

## **Dedicatoria**

Quiero dedicar esta tesis a mi hija, mi más grande amor, Rebeca, gracias mi amor, esta tesis es para ti, solo tu papá, tu y yo sabemos los sacrificios que esto nos costó, quiero decirte que te amo y eres mi más grande motor en la vida, todo en lo que te esfuerces lo puedes conseguir.

También quiero dedicar esta tesis a mi compañero de vida Damián, ya que juntos hemos logrado esto y a su lado este camino fue más bonito.

A mi papá José Alfredo que nunca dudo en apoyarme con mis estudios y que siempre me da las palabras correctas y me enseña que el que persevera alcanza. A mi mamita Shani, también esta tesis es gracias a ti que nunca nos dejaste de alentar y apoyar, a mi hermanita Lu por su amor y apoyo incondicional. A mí cuñada Guadalupe que siempre nos ayudó cuidando con todo el amor a mi hija mientras teníamos que irnos al laboratorio.



## Resumen

*Pycnoporus* es un género de hongo basidiomiceto que se encuentra estrechamente relacionado con *Trametes*, siendo morfológicamente similar. Pero contrario a este, las especies de *Pycnoporus* tienen un color intenso rojo-anaranjado (Ryvarden, 1991; Ryvarden y Gilbertson, 1994). Habitualmente la identificación de las especies se basa en sus características morfológicas macro y micro, así como en su distribución geográfica en el mundo (Noble y Frew, 1962), sin embargo la separación entre especies de *Pycnoporus*, es decir, *P. sanguineus*, *P. cinnabarinus*, *P. coccineus* y *P. puniceus* sigue siendo difícil, sobre todo a nivel morfológico macroscópico porque las características que presentan son muy similares (Lesage-Meessen *et al.*, 2011). La identificación por medio de técnicas moleculares de genes que comprenden secuencias ITS del ADN ribosómico,  $\beta$ -tubulina y enzimas como ARN polimerasa, celobiohidrolasa-C, topoisomerasa II y manganeso peroxidasa, lacasas y otras se han utilizado con cepas del género *Pycnoporus* para construir relaciones filogenéticas y biogeográfica (Thon y Roys, 1999; Lomascolo *et al.*, 2002; Eggert *et al.*, 1998, Lesage-Meessen *et al.*, 2011). En este trabajo se realizó la amplificación por PCR de los primeros dos fragmentos de ADN de la cepa HEMIM-51 usando oligonucleótidos degenerados para el gen Lac (Coronel, 2019) y a través de un análisis bioinformático se identificó como *Pycnoporus sanguineus* sin embargo, del tercer fragmento no se logró amplificar completo, y lo que se obtuvo al amplificar no se parece a ningún *Pycnoporus* en la base de datos del NCBI, por lo cual aún no se puede afirmar en su totalidad que la cepa HEMIM-51 sea *P. sanguineus*.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. BASIDIOMICETOS

Los basidiomicetos son un grupo de gran importancia entre los hongos, pues tienen esencial participación en la naturaleza por la versatilidad de las especies que lo constituyen. Pertenecen al reino fungi, dominio Eukarya, son un grupo muy diverso, existen más de 30,000 especies descritas (Kirk *et al.*, 2001). Muchas de las especies de este grupo son microscópicas y otras más son macroscópicas y las podemos encontrar en la naturaleza de diversas formas (Cappello, 2006). Los caracterizan los basidios que son órganos que producen las basidiosporas. En este fílum encontramos a la mayoría de los hongos comestibles (Sánchez y Royse, 2001), cuya producción en la actualidad se ha estimado aproximadamente en 47,500 toneladas anuales, incluyendo el champiñón (*Agaricus*: 95.3%), las setas (*Pleurotus*: 4.6%) y el shiitake (*Lentinula*: 0.1%). Su valor económico supera los 200 millones de dólares anuales generando alrededor de 25,000 empleos directo e indirectos en todo el mundo (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

El ciclo vital de un basidiomiceto típico es simple. Empezando porque las basidiosporas (haploides) germinen y den lugar a un micelio primario, monocariótico. Esta fase suele ser corta, ya que pronto ocurre la somatogamia fusión de hifas y se obtiene un micelio secundario, dicariótico, que crece mediante fíbulas. Este micelio es el más abundante en la naturaleza. En algunos casos de hongos micorrizógenos, puede ocupar varias hectáreas, pesar bastantes toneladas y tener una edad de varios milenios. Los septos son complejos ya que presentan un poro central rodeado de una serie de membranas. En ocasiones, el micelio puede formar cordones o ser rizomorfo. También se dan casos en que el micelio es un diploide estable, como en el género *Armillaria*, sin embargo, lo más típico es la reproducción sexual (aunque existen especies que no la presentan). El micelio secundario puede agruparse en “tejidos” especializados (plecténquima), aún dicariótico, y el micelio se denomina entonces terciario. Da lugar a cuerpos fructíferos, los basidiocarpos algunos de los cuales son bastante grandes, hermosos y comestibles: las conocidas setas o sombreros. Dentro de este grupo de hongos se encuentra el género *Pycnoporus* capaz de degradar eficientemente la lignina y desempeñar un papel muy importante en el ciclo del carbono (Eriksson *et al.*, 2001).

## 1.2. HONGOS DE LA PUDRICION BLANCA

Los hongos de la podredumbre blanca (HPB), se caracterizan por poseer un complejo enzimático, que les permite degradar un extenso número de compuestos orgánicos recalcitrantes, Las enzimas que componen dicho sistema son de tipo oxidasas; dentro de ellas, las más destacadas son las lacasas, la ligninoperoxidasa (LiP), la manganeso peroxidasa (MnP); éstas dos últimas dependientes de peróxido de hidrógeno (Robinson *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2009), que les permiten realizar la degradación de compuestos como la lignina. Este polímero está presente en las plantas terrestres y les da la rigidez estructural necesaria para la colonización del ambiente terrestre (Fengel, D., 1971; Ewbank *et al.*, 1996). Se estima que aproximadamente se producen anualmente en el planeta 4,000,000,000 toneladas de celulosa y  $0.8 \times 10^9$  toneladas de lignina, sin embargo estos polímeros no se acumulan en la tierra debido a que hongos y bacterias, degradan eficientemente la biomasa vegetal hasta otros compuestos de carbono que pueden ser usados por otras especies e incluso los humanos. La degradación de la biomasa vegetal es un proceso complejo que involucra la acción sinérgica de un gran número de enzimas extracelulares como las presentes en los HPB (Aro *et al.*, 2005)

Algunos ejemplos de HPB son los géneros *Trametes* y *Pycnoporus* que se muestran en la Figura 1, como se observa no se parecen en el color ni en el grosor del cuerpo fructífero, pero son hongos en forma de abanico sin un estípote bien definido, es decir se confunde con el cuerpo fructífero. (Carbajo, 2015). Dentro de los hongos de la podredumbre blanca *Pycnoporus* es uno de los hongos saprofitos más reconocidos, ya que tiene un alto potencial lignocelulolítico, causando el deterioro de la madera debido a las enzimas lignocelulósicas que producen como se muestra en la Figura 2 (Alexopoulos *et al.*, 1996).



Figura 1. Hongos de la podredumbre blanca, a la izquierda *Trametes versicolor* (Polarconchaires, 2018), a la derecha *Pycnoporus coccineus* (Wacaser, 2018)

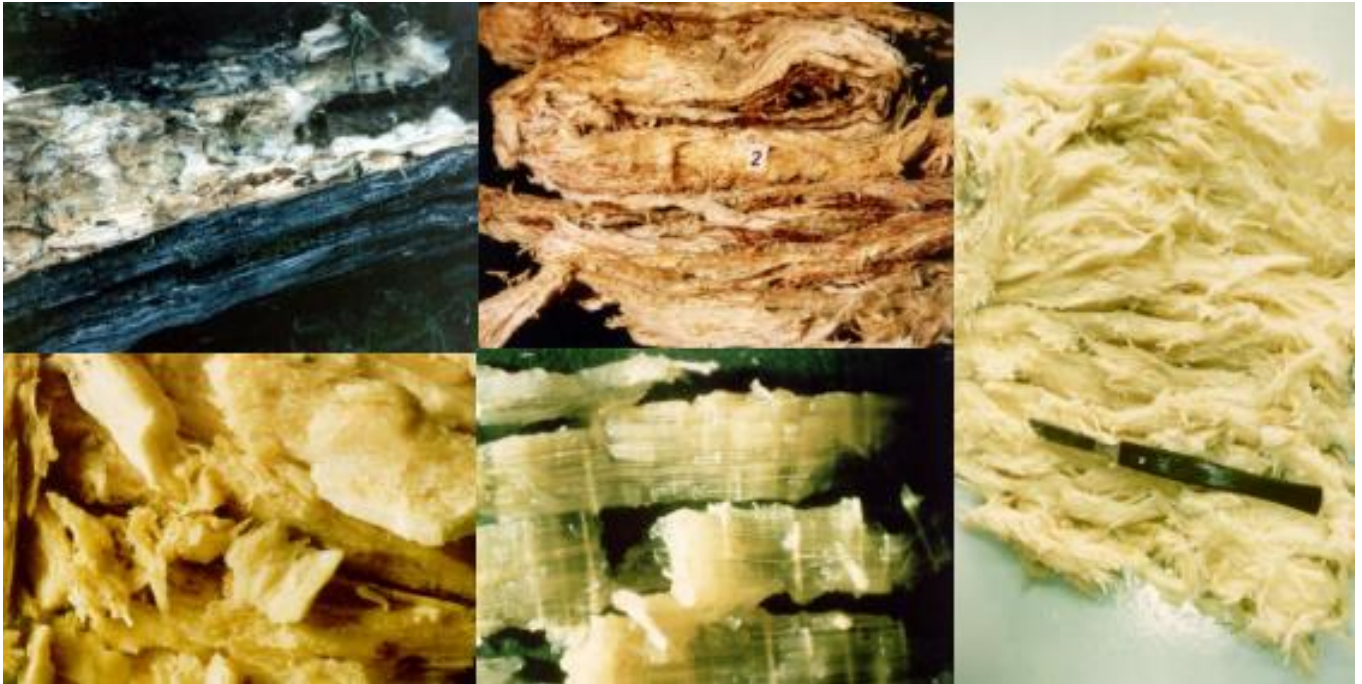


Figura 2. Madera en diferentes estados de pudrición originada por HPB (Carbajo, 2015).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. CARÁCTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Pycnoporus*

El género *Pycnoporus* comprende varias especies de hongos macromicetos, las cuatro especies más representativas de este son: *P. cinnabarinus*, *P. puniceus*, *P. sanguineus* y *P. coccineus*. (Lomascolo *et al.*, 2011) (Ryvarden y Johansen, 1991). *Pycnoporus* crece sobre diversos tipos de madera de árboles caídos. Los pigmentos rojos o anaranjados característicos de los cuerpos fructíferos o basidiocarpos de este hongo (Figura 3), son la cinabarina, el ácido cinabarínico y la tramesanguina, derivados de Fenoxazinona (Eggert *et al.*, 1996). El tamaño, forma y color de este hongo pueden variar dependiendo la especie, su edad, los nutrientes o el sustrato en el que crece y la época del año en que se colectan, por lo que no son parámetros definitivos para la identificación de especies son solo una guía. Otros parámetros importantes en la morfología microscópica son la forma y tamaño de la espora, los túbulos, el grosor del contexto y el tipo de hifas que forman (Díaz, 2010, Perner, 2018).

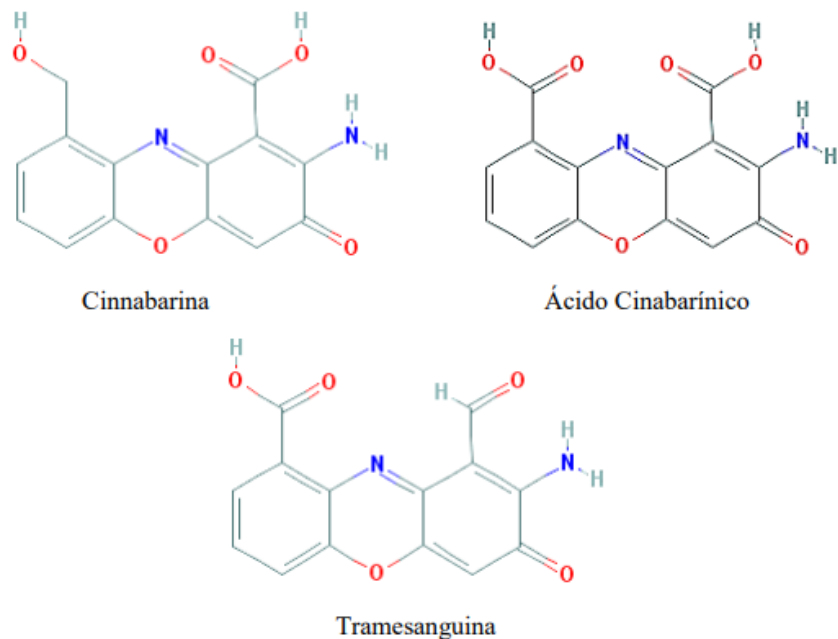


Figura 3. Pigmentos característicos de *Pycnoporus* (cinnabarina, ácido cinabárínico y tramesanguina) (Gill *et al.*, 1987)

## 2.2. DISTRIBUCION DE *Pycnoporus*

La distribución de *Pycnoporus* es mundial, se puede encontrar en zonas tropicales, subtropicales y zonas templadas, por lo cual se le conoce como un hongo cosmopolita (Pavlich 1976). Su distribución en México es muy extensa, abarcando los estados de Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Nayarit, Guadalajara, Colima, Guanajuato, Morelos, Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán (Figura 4). Para el estado de Morelos ha sido reportada en los municipios de Hiutzilac, Yautepec, Jiutepec, Cuernavaca, Temixco, Tetela, Zacatepec, Jojutla y Tlalquitenango (Diaz, 2013).

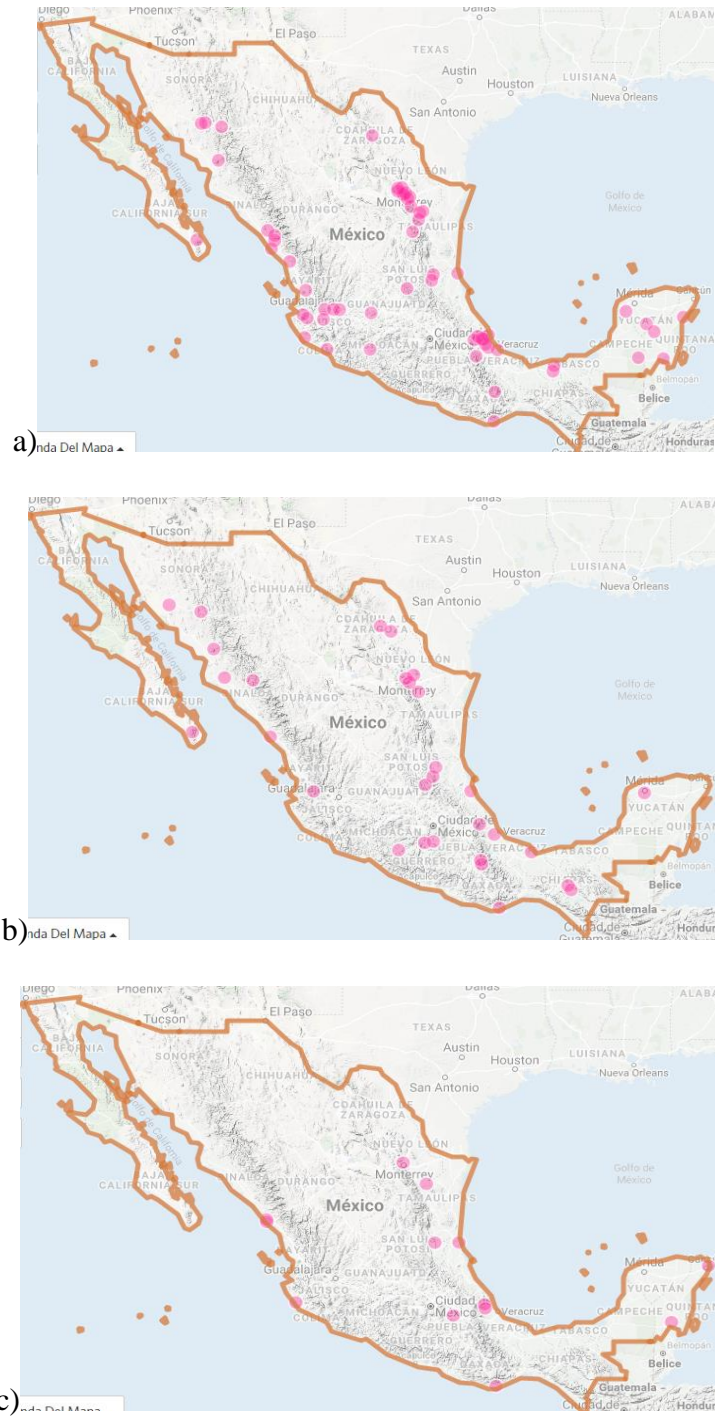


Figura 4. Distribución de a) *Pycnopus sanguineus*, b) *Pycnopus cinnabarinus*, c) *Pycnopus coccineus* en México (Obtenido de [www.naturalista.mx](http://www.naturalista.mx))

### 2.3. USOS DE *Pycnoporus*

*Pycnoporus* es un hongo con vital importancia para el mantenimiento de los ecosistemas ya que participa en los ciclos biogeoquímicos (Pompa, 2011). Aparte de este papel, también tiene otra gran importancia ya que *Pycnoporus* al ser un hongo que degrada lignina, y por la producción de lacasas, tirosinasas, celobiosadeshidrogenasas, quinasas, invertasas y xilasas tienen un gran potencial biotecnológico (Lomascolo *et al.*, 2011). Los metabolitos secundarios de este hongo son importantes en la búsqueda de sustancias antitumorales, antivirales, antioxidantes, antifúngicas, y antibacterianas (Álvarez- Ramos *et al.*, 2017)

Tiene una gran variedad de usos entre los que destaca su uso medicinal, en Brasil se usan los basidiocarpos de *P. sanguineus* como antihemorrágicos (Rosa *et al.*, 2003). Los Totonacas lo aplicaban seco en polvo sobre granos y/o verrugas o hervido para desinflamar los pies (Pérez-Silva *et al.*, 1988). También hay registros de que en países de África es utilizado como desparasitante y para aliviar dolor de encías en bebés. No tiene un uso comestible ya que *Pycnoporus* tiene una textura corchosa, sin embargo, en el 2016 Acosta-Urdapilleta *et al.*, reportan la elaboración de café y té con *Pycnoporus*, esto debido a que podría tener beneficios en la salud de las personas a causa de las propiedades mencionadas. Los pigmentos que produce *Pycnoporus* también son utilizados en la industria cosmética y farmacéutica. (Forte *et al.*, 2010)

Una de las aplicaciones más importantes de *Pycnoporus* es el uso biotecnológico de las lacasas que produce, ya que estas realizan una biotransformación de productos agrícolas y materia prima vegetal en productos de valor agregado como: biopulpeo y bioblanqueamiento de la pulpa de papel, así como la contribución de estas enzimas en la biodegradación de organocontaminantes, xénobioticos y contaminantes industriales (Lomascolo *et al.*, 2011)., También, las lacasas pueden degradar colorantes como el Chicago Sky Blue 6B (Schliepake *et al.*, 2000). La proteína intracelular de *Pycnoporus sanguineus* ha sido utilizada para la biosíntesis de nano partículas de oro (Shi *et al.*, 2015), así mismo también cumple una función como bioindicador del estado de la madera (Van Herdeen *et al.*, 2008).

## 2.4. METABOLITOS SECUNDARIOS

Pese a que los hongos del género *Pycnoporus spp.* no son especies comestibles, su importancia radica en la capacidad de degradar eficientemente compuestos lignocelulósicos, lo que les confiere un gran potencial para ser usados en procesos biotecnológicos de degradación de residuos agrícolas hasta azúcares fermentables, útiles en la producción de etanol y otros productos biotecnológicos de alto valor comercial. Diversas investigaciones han estudiado las condiciones óptimas para la obtención de compuestos sintetizados por este género y la influencia de diversos factores, logrando un mejor control del bioproceso y una mejor comprensión del metabolismo de *Pycnoporus spp.* (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). Los metabolitos que podemos encontrar en *Pycnoporus spp.* se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Metabolitos presentes en *Pycnoporus spp.* (Alvarez-Ramos *et al.*, 2017)

<b>Metabolito</b>	<b>Uso/tipo</b>	<b>Especie</b>
<b>Lacasas</b>	Enzima lignolítica	<i>P.cinnabarinus</i>
		<i>P. sanguineus</i>
	Antiinflamatoria	<i>P. cinnabarinus</i>
	Biorremediación de aguas residuales	<i>P. coccineus</i>
		<i>P. cinnabarinus</i>
	Degradación de colorantes sintéticos	<i>P. cinnabarinus</i>
<i>P. sanguineus</i>		
Blanqueo de pulpa para papel	<i>P. cinnabarinus</i>	
	<i>P. sanguineus</i>	
<b>Lignina peroxidasas</b>	Enzima lignolítica	<i>P. cinnabarinus</i>
<b>Manganeso peroxidasa</b>	Enzima lignolítica	<i>P. cinnabarinus</i>
<b>Versátil peroxidasa</b>	Enzima lignolítica	<i>P. cinnabarinus</i>
<b>Xilanasas</b>	Enzima oxidasa	<i>P. cinnabarinus</i>
<b>Celobiosa deshidrogenasa</b>	Enzima hidrolasa	<i>P. coccineus</i>
<b>Galactosidasa</b>	Enzima hidrolasa	<i>P. cinnabarinus</i>
<b>Poliporina</b>	Antimicrobiano	<i>P. sanguineus</i>
<b>Cinnabarina (3- fenoxacina)</b>	Pigmento	<i>P. sanguineus</i>
	Antimicrobiana	<i>P. sanguineus</i>
	Antiviral	<i>P. sanguineus</i>
	Antitumoral	<i>P. sanguineus</i>
<b>Ácido cinabarlínico</b>	Pigmento	<i>P. sanguineus</i>
	Antibacterial	<i>P. sanguineus</i>
	Antitumoral	<i>P. cinnabarinus</i>
<b>Tramesanguina</b>	Pigmento	<i>P. cinnabarinus</i>
<b>3-1 fenoxacina</b>	Pigmento	<i>P. cinnabarinus</i>



## 2.5. MORFOLOGÍA *Pycnoporus*

Las partes más importantes de un hongo incluyen: a) La pared celular que es una capa alrededor de la membrana celular, formada por quitina y otros polisacáridos, b) Hifas que parecen hebras de hilo y se interconectan para formar el micelio. Las hifas y los micelios ayudan a los hongos a absorber los nutrientes de otros organismos. La mayor parte del micelio se oculta a la vista en lo profundo de la fuente de alimento de los hongos, tales como materia en descomposición en el suelo, hojarasca, madera podrida o animales muertos, el micelio permanece oculto hasta que se desarrollan uno o más cuerpos fructíferos. c) El cuerpo fructífero es la estructura especializada para la reproducción, produce esporas como las unidades básicas de reproducción de los hongos. Los cuerpos fructíferos se producen generalmente en la superficie de la fuente de alimento, esto permite que las esporas reproductivas sean fácilmente arrojadas y arrastradas por el viento, el agua o los animales. Los cuerpos fructíferos suelen ser la única indicación de que un hongo está presente. Al igual que los icebergs, los cuerpos fructíferos representan sólo una pequeña fracción de la totalidad de un hongo, con la mayoría del hongo oculto a la vista (Figura 5).



Figura 5. Cuerpo fructífero de *Pycnoporus spp.* (Wacaser, 2018)

La identificación morfológica de los hongos basidiomicetos puede resultar problemática debido a la variación fenotípica de las hifas y de los cuerpos fructíferos incluyendo a las esporas de hongos que se ven afectada por factores ambientales (Humedad, pH, temperatura) y del sustrato (tipo de madera) en el que crecen. Uno de los problemas más importantes para los taxónomos y cultivadores de hongos es la falta de una herramienta de consenso y sistemático para distinguir diferentes especies, que a veces son morfológicamente idénticas. Aunque existen herramientas valiosas para distinguir el color como las tablas de Munsell (Figura 6) y otros patrones que

generalizan la descripción de la forma del cuerpo fructífero, su tamaño, grosor, el tamaño de los poros y la forma del tubo que contiene a la espora y la espora misma.

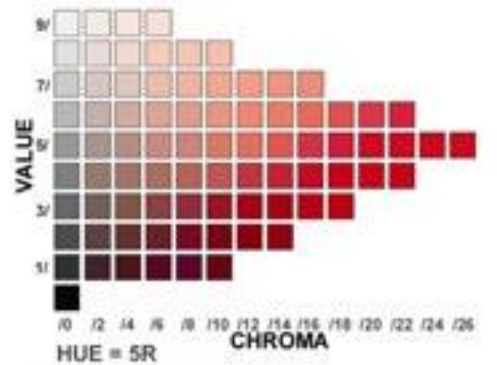


Figura 6. Representación de los colores de Munsell para el tono rojo

### 2.5.1. HIFAS

El conjunto de hifas forma un entretejido que constituye el micelio (hongo), en el cuerpo fructífero de *Pycnoporus sanguineus* aparecen dos tipos de hifas y se le conoce como sistema de hifas dimítico que está formado por hifas generativas y esqueléticas, o por generativas y envolventes. Las hifas esqueléticas pueden ser de paredes gruesas, aseptadas, no ramificadas, hialinas o coloreadas. Las hifas envolventes pueden ser aseptadas, paredes gruesas, ramificadas y con sus extremos acuminados (acabados en punta)., mientras que en *Pycnoporus cinnabarinus* aparecen tres tipos de hifas y se le conoce como sistema trimítico formado por los tres tipos de hifas, generativas, esqueléticas y envolventes como se muestra en la figura 7.

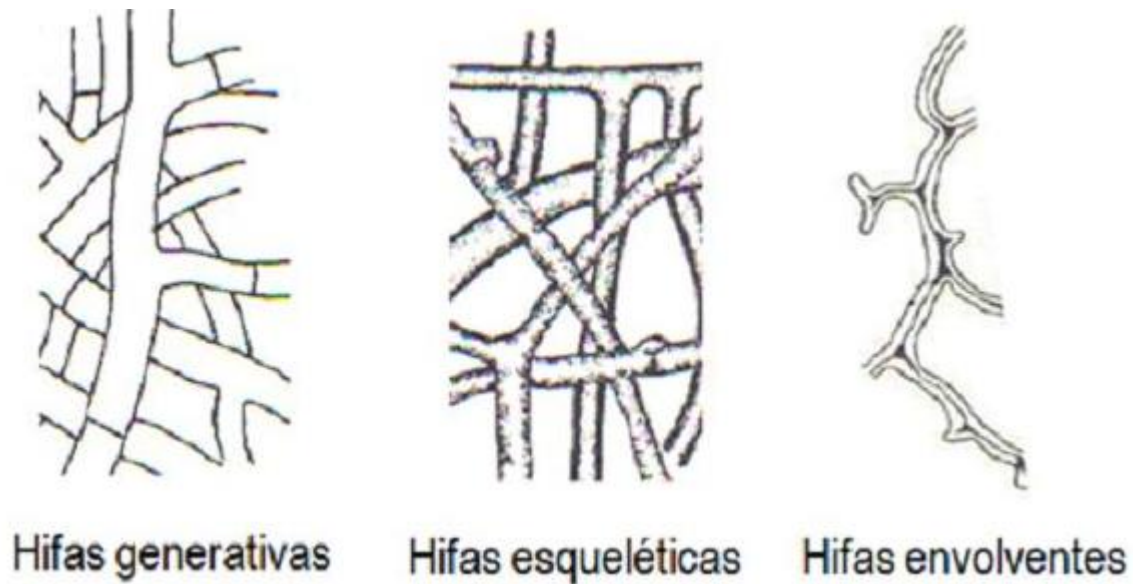


Figura 7. Diferentes tipos de hifas (Lugo *et al.*, 2008)

### 2.5.2. MORFOLOGÍA DEL CUERPO FRUCTÍFERO

El género tiende a tener variaciones en su cuerpo fructífero, tamaño, forma, color, textura de la superficie y la consistencia, el sistema de hifas, poros, tubos, y las reacciones macroquímicas, por ejemplo, cambios de color cuando es maltratada la muestra (Cifuentes *et al.* 1986, Gilbertson y Ryvarden 1986). Este género tiene fructificación anual, y las características incluyen píleo liso, sésil y coriáceo, en forma de media luna estante y, a veces débilmente marcadas zonas concéntricas o no. En especímenes maduros esta superficie es un color blanquecino o plateado (Guzmán 2003). La parte inferior tiene poros isodiamétricos que varían en tamaño desde pequeño a medio. El contexto es del mismo color que el píleo, y es delgado a moderadamente gruesa.

Las esporas son cilíndricas y hialinas, tienen paredes finas, son lisas y amiloide.

Todas estas características las podemos ver a simple vista o bajo un microscopio, pero se necesita de la biología molecular para realizar una correcta identificación de especies, ya que en este género hay descritas 4 especies importantes *P. coccineus*, *P. sanguineus*, *P. cinnabarinus*, *P. puniceus*, (Figura 8). De acuerdo a (Guarro *et al.*, 1999), pueden estar distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales del mundo sin embargo debido a la falta de información o inexperiencia en biología molecular no se les clasifica de la manera correcta.

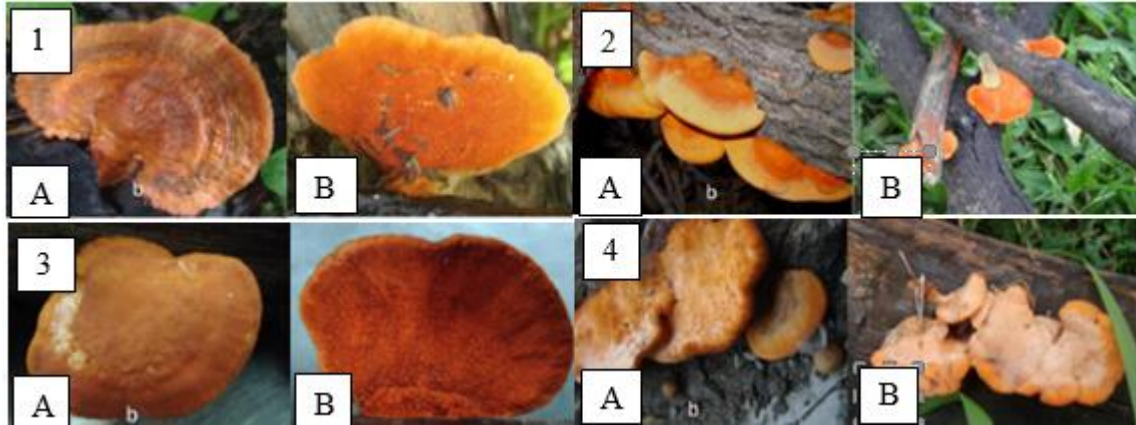


Figura 8. 1. *Pycnoporus sanguineus*. 2. *Pycnoporus cinnabarinus*. 3. *Pycnoporus coccineus* 4. *Pycnoporus puniceus*.  
(Panel A píleo y panel B himénoforo) (Díaz *et al.*, 2016)

## 2.6. LACASAS

En 1883, Yoshida, fue la primera persona que describió una lacasa de planta extraída de la resina del árbol *Toxicodendron vernicifluum*, que se encuentra en Asia (Japón, China e India), la función principal de estas oxidoreductasas es la síntesis de ligninas y la reparación de tejidos dañados, la aplicación de estas lacasas es muy limitada debido a su bajo potencial oxidoreductor.

No fue hasta mucho después, en 1896, Bertrand y Laborde describieron la primera lacasa fúngica. Hasta ahora estas representan el grupo más extenso en número y en la extensión de caracterización, se aíslan a partir de hongos Ascomicetos y Deuteromicetos. La primera lacasa fúngica aislada y caracterizada fue de *Monocillium indicum*, por este hallazgo al grupo se le conoce como una fuente perfecta de lacasas ya que son un objetivo más fácil de modificaciones genéticas. También se han encontrado lacasas en insectos como los del género *Diploptera*, *Drosophila* y *Calliphora* y recientemente en bacterias gramnegativas como *Azospirillum*, *Xanthomonas*, *Shewanella*, *Pseudomonas* y *Escherichia*.

Las lacasas conocidas popularmente como las oxidasas azules se incluyen en las multi cobre oxidasas (MCO) y son capaces de oxidar compuestos orgánicos e inorgánicos como mono, di, poli, amino y metoxifenoles y un numero de aminas aromáticas, el producto final de las reacciones catalizadas por oxidoreductasas es la reducción de oxígeno molecular a dos moléculas de agua.

### 2.6.1. CLASIFICACION DE LAS MULTICOBRE OXIDASAS

La superfamilia de la MCO se divide en cuatro familias: Lacasas (EC 1.10.3.2), L-ascorbato oxidasas (EC 1.10.3.3), Bilirrubina oxidasas (EC 1.3.3.5) y Ferroxidasas (EC 1.16.3.1). En la tabla numero 2 podemos observar las superfamilias y el número de dominios.

Tabla 2. Superfamilias de las MCO

<b>Súperfamilia</b>	<b>Número de dominios</b>
Lacasas de basidiomicetos	3
MCO Ascomicetos	3
Lacasas de insectos	3
MCO de pigmentos fúngicos	3
Ferroxidasa fúngica	3
Oxidasas ascórbicas de plantas y hongos	3
Lacasas de plantas	3
Proteínas bacterianas resistentes al cobre CopA	3
Bilirrubina oxidadas bacteriana	3
Lacasas bacterianas (CueO)	3
MCO bacterianas	3
MCO-A de arqueas	2
MCO-B de bacterias	2
MCO-C de arqueas y bacterias	2
Ceruloplasminas	6

### 2.6.2. PROPIEDADES MOLECULARES DE LAS LACASAS

Perry et al., en 1993 descubrieron por primera vez la presencia de dos genes codificando isoformas de lacasa en *Agaricus bisporus*, en siguientes publicaciones se encontraron 4 o 5 diferentes genes de lacasa en los genomas de *Trametes villosa*, *Trametes sanguinea* y *Rhizoctonia solani*.

Yuan et al., en 2016 identificaron tres isoformas de lacasas (Lac1, Lac2, Lac3) en *Pleurotus nebrodensis* que difieren en su temperatura optima, tal diversidad de lacasas protegen a los hongos de las condiciones de vida tan cambiantes. Kumar et al., en 2003 fueron los primeros en identificar secuencias conservadas distinguiendo lacasas de otras multicobre oxidadas. Probaron que cuatro fragmentos continuos, que son secuencias conservadoras designadas como L1, L2, L3 y L4, se pueden distinguir en lacasas, independientemente del origen. El grado de identidad para tales fragmentos varía de 75% a 85%. Su composición incluye 12 aminoácidos responsables de unir átomos de cobre en el catalizador central. Las regiones L2 y L4 permiten la clasificación de la proteína a la superfamilia MCO mientras que las regiones L1 y L3 son característico del subgrupo lacasas.

### 2.6.3. ESTRUCTURA DE LAS LACASAS

Las lacasas fúngicas son glucoproteínas, que se presentan con mayor frecuencia como isoenzimas, que, debido a la oligomerización de subunidades, pueden formar complejos multiméricos. Estas son principalmente formas diméricas o tetraméricas, con la masa de meros individuales que van desde 50 kDa a 110 kDa. Aproximadamente 10% a 45% de la masa total de la subunidad. En general, las lacasas fúngicas y bacterianas tienen un menor porcentaje de componentes sacáridos (10-25%) que las enzimas vegetales. La primera estructura 3D de lacasa publicada fue la enzima que contenía dos átomos de cobre en el centro activo de la proteína aislada de *Coprinus cinereus* y en la actualidad hay cerca de 115 registros que describen estructuras de lacasas en la base de datos PDB.



Figura 9. Estructura cristalina de la lacasa de *Pycnoporus ssanguineus*. Orlikowska et al., 2017.

## 2.6.4. APLICACIONES

### 2.6.4.1. LACASAS EN LA INDUSTRIA DE LA COMIDA

Una de las principales funciones es la estabilización de vinos y zumos de frutas, su aplicación es una mejor alternativa a los adsorbentes químicos y físicos (por ejemplo, SO<sub>2</sub>) ya que degradan selectivamente fenoles y polifenoles específicos, que afectan las cualidades de sabor y aroma de los productos alimenticios, también se utilizan en la industria del pan para la reticulación de polisacáridos no amiláceos: arabinosilanos. La formación de una red de enlaces transversales entre las cadenas de dichos biopolímeros tiene un efecto positivo sobre la miga y la nitidez de los productos horneados, en la cerveza se utiliza para eliminar el oxígeno en la etapa final de producción para extender la estabilidad de la cerveza y limitar la aparición de un olor desagradable.

### 2.6.4.2. LACASAS EN LA INDUSTRIA DEL PAPEL

En la industria del papel se pueden utilizar para el blanqueamiento de la pulpa de madera, para eliminar la tinta del papel usado y tratar las aguas residuales. Además, se encontró recientemente que también son útiles para la modificación de fibras de celulosa. Una etapa crucial del proceso de fabricación de papel consiste en blanquear la pulpa de madera para separar y degradar los complejos de lignina, lo que perjudica las propiedades de la pulpa de madera y provocar el amarillamiento del papel.

### 2.6.4.3. LACASAS EN PROCESOS DE BIORREFINACION

Las lacasas se pueden usar en muchas etapas de biorrefinación. Lo que es más importante, aflojan varias la compleja estructura de las ligninas, facilitan la extracción de los componentes de carbohidratos, celulosa y hemicelulosas, y las pectinas que pueden contener para producir bioetanol de segunda generación y varios productos químicos valiosos. Se planea que las lacasas sean utilizadas en un futuro en las biorefinerías para la biotransformación para transformar

fracciones de lignina y productos de su descomposición en materiales valiosos, productos químicos y productos farmacéuticos

#### 2.6.4.4. BIORREMEDIACIÓN Y BIODEGRADACIÓN

Los microorganismos que producen lacasas se utilizan en la biorremediación de suelos contaminados y la biodegradación de desechos tóxicos, transforman diversos compuestos fenólicos, otros compuestos aromáticos y cíclicos en derivados no tóxicos mediante transformación oxidativa y / o se unen a estos compuestos para formar compuestos poliméricos neutros químicamente

#### 2.6.4.5. LACASAS EN LA INDUSTRIA COSMETICA

Estas son utilizadas cada vez más en la producción de antibióticos, antiinflamatorios, anestésicos y tranquilizantes. Mikolasch et al., en 2008 sintetizaron un grupo completo de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Las lacasas utilizadas para ese fin catalizaron la aminación de varios compuestos orgánicos, en particular amino  $\beta$ -lactámicos, ácido 2,5-dihidroxifenilacético, ácido 2,5-dihidroxibenzoico y catecol. Investigaciones más recientes mostraron que la lacasa puede usarse en la síntesis catalítica de cumestanos (con actividad estrogénica). Los resultados obtenidos por Qwebani-Ogunleye et al., en 2001 indicaron que los rendimientos de estos medicamentos son similares o mejores que los obtenidos por otros métodos enzimáticos, químicos o electroquímicos. Además, las lacasas en sí mismas se pueden usar como medicamentos para reducir los efectos negativos de la aceruloplasminemia, una enfermedad que causa un trastorno de la homeostasis del hierro en el cuerpo. De acuerdo a Zhang en 2013 y Wu YY en 2014 la posibilidad de utilizar lacasas para inhibir la actividad de la transcriptasa inversa del VIH-1, sin la cual el virus no puede transcribir el material genético del ARN al ADN, es muy prometedora. Esta actividad se ha descubierto para lacasas de muchos hongos, en particular *Lepiota ventrispora* y *Pleurotus cornucopiae*. También está surgiendo un nuevo campo de aplicación para las lacasas en la industria cosmética estas enzimas se utilizan especialmente para la síntesis de flavonoides, pigmentos, colorantes cosméticos, así como aldehídos aromáticos y compuestos



heterocíclicos, que son ingredientes activos en productos cosméticos. Los tintes para el cabello basados en las propiedades oxidantes de las lacasas son mucho menos dañinos que los productos con peróxido de hidrógeno utilizados como agente oxidante, que debilita el cabello y daña su estructura. Además de acuerdo con (Nagai M *et al.*, 2003) las lacasas se pueden utilizar para aclarar la piel mediante la reducción de melanina en manchas de diátesis y cicatrices. (Narise A *et al.*, 2011) y (Roggen EL *et al.*, 2015) las lacasas pueden ser ingredientes de muchos productos cosméticos como desodorantes, pasta de dientes, enjuagues bucales, detergentes, jabones y champús para rostro y manos, cremas para rostro y manos y colorantes para el cabello.

## 2.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La revolución molecular en cuanto a taxonomía de hongos comenzó a inicios de 1990, con la amplificación del ADNr, con la ayuda de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Hibbet *et al.*, 2007). Realizar identificación molecular de hongos es una herramienta que nos permite conocer realmente hasta el género y especie en hongos basidiomicetos. Lo cual en numerables ocasiones puede representar un desafío ya que muchas especies son identificadas solamente morfológicamente a nivel macroscópico o microscópico. La detección molecular por estar basada en el estudio de características genómicas permite la identificación y diferenciación de organismos de forma más sensible, específica, certera y rápida (Alves *et al.*, 2002).

En los últimos años, la evaluación más precisa de la identificación y la diversidad de hongos se ha logrado usando marcadores moleculares, tales como, el espaciador interno transcrito (ITS) región de ADN ribosomal, y secuencias parciales de genes que codifican subunidades de ARN. tales como la polimerasa,  $\beta$ -tubulina, celobiohidrolasa-C, la topoisomerasa II, manganeso peroxidasa y lacasas (Hatsch *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004, Froslev *et al.*, 2005, Tomšovský *et al.*, 2006). Restricción de longitud de fragmentos polimorfismo y polimórfico amplificado al azar. Hay otras técnicas utilizadas para la identificación molecular tales como RFLP (restricción de longitud de fragmentos polimorfismo) y RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar). La amplificación del gen ribosomal se utiliza para identificar microorganismos (White *et al.* 1990, Dupont *et al.* 1998). Estos genes comprenden secuencias altamente conservadas o muy variables

y pueden ser utilizados para comparar las especies dentro del mismo género filogenéticamente y entre cepas de la misma especie.

### 2.7.1. ITS y 5.8S

La región de ADNr nuclear contiene dos regiones internas espaciadores transcritos la ITS1 e ITS2 (Internal Transcribed Spacer) y el gen 5.8S ADNr. Las regiones del ADNr y las secuencias con diferentes oligonucleótidos más estudiadas son:

Oligonucleótidos de la región 18S, D1-D2 (NS): Dominios divergentes de la región 28S (NL), Oligonucleótidos de la región 28S, (LR), Large Subunit, ITS1, ITS4: Internal transcribed spacer (Solé, 2002). Se utiliza con éxito en la determinación de las relaciones filogenéticas entre géneros y especies de hongos. La región ITS es conocido para mostrar cierta variabilidad incluso dentro de las especies, aunque su variabilidad intraespecífica se considera a menudo limitado y claramente separado de la variabilidad interespecífica.

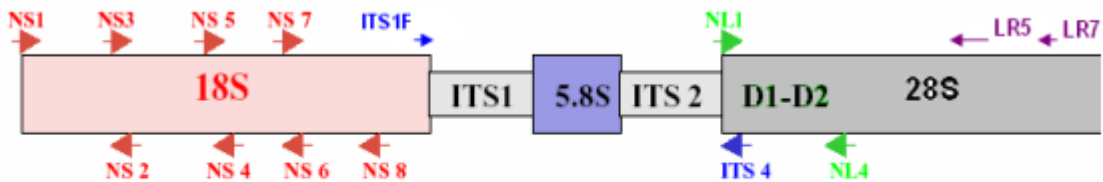


Figura 10. Representación esquemática de las regiones estudiadas del ADNr y los diferentes oligonucleótidos.

Lomascolo y colaboradores en 2002 llevaron a cabo la identificación molecular utilizando ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 de secuencias genómicas de 20 cepas de *Pycnopus* (2 cepas de *P. coccineus*, 10 cepas de *P. sanguineus* y 8 cepas de *P. cinnabarinus*). El árbol filogenético que se construyó con las secuencias obtenidas agrupó a las cepas de acuerdo con su origen geográfico y su posición taxonómica. Un grupo incluye las cepas asiáticas y el otro incluye cepas del norte de Europa. (Rungjindamai *et al.*, 2008) llevaron a cabo la caracterización molecular (ITS) de basidiomicetos de Tailandia, y las especies se identificaron como *Pycnopus puniceus*, que formó un grupo con *Pycnopus sanguineus*, agrupados en un clado basal.

(Batallas-Molina 2016) realizó la caracterización e identificación molecular de algunas especies de macrohongos analizando la región ITS de las secuencias obtenidas. Se identificaron

morfológicamente cuatro especies: *Favolus tenuiculus*, *Lentinus scleropus*, *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes elegans*, molecularmente *Favolus tenuiculus* tres de sus cuatro secuencias coincidieron con *F. brasiliensis* y la restante con *Neofavolus alveolaris* reportadas en el GenBank. Las secuencias de *L. scleropus* con 97% de identidad eran parecidas a la única secuencia de *L. scleropus* registrada en el GenBank, todas las secuencias de *P. sanguineus* coincidieron en 100% con la comparada en el banco de genes. *T. elegans* y sus tres secuencias eran parecidas a la secuencia de *Lenzites elegans* y la restante coincidió con *T. elegans*, en esta especie hay que aclarar que *L. elegans* ahora es sinónimo de *T. elegans* por lo tanto todos los individuos del taxón serían *T. elegans*. En cuanto a la composición de nucleótidos entre las secuencias de cada taxón no se obtiene variaciones representativas, aseverando que la caracterización morfológica coincide con la molecular en todas las especies.

(Díaz, 2013) recolecto nuevos especímenes de *Pycnoporus* del estado de Morelos determinando la taxonomía morfológica macroscópica y microscópica, además de la identificación por biología molecular de 23 cepas nuevas de *Pycnoporus* spp. Estas cepas fueron depositadas en el cepario de hongos comestibles en el CIB-UAEM con duplicados en caja Petri y su micelio fue preservado en glicerol a -20°C en el CEIB-UAEM. En las colecciones nacionales en México se encontraron un total de 495 registros de especímenes del género de *Pycnoporus* spp y se compararon estos resultados con los resultados reportados por Pérez Silva *et al.*, 1988. Encontrando un nuevo reporte de *Pycnoporus sanguineus* del herbario ENCB-IPN de un espécimen depositado en 1989 proveniente del Estado de México, incluyendo este resultado se realizó un nuevo mapa de la distribución de *Pycnoporus* spp., en el país incluyendo esta cepa. Se observó que los estados con mayor número de especímenes en las colecciones son Jalisco con 135, Veracruz con 103 y Morelos con 36. Actualmente en nuestro grupo de trabajo se lleva a cabo un proyecto en el cual se propone identificar cepas de *Pycnoporus* spp. A través de biología molecular utilizando regiones ITS,  $\beta$ -tubulina, gen *Lcc* y Fenoxazinona sintasa que nos permite identificar a *Pycnoporus coccineus*. Coronel en 2018 logro identificar la cepa 51 con ITS,  $\beta$ -tubulina y gen *lac* *lac1* (o *lcc3-1*). Aparte de esto realizo análisis filogenéticos para saber dónde se coloca la cepa 51 evolutivamente encontrando que por ITS y  $\beta$ -tubulina se encuentran muy cerca de *P.coccineus*.

Maxima verosimilitud  
 1000 Replicaciones de bootstrap  
 Método: Hasegawa-Kishino-Yano

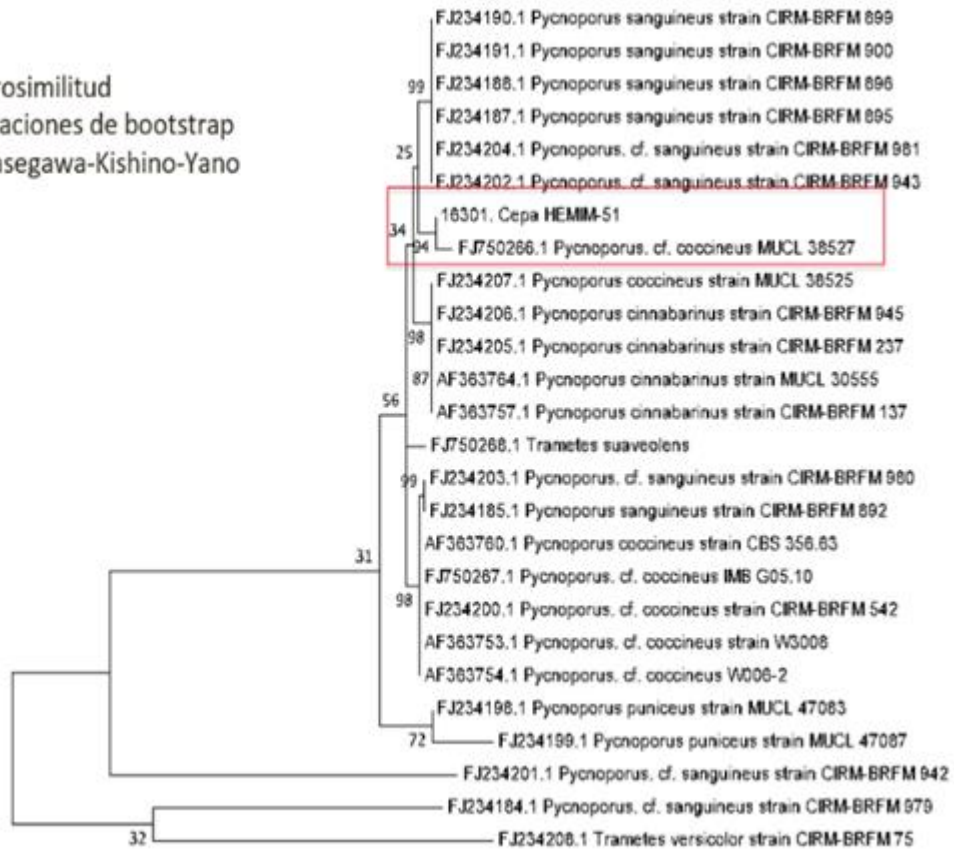


Figura 11. Árbol filogenético en base a las secuencias de ITS, cepa HEMIM-51

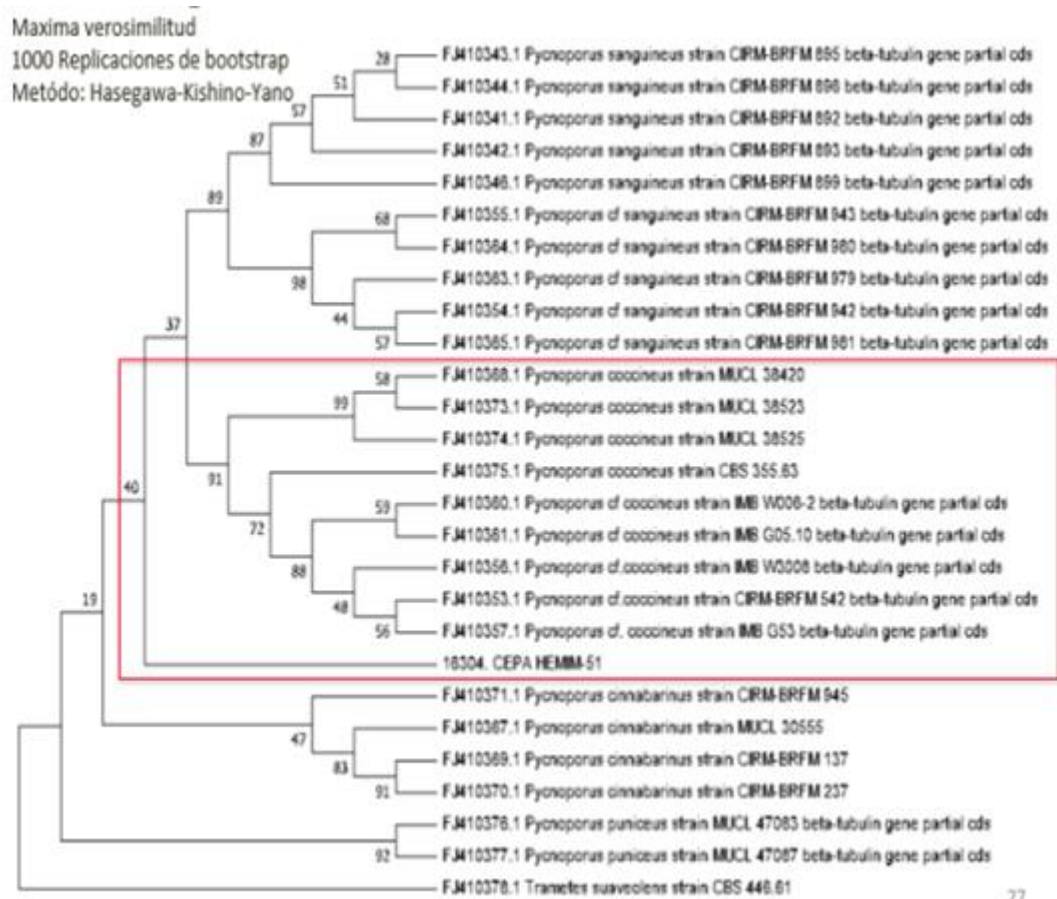


Figura 12. Árbol filogenético en base a las secuencias de  $\beta$ -tubulina, HEMIM 51

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Pycnoporus* es un hongo que ha sido estudiado por la producción de diferentes metabolitos, entre ellos las lacasas las cuáles tienen aplicaciones en diferentes industrias como la alimentaria, del papel, cosmética y la farmacéutica en la cual actúan como, antibióticos, antiinflamatorios, anestésicos y tranquilizantes esto le da una importancia biotecnológica. Por esto es importante la obtención de más fuentes de lacasas, al trabajar con la cepa 51 se amplificara el gen de las lacasas y se identificara molecularmente la especie a la cual pertenece.

#### **4. HIPOTESIS**

Se lograra amplificar el gen de las lacasas de la cepa HEMIM-51 para identificar la especie a la que pertenece.

#### **5. OBJETIVOS**

##### 5.1. OBJETIVO GENERAL

- Identificar la cepa HEMIM-51

##### 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar el gen de las lacasas
- Obtener la secuencia del gen de las lacasas de la cepa HEMIM-51
- Construir arboles filogenéticos e identificar la especie de *Pycnoporus*

#### **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

##### 6.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizara la cepa de *Pycnoporus* HEMIM 51 proveniente del estado de Veracruz.

##### 6.2. MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizara medio de cultivo solido en cajas Petri.

##### 6.3. OBTENCION DEL MICELIO

Para la obtención del micelio, se utilizó el medio de cultivo harina integral de trigo (HIT), las cepas utilizadas fueron incubadas por 5 días a 28°C, se revisaron constantemente para eliminar

las cajas que estuvieran contaminadas y/o resembrar cajas con medio de cultivo HIT hasta que presentaran crecimiento de micelio.

Para la preparación de 250 ml de HIT el cual rinde para 10 cajas, se necesitó (Tabla 3):

3.75 gr de azúcar
7.5 gr de harina integral
5 gr de agar bacteriológico
250 ml de agua destilada



Tabla 3. Cantidades para medio de cultivo HIT

Figura 13. Ingredientes de medio de cultivo

En un matraz Erlenmeyer se vertieron las cantidades mencionadas en la tabla 3, el medio se calentó hasta punto de ebullición y se retiró cuidadosamente, después de esto se esterilizó en autoclave, una vez estéril se vació en la campana en cajas Petri a las cuales previamente se les dio UV por 30 minutos. Después de esto se procedió a sembrar .5 cm de micelio, se selló con parafilm y se incubó a 28°C.

#### 6.4. EXTRACCION DE ADN

Se aisló el ADN genómico a partir de polvo micelial (100- 200 mg) como se describe por Lomascolo *et al.* (2002). Se homogenizo con 1000µl de buffer Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS-duodecil sulfato de sodio), usando una micropipeta. Después de incubar 15 minutos a temperatura ambiente se le añadió 500µl de fenol y se mezclaron suavemente. Se centrifugó a 13,000g durante 1 hora a 4°C, la parte acuosa se transfirió a un tubo que contenía 3µl de RNAsa y se incubó a 37°C por 15 minutos. Antes de que se centrifugara a 13000g por 10 minutos se le añadió 1ml de cloroformo a la fase acuosa y se realizó una centrifugación por 10 minutos. Se tomó la fase acuosa y se pasó a un tubo eppendorf nuevo, el ADN se precipitó con la 500 µl de isopropil frío y acetato de sodio 3M a una proporción 10:1 y

su incubación en hielo por 2 horas. El sedimento recuperado se lavó con 1 ml etanol al 100%, se secó y se resuspendió en 50 µl de 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) y se almacenó a 20°C

## 6.5. AMPLIFICACIÓN

De acuerdo al trabajo realizado por Lomascolo et al., en 2011 en el cual realizaron un análisis de las relaciones fitogeográficas de *Pycnoporus* con cepas de diferentes partes del mundo empleando el gen lac 3-1 se tomó en cuenta la secuencia con la que trabajaron para la creación de 3 pares de oligos.

Tabla 4. Oligonucleótidos para el gen lacasas y cantidades necesitadas

Oligos	pb	TM	% GC	Tamaño de fragmento
F2 – 5'-CAY TGG CAY GGR TTC TTC-3' RL3 – 5'-ACCGCT TKC CCT GBG TGA C-3'	18 19	56 61	47 55	566pb
FL3 – 5'-GTC ACV CAG GGM AAG CGG T-3' RL4 – 5'-GTC VAC RCC WCC DGS CTC GGG-3'	19 21	61 70	55 61	584pb
FL4 – 5'-CCC GAG SCH GGW GGY GTB GAC-3' R8 – 5'-GAG RTG GAA GTC RAT GTG RC-3'	21 20	70 61	61 45	536pb

En rojo: Las bases sustituidas en base al código de una letra para oligonucleótidos degenerados

La reacción se llevó a cabo en un termociclador a 94°C durante 5 minutos seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto de alineamiento y 2 minutos de elongación a su TM correspondiente para cada par de oligos y una etapa de extensión a 72°C por 7 minutos.

## 6.6. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Una vez terminado el proceso de PCR, se tomarón 8 µl de producto de PCR y 1 µl de azul de bromofenol y se colocaron en geles de agarosa al 0.8% disueltos en buffer TAE 1X con un pH 8.



El gel de agarosa fue puesto en la cámara de Electroforesis y la muestra fue corrida a 75V, aproximadamente por 40 min, para finalmente ser teñida con una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml durante 20 min.

#### 6.7. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Los productos de PCR que fueron observados como bandas claras se purificaron con el kit Thermo scientific GeneJET gel extraction gel, se cortó la banda que amplifiqué y se colocó en un tubo eppendorf, este no debe pasar de 1 gramo, se le añadió un volumen 1:1 de binding buffer, se incubó por 10 minutos a 50-60°C. Se colocó 800µl en las columnas de purificación, se centrifugó durante 1 minuto (dos veces) y posterior a esto se tira el binding buffer. Se agregaron 700 µl de wash buffer y se centrifugó por 1 minuto, se tiró el wash buffer y se centrifugó. Se tomaron dos tubos eppendorf y se marcaron con el fragmento utilizado, uno contenía 20 µl de agua grado molecular y el otro 30 µl de agua grado molecular y el resultante se cuantificó mediante un nanodrop en el Instituto de Biotecnología

#### 6.8. SECUENCIACIÓN

Los productos de la purificación se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM, La mezcla DNA/Oligo se debía entregar en un volumen final de 16 µl, en un tubo eppendorf de tapa plana de 0.2 ml para PCR, sin anotaciones en la tapa. Dicha mezcla debía contener 10 pmolas del oligo elegido para secuenciar y 100-120 ng del producto de purificación de PCR.

#### 6.9. ANALISIS BIOINFORMÁTICO

Se realizó una comparación con alguna base de datos provista por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

## 6.10. ANALISIS FILOGENETICO

Un análisis filogenético se realizó mediante el uso del programa MEGA SOFTWARE <https://www.megasoftware.net/> se realizó un archivo fasta con todas las secuencias de (Lomascolo, 2011) y las secuencias del fragmento 1 y fragmento 2, posterior a esto el programa nos creó un árbol de máxima verosimilitud.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. EXTRACCIÓN DE ADN CEPA 51

La extracción de la cepa 51 se realizó a partir del protocolo Lomascolo, 2002. En principio no se obtuvieron buenos resultados ya que el ADN estaba completamente degradado. Se estandarizaron las condiciones a un tiempo de extracción de 5-6 días en los cuales el micelio se encontraba con una consistencia blanda y no cubría por completo la caja, se raspo con una espátula y se pesaron de .100-.200gr, se lograron juntar 4 tubos eppendorf, se homogenizo con 500µl de buffer Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS-duodecil sulfato de sodio, se maceró de manera rápida para evitar la degradación y posterior a esto se le agregaron otros 500µl del buffer y se transfirió a un tubo eppendorf. Se procedió a dar vortex por 1 minuto y se incubo a temperatura ambiente por 15 minutos, al paso de este tiempo se le agregó 500µl de fenol cloroformo alcohol isoamil y después se centrifugo durante 1 hora a 13000g a 4°C. La fase acuosa se pasó a un tubo eppendorf que contenía 3µl de RNAsa y se incubo por 30 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo se le agrego 1ml de cloroformo y se centrifugo durante 10 minutos, la fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf y se le agregaron 500µl de isopropil frio y una proporción 10:1 de acetato de sodio 3M y se incubó por 2 horas en hielo. Posterior se realizó una centrifugación de 10 minutos y se tiró el alcohol isopropil y acetato de sodio, el pellet obtenido se

lavó 3 veces con 1000µl de etanol al 100%. Los tubos con el pellet se dejaron un día abiertos para lograr la evaporación del etanol y se resuspendieron en 50µl de agua grado molecular.



Figura 14. Tubos eppendorf con el ADN extraído de la cepa HEMIM 51

## 7.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para saber si el ADN no estaba degradado se corrió un gel de agarosa al 0.8%. Se necesitó de gene ruler y buffer 6x. En el primer pozo se colocó 1µl de gene ruler y 1µl de buffer 6x, en los siguientes pozos se colocaron 1µl de buffer 6x y 5µl de muestra de ADN. El gel se cubrió con buffer TAE y se corrió durante 40 minutos, al finalizar esto se puso a teñir por 10 minutos con bromuro de etidio utilizando guantes ya que es altamente toxico.

La extracción de ADN fue exitosa ya que en el gel de la figura 15 de color rojo podemos observar que el ADN no se degradó y se obtuvieron 3 tubos con ADN de buena calidad.

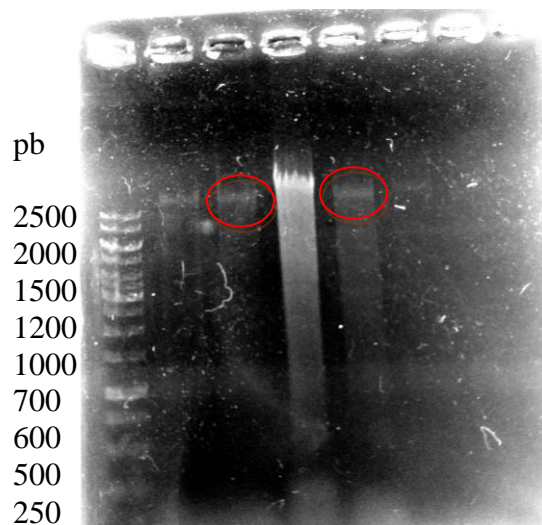


Figura 15. Gel de agarosa de la extracción de ADN cepa HEMIM 51

### 7.3. CUANTIFICACIÓN DE ADN

Se realizó la cuantificación de ADN mediante el equipo de laboratorio nanodrop en el Instituto de Biotecnología obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 5. Cuantificación de muestras de la extracción de ADN cepa HEMIM-51

Muestra	Contenido
1	3158.2 ng/μl
2	1657.3 ng/μl
3	1507.1 ng/μl (degradado)
4	3174.6 ng/μl

### 7.4. AMPLIFICACION DEL GEN LACASAS

Para realizar la amplificación se utilizó la técnica de PCR y se tomó el primer par de oligos para saber si podíamos amplificar por completo la secuencia de pb.

Tabla 6. Cantidades utilizadas para la amplificación del gen *lac 1* de la Lacasa, reacción de 20μl

Sustancia	Cantidad
Buffer Taq	10μl
DNTP's	5μl
MgCl <sub>2</sub>	10μl
Oligo Forward	5μl
Oligo Reverse	5μl
ADN	1μl
Taq polimerasa	0.1 μl

Tabla 7. Condiciones para la amplificación del fragmento 1

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°	5 minutos
Desnaturalización	94°	30 segundos
Alineamiento	65°	1 minuto
Extensión	72°	2 minutos
Extensión final	72°	7 minutos
x30ciclos		

Tabla 8. Condiciones para la amplificación del fragmento 2 del gen *lacI*

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°	5 minutos
Desnaturalización	94°	30 segundos
Alineamiento	69°	1 minuto
Extensión	72°	2 minutos
Extensión final	72°	7 minutos
x30ciclos		

Tabla 9. Condiciones para la amplificación del fragmento 3 del gen *lac I*.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°	5 minutos
Desnaturalización	94°	30 segundos
Alineamiento		
Extensión	72°	2 minutos
Extensión final	72°	7 minutos
x30ciclos		

#### 7.4.1. FRAGMENTO 1 *lac 1*

Se realizó PCR del primer fragmento y no se obtenía la amplificación del gen *Lacasa lac1* (o *lcc3-1*), se modificaron las cantidades de ADN ya que en un principio no se había tomado en cuenta como algo relevante la cantidad de ADN de la muestra, esta contenía más de 3158.2 ng/ $\mu$ l y estaba inhibiendo la polimerasa. En principio se utilizó 1 $\mu$ l de ADN en el PCR y no amplificaba, por lo cual se optó por reducir la cantidad de ADN utilizado y se realizó con 0.6 $\mu$ l de ADN y se obtuvo el siguiente resultado (figura 16) en el cual se puede observar el fragmento 1 de un tamaño aproximado de 566pb amplificado al tomar 8 $\mu$ l de producto de PCR y 1 $\mu$ l de buffer 6X y correr el gel de agarosa al 0.8% durante 37 minutos en la cámara de electroforesis.

Posteriormente se purifico utilizando el geneJET gel extraction kit y se corrió un gel de agarosa al 0.8%.

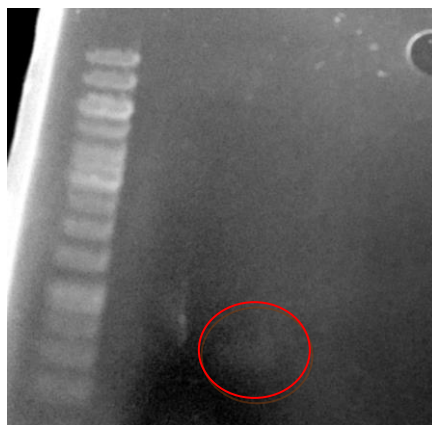


Figura 16. Gel de agarosa de la amplificación del fragmento 1 del gen *lac 1* de la cepa HEMIM

#### 7.4.2. FRAGMENTO 2 *lac I*

Se realizó el PCR del segundo fragmento con las condiciones de la tabla 8 y 1µl de ADN y al finalizar se recogieron 8µl del producto de PCR y 1µl de buffer 6X de las muestras y se corrió un gel de agarosa al 0.8% durante 37 minutos., en la figura 17 podemos observar en el gel el fragmento 2 amplificado 3 veces con su tamaño esperado de 584 pb aproximadamente.

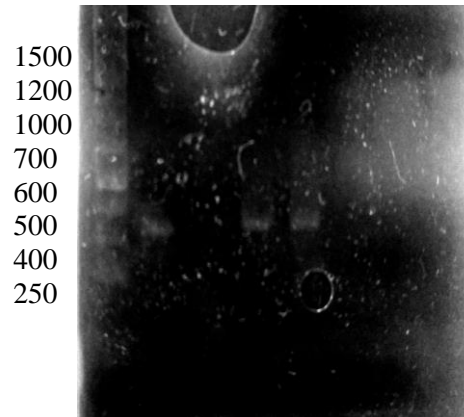


Figura 17. Gel de agarosa de la amplificación del fragmento 2 del gen *lac I* de la cepa HEMIM-

51

Después de realizar las amplificaciones con la técnica de PCR se procedió a realizar la purificación de estas, mediante el kit geneJET gel extraction kit y se corrió un gel de agarosa 0.8% para observar si la purificación fue exitosa, como se puede ver en la figura 18.

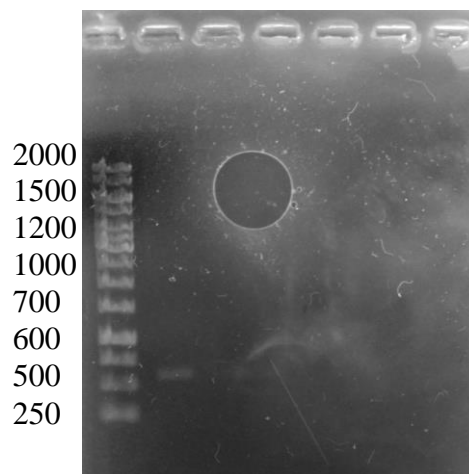


Figura 18. Gel de agarosa del producto de purificación del fragmento 2 del gen *lac I* de la cepa

HEMIM-51

### 7.4.3. FRAGMENTO 3 *lac I*

Se realizaron amplificaciones utilizando los oligos diseñados por Coronel, 2019. Se probaron diferentes temperaturas ya que los oligos presentaban una TM distante, la TM1 de 70° y la TM2 de 61° y no se obtuvo el fragmento, por lo tanto se decidió diseñar un nuevo oligo forward que su TM fuese cercana a la del oligo reverse previamente diseñado. La tabla 10 muestra el nuevo oligo diseñado y sus características.

Tabla 10. Oligo FL4 rediseñado y características

Oligo	pb	Tm1	Tm2	Tamaño de fragmento
CDC TSA ACH TGG TYT TCA ACT T	22	64°	61.66°	536 pb

Se realizó PCR con diferentes condiciones, se intentó probando diferentes temperaturas utilizando de referencias las TM del oligo FL4 (tabla 10) y oligo R8 (tabla 4) a los 64°, 63.5°, 63°, 62.5° se observó la siguiente barra de amplificación a 62.5° (figura 19)



Figura 19. Gel de agarosa con amplificación de 250 pb



## 7.5. ANALISIS BIOINFORMATICO

### 7.5.1. FRAGMENTO 1 *lac I*

Una vez purificado el fragmento 1 del gen de las lacasas se cuantifico en nanodrop obteniendo 9 ng/ $\mu$ l, se realizó una preparación en un tubo eppendorf tapa plana de 0.2 ml para PCR utilizando 13 $\mu$ l de producto de purificación, 1  $\mu$ l de oligo F2 (forward), y 2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O free, se mandó a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM y se realizó un análisis bioinformatico utilizando la herramienta BLAST en NCBI obteniendo el siguiente resultado:

	Descripción	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor E	Por. Ident	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa BRFM 902 gen.lacasa .cds completos</a>	132	132	45%	1e-26	75,37%	<a href="#">EJ858751.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 893 gen.lacasa .CD parcial</a>	132	132	45%	1e-26	75,37%	<a href="#">EU678779.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 906 gen.lacasa .CD parcial</a>	132	132	45%	1e-26	75,37%	<a href="#">EU678776.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 902 gen.de lacasa .CD parcial</a>	132	132	45%	1e-26	75,37%	<a href="#">EU678773.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 896 gen.de lacasa .CD parcial</a>	132	132	45%	1e-26	75,37%	<a href="#">EU678768.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 905 gen.de lacasa .CD parcial</a>	128	128	45%	4e-25	75,12%	<a href="#">EU678782.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa BRFM 898 gen.lacasa .CD parcial</a>	128	128	45%	4e-25	75,12%	<a href="#">EU678781.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 897 gen.de lacasa .CD parcial</a>	128	128	45%	4e-25	75,12%	<a href="#">EU678780.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 900 lacasa gen .cds parcial</a>	128	128	45%	4e-25	75,12%	<a href="#">EU678771.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 899 gen.de lacasa .CD parcial</a>	128	128	45%	4e-25	75,12%	<a href="#">EU678770.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa BRFM 894 gen.lacasa .CD parcial</a>	128	128	45%	4e-25	75,12%	<a href="#">EU678769.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 895 gen.lacasa .CD parcial</a>	128	128	45%	4e-25	75,12%	<a href="#">EU678767.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 892 gen.lacasa .CD parcial</a>	128	128	45%	4e-25	75,12%	<a href="#">EU678766.1</a>

Figura 20. BLAST alineamiento de la secuencia del fragmento 1 de las lacasas de la cepa HEMIM 51

Con un porcentaje de identidad del 75% se encontró identidad con *Pycnoporus sanguineus* con los números de acceso EJ858751.1, EU678779.1, EU678776.1, EU678773.1, EU678768.1, EU678782.1, EU678781.1, EU678780.1, EU678771.1, EU678770.1, EU678769.1, EU678767.1, EU678766.1.

### 7.5.2. FRAGMENTO 2 *lac 1*

Se cuantificó el producto obteniendo 11.1 ng/ $\mu$ l y se realizó la secuenciación en el Instituto de Biotecnología, posterior a esto se realizó un análisis en la base de datos del NCBI el cual arrojo los datos que podemos observar en la figura 21.

	Descripción	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor E	Por. Ident	Adhesión
✓	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 897 gen de lacasa_CD parcial</a>	586	586	92%	4e-163	87,07%	<a href="#">EU678780.1</a>
✓	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa MUCL 29375 gen lacasa_CD parcial</a>	582	582	92%	5e-162	86,87%	<a href="#">EU684158.1</a>
✓	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 942 gen lacasa_CD parcial</a>	580	580	92%	2e-161	86,85%	<a href="#">FJ232700.1</a>
✓	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa BRFM 898 gen lacasa_CD parcial</a>	580	580	92%	2e-161	86,87%	<a href="#">EU678781.1</a>
✓	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 900 lacasa gen_cds parcial</a>	580	580	92%	2e-161	86,87%	<a href="#">EU678771.1</a>
✓	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa BRFM 894 gen lacasa_CD parcial</a>	580	580	92%	2e-161	86,87%	<a href="#">EU678769.1</a>
✓	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 895 gen lacasa_CD parcial</a>	580	580	92%	2e-161	86,87%	<a href="#">EU678767.1</a>
✓	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 905 gen de lacasa_CD parcial</a>	575	575	92%	8e-160	86,68%	<a href="#">EU678782.1</a>
✓	<a href="#">Pycnoporus sanguineus cepa CIRM-BRFM 903 gen lacasa_CD parcial</a>	575	575	92%	8e-160	86,68%	<a href="#">EU678774.1</a>

Figura 21. BLAST alineamiento de la secuencia del fragmento 2 del gen lacasas *lac 1* (o *lcc3-1*) de la cepa HEMIM-51

Con una cubierta de consulta del 92% y un porcentaje de identidad del 87-86% con cepas de *Pycnoporus sanguineus* con números de acceso EU6787.80.1, EU684158.1, FJ232700.1, EU678781.1, EU678771.1, EU678769.1, EU678767.1, EU678782.1, EU678774.1.

### 7.5.3. FRAGMENTO 3 *lac 1*

El producto de PCR se purifico sin embargo al cuantificarlo la cantidad era de 8 ng/μl y al secuenciar resultado que esas 250 pb no alineaban con ninguna especie de *Pycnoporus* reportada hasta el momento, por lo cual se podría pensar que este último fragmento es decisivo para lograr la correcta identificación de la cepa HEMIM 51, ya que se tienen registros de Coronel en 2019 quien identifico esta cepa con ITS y B-tubulina sin embargo estos dos marcadores no son tan precisos ya que ITS sirve para identificar géneros pero no es tan útil al identificar relaciones filogenéticas dentro de un mismo género.

### 7.6. ANALISIS FILOGENETICO

Se realizó un análisis filogenético en el programa MEGA X SOFTWARE utilizando la secuencia de los fragmentos que obtuvimos y las 36 cepas de *Pycnoporus* utilizadas por Lessage Meessen en 2011.

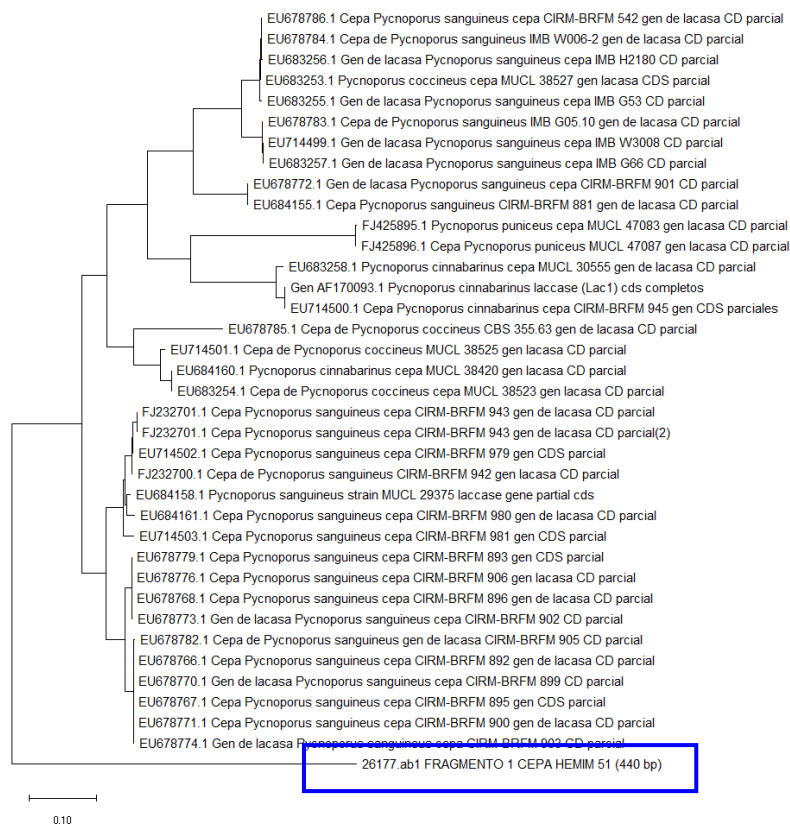


Figura 22. Construcción del Árbol filogenético del fragmento 1 utilizando el programa MEGA SOFTWARE



## 8. DISCUSIÓN

Existen pocos trabajos de identificación molecular de hongos, uno de ellos es el trabajo realizado por Lesage Meessen et al., en 2011 en el cual se utilizaron 3 diferentes marcadores: ITS,  $\beta$ -tubulina y el gen lac 3-1 y en el que lograron separar 36 cepas de *Pycnoporus* de origen diferente, lo más resaltante del trabajo fue que con el gen lac 3-1 obtuvieron 5 clados diferenciados a los cuales nombraron como Neotropico, Paleotropico, Oceanía, Europa y este de Asia.

En México solo existe registro un trabajo que utilizó tres marcadores para tratar de identificar la cepa HEMIM-51 y este es el trabajo de Coronel Pastor en 2019 que utilizó ITS,  $\beta$ -tubulina y el gen Lac 3-1 tal como Lesage Meessen, con los marcadores de ITS y  $\beta$ -tubulina ella logró identificar esta cepa como posible *P. coccineus* y con el gen Lac 3-1 hizo falta levantarlo completo para tener total certeza de cuál es la especie a la que pertenece la cepa HEMIM-51.

En este trabajo se utilizó el gen Lac 3-1 ya que se ha demostrado que utilizar ITS y  $\beta$ -tubulina pueden arrojar falsos positivos, se tomó la decisión de amplificar el gen de las lacasas Lac 3-1 por partes, se realizó la amplificación de los dos primeros fragmentos y se mandaron a secuenciar, al realizar el análisis bioinformático el fragmento 1 del gen del gen Lac 3-1 de la cepa HEMIM-51 tuvo 75.3% de identidad con *P. sanguineus* y el fragmento 2 87% de identidad con *P. sanguineus*, al unir estos dos fragmentos y realizar un BLAST se obtuvo que presentaban un 80% de identidad con *P. sanguineus* pero aún faltaba el fragmento 3, este no se logró amplificar con los oligos diseñados por Coronel, así que se diseñó un nuevo oligo FL4 pero no se obtuvo la banda esperada de 500 pb si no una banda de 250pb que al hacerle un BLAST este no alineó con ninguna especie de *Pycnoporus*, se realizaron distintos experimentos probando diferentes temperaturas y cantidad de ADN sin obtener la banda esperada de 536pb. De acuerdo al fragmento 1 y 2 se podría creer que la cepa HEMIM 51 pertenece a *Pycnoporus sanguineus*.

## 9. CONCLUSIÓN

- Se lograron estandarizar las condiciones de extracción de ADN de la cepa HEMIM-51 extrayendo el ADN al quinto día cuando el micelio es blando y aun no cubre toda la caja Petri.
- Se realizó la amplificación del fragmento 1 de 566 pb de la cepa HEMIM-51 el cual tiene un porcentaje de identidad del 75.37% con la cepa FJ858751.1 con 2125 pb de la base de datos del NCBI, así mismo se amplificó el fragmento 2 de 584 pb de la cepa HEMIM-51 el cual posee un 87.07% de identidad con la cepa EU678780.1 con 1643pb ambas cepas pertenecientes a la especie *P.sanguineus* los cuales indican que la cepa HEMIM-51 podría pertenecer a esta especie, sin embargo, del tercer fragmento se amplificaron únicamente 250 pb las cuales no alinearon con ninguna especie dentro del sistema de datos del NCBI, falta por amplificar 286 pb del 3 fragmento para tener mayor seguridad ya que se cree que esta última parte podría ser la decisiva para la determinación de la especie.
- Es importante conocer la secuencia del fragmento 3 para lograr la identificación total de la cepa HEMIM 51.

## 10. PERSPECTIVAS

Debido a que en este trabajo no se han logrado obtener los resultados esperados utilizando el método de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para mi proyecto de maestría se propone realizar una metagenoteca utilizando cepas control que fueron donadas al Laboratorio de estructura función e ingeniería de proteínas.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Acosta-Urdapilleta, L., Alonso, P., Rodríguez, A., Adame, M., Salgado, D., Salgado, J., ... & Villegas, V. (2010). *Pycnoporus sanguineus*, a fungus having biotechnological potential. Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en latinoamérica: avances y perspectivas en el siglo XXI, 189-220.

Arfi, Y., Levasseur, A., & Record, E. (2013). Differential gene expression in *Pycnoporus coccineus* during interspecific mycelial interactions against different competitors. Applied and environmental microbiology, AEM-02316. DOI: 10.1128/AEM.02316-13

Aro, N., Pakula, T., & Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS microbiology reviews, 29(4), 719-739. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.006>

Batallas Molina, R. D. C. (2016). Caracterización morfológica y molecular de cuatro especies de macrohongos comestibles y medicinales en zonas de cultivo de la comunidad kichwa de oglán-pastaza, ecuador. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/25147>

Begerow, D., Beate, J. O. H. N., & Oberwinkler, F. (2004). Evolutionary relationships among  $\beta$ -tubulin gene sequences of basidiomycetous fungi. Mycological research, 108(11), 1257-1263. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001066>

Cappello S. 2006. Hongos del YUMKA Guía Ilustrada

Diaz M.. M, 2013 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Pycnoporus sanguineus*. Tesis de Licenciatura facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos

Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F., & Eriksson, K. E. L. (1995). Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. FEBS letters, 376(3), 202-206. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01274-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01274-9)

Eggert, C., Temp, U., & Eriksson, K. E. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. Applied and Environmental Microbiology, 62(4), 1151-1158. <https://aem.asm.org/content/62/4/1151.short>

Fengel, D., & Wegener, G. (1984). Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter, 613, 1960-82. [https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=x1B4uITKnt0C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Fengel,+D.,+%26+Wegener,+G.+\(1984\).+Wood:+Chemistry,+ultrastructure,+reactions.+Walter+de+Gruyter,+613,+1960-](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=x1B4uITKnt0C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Fengel,+D.,+%26+Wegener,+G.+(1984).+Wood:+Chemistry,+ultrastructure,+reactions.+Walter+de+Gruyter,+613,+1960-)

82.&ots=ee6X29Tt1Y&sig=tkM\_D5Umy6Q6rYmG8sPYeu38q44&redir\_esc=y#v=onepage&q&f=false

Fernández, J.A.; Henao, L.M.; Pedroza Rodríguez, A.M.; Quevedo Hidalgo, B. 2009. Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. rev. col. biotecn. 11(1):59-72. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77612900007.pdf>

Forte, S., Polak, J., Valensin, D., Taddei, M., Basosi, R., Vanhulle, S., ... & Pogni, R. (2010). Synthesis and structural characterization of a novel phenoxazinone dye by use of a fungal laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63(3-4), 116-120. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.12.018>

García, J. M. C. (2015). Utilización de hongos de podredumbre blanca en la producción de pasta de celulosa de alto rendimiento (Doctoral dissertation). <https://eprints.ucm.es/id/eprint/32794/>

Garzón Grajales, N. Caracterización e identificación molecular de hongos de suelo aislados de los páramos de Guasca y Cruz Verde, Cundinamarca-Colombia (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias). <http://hdl.handle.net/10554/14584>

Gilbertson, R. L., & Ryvarden, L. (1987). North American Polypores Vol. 2. Megasporoporia-Wrightoporia. *North American Polypores Vol. 2. Megasporoporia-Wrightoporia.*, 437-885. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19881342865>

Gill, M y Steglich, W. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Editorial Springer-Verlag, New York, 1987, p. 208.

Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical microbiology reviews*, 12(3), 454-500. DOI: 10.1128/CMR.12.3.454

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... & Lumbsch, H. T. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5), 509-547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>

Iracheta-Cárdenas, M. M., Rocha-Peña, M. A., Galán-Wong, L. J., Arévalo-Niño, K., & Tovar-Herrera, O. E. (2016). A *Pycnoporus sanguineus* laccase for denim bleaching and its comparison with an enzymatic commercial formulation. *Journal of environmental management*, 177, 93-100.  
Le Roes-Hill, M., Goodwin, C., & Burton, S. (2009). Phenoxazinone synthase: what's in a name?. *Trends in biotechnology*, 27(4), 248-258. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.04.008>

Lesage-Meessen, L., Haon, M., Uzan, E., Lévasseur, A., Piumi, F., Navarro, D., ... & Lomascolo, A. (2011). Phylogeographic relationships in the polypore fungus *Pycnoporus* inferred from molecular data. *FEMS microbiology letters*, 325(1), 37-48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02412.x>



Li, K., Horanyi, P. S., Collins, R., Phillips, R. S., & Eriksson, K. E. L. (2001). Investigation of the role of 3-hydroxyanthranilic acid in the degradation of lignin by white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme and microbial technology*, 28(4-5), 301-307. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00332-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00332-X)

Loaiza Quizhpe, E. M. (2016). Extracción del pigmento natural del hongo *Pycnoporus sanguineus* como colorante orgánico para teñido en fibras de algodón (Bachelor's thesis, Quito: UCE). <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/7187>

Lomascolo, A., Cayol, J. L., Roche, M., Lin, G. U. O., Robert, J. L., Record, E., ... & Asther, M. (2002). Molecular clustering of *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monokaryotic strains for laccase hyperproduction. *Mycological Research*, 106(10), 1193-1203. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006494>

Martínez-Carrera D., Morales P., Sobal M., Bonilla M., Martínez W. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles 6.1:20. <http://www.biomichel.com/Interes/Comercializacion/15.pdf>

Munsell. 2011. Munsell Color Book Plant Tissue Color Charts to define color through precise color validation systems. X-RIDE Word Headquarters Grand Rapids, Michigan USA.

Oda, Y., Adachi, K., Aita, I., Ito, M., Aso, Y., & Igarashi, H. (1991). Purification and properties of laccase excreted by *Pycnoporus coccineus*. *Agricultural and biological chemistry*, 55(5), 1393-1395. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.55.1393>

Orlikowska, M., Rostro-Alanis, M. D. J., Bujacz, A., Hernández-Luna, C., Rubio, R., Parra, R., & Bujacz, G. (2018). Structural studies of two thermostable laccases from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. *International journal of biological macromolecules*, 107, 1629-1640. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.024>

Ortiz, M. L. (2009). Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquia*, 13(2).

Pérez-Silva E., Aguirre-Costa E., Pérez-Amador C. 1988. Aspectos sobre el uso y la distribución de *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae) en México. *Revista Mexicana de Micología*. 4: 137-144.

Pineda-Insuasti, J. A., Gómez-Andrade, W. E., Duarte-Trujillo, A. S., Soto-Arroyave, C. P., Pineda-Soto, C. A., Fierro-Ramos, F. J., ... & Álvarez-Ramos, S. E. (2017). Producción de *Pycnoporus spp.* y sus metabolitos secundarios: Una revisión. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51(2), 60-69. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223154251010.pdf>

Pompa A., Aguirre E., Encalada A., Cifuentes A., Valenzuela R. 2011. Los macromicetos del jardín botánico de ECOSUR “Dr. Alfredo Barrera Marin” Puerto Morelos, Quintana Roo. [https://www.researchgate.net/profile/Ricardo\\_Valenzuela3/publication/259564244\\_Los\\_Macrom](https://www.researchgate.net/profile/Ricardo_Valenzuela3/publication/259564244_Los_Macrom)

icetos\_del\_Jardin\_Botanico\_de\_ECOSUR\_Dr\_Alfredo\_Barrera\_Marin\_Puerto\_Morelos\_Quinta\_na\_Roo/links/0f31753a83513adda2000000.pdf

Ramírez-Cavazos, L. I., Junghanns, C., Nair, R., Cárdenas-Chávez, D. L., Hernández-Luna, C., Agathos, S. N., & Parra, R. (2014). Enhanced production of thermostable laccases from a native strain of *Pycnoporus sanguineus* using central composite design. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 15(4), 343-352. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1300246>

Ramírez-Cavazos, L. I., Junghanns, C., Ornelas-Soto, N., Cárdenas-Chávez, D. L., Hernández-Luna, C., Demarche, P., ... & Parra, R. (2014). Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 108, 32-42. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.06.006>

Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Delgado-Boada, J. M. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, 27(3-4), 67-82. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>

Ryvarden L. 1991 – Genera of polypores: nomenclature and taxonomy. Oslo. Norway. *Synopsis Fungorum* 5, 1-363. <https://ci.nii.ac.jp/naid/20001007693/>

Rojas, J., & Hormaza, A. (2016). Evaluación de la biodegradación del colorante azul brillante utilizando hongos de la podredumbre blanca y sus consorcios. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 19(1), 179-187. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-42262016000100021&script=sci\\_abstract&tlng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-42262016000100021&script=sci_abstract&tlng=en)

Rosa, L. H., Machado, K. M. G., Jacob, C. C., Capelari, M., Rosa, C. A., & Zani, C. L. (2003). Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7), 967-974. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000700019>

Schliephake, K., Mainwaring, D. E., Lonergan, G. T., Jones, I. K., & Baker, W. L. (2000). Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1-2), 100-107. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00181-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00181-2)

Shi, C., Zhu, N., Cao, Y., & Wu, P. (2015). Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by the intracellular protein extract of *Pycnoporus sanguineus* and its catalysis in degradation of 4-nitroaniline. *Nanoscale research letters*, 10(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0856-9>

Solé Ollé, M. Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden onygenales (Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili). <http://hdl.handle.net/10803/8712>

Téllez-Téllez, M., Villegas, E., Rodríguez, A., Acosta-Urdapilleta, M. L., O'Donovan, A., & Diaz-Godinez, G. (2016). Mycosphere Essay 11: Fungi of *Pycnoporus*: morphological and molecular identification, worldwide distribution and biotechnological potential. *Mycosphere*, 7, 1500-1525. [https://www.mycosphere.org/pdf/Mycosphere\\_SI\\_3b\\_3.pdf](https://www.mycosphere.org/pdf/Mycosphere_SI_3b_3.pdf)

Tomšovský, M., Kolařík, M., Pažoutová, S., & Homolka, L. (2006). Molecular phylogeny of European *Trametes* (Basidiomycetes, Polyporales) species based on LSU and ITS (nrDNA) sequences. *Nova Hedwigia*, 82(3-4), 269-280. [https://www.researchgate.net/profile/Michal-Tomsovsky/publication/207538671\\_Molecular\\_phylogeny\\_of\\_European\\_Trametes\\_Basidiomycetes\\_Polyporales\\_species\\_based\\_on\\_LSU\\_and\\_ITS\\_nrDNA\\_sequences/links/54b387960cf220c63cd283b7/Molecular-phylogeny-of-European-Trametes-Basidiomycetes-Polyporales-species-based-on-LSU-and-ITS-nrDNA-sequences.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Michal-Tomsovsky/publication/207538671_Molecular_phylogeny_of_European_Trametes_Basidiomycetes_Polyporales_species_based_on_LSU_and_ITS_nrDNA_sequences/links/54b387960cf220c63cd283b7/Molecular-phylogeny-of-European-Trametes-Basidiomycetes-Polyporales-species-based-on-LSU-and-ITS-nrDNA-sequences.pdf)

Van Heerden, A., Le Roux, N. J., Swart, J., Gardner-Lubbe, S., & Botha, A. (2008). Assessment of wood degradation by *Pycnoporus sanguineus* when co-cultured with selected fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 2489-2497. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9773-8>

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322. <https://msafungi.org/wp-content/uploads/2019/03/February-2013-Inoculum.pdf>

Cuernavaca, Morelos a 25 de enero de 2021

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **María Luisa Montaña Morales**, con el título del trabajo: **Identificación molecular de la cepa HEMIM 51 utilizando como marcador molecular el gen Lacasas.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: M. EN C. MA. DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: M. EN C. MARÍA LUISA BARROSO GARCIA

\_\_\_\_\_

VOCAL: DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DR. GERARDO DÍAZ GODINEZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: M. EN B. MARIEL ADAME ROMAN

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MARIEL ADAME ROMÁN | Fecha:2021-01-27 13:51:49 | Firmante**

RhT3pfJeZZJFIaidwa4yya0isGYGoK3+6ElduaNkTLrSm3BrCxHolQUPSkty3HsB6MuQELtUwVQ/m/Qp39GvrnkBYM9IG/BR9PzBMPC41K6LjwK4tgSwQy5VE1Zx74ww3t9CW  
WZeqN5QKF90nWT3yAQKArWdrGoZIIgcrJ4onSsFlp0/Nza9Jm1YgFJJhv3W0y4MvBQ2/PNcet9f0GH0Njx8S7MkYXRgs1a3wFY9aolTv8xdQYH/+6oh7HjFW447ZTeGVUuxmR  
N/w5MgPitAMhb8O1Ho2M3eaVmxhxd+yHdTOBMXLWOFuJ7Ho4v+JuKUmXHRbwYtCR6EKLqW/Gt+Q==

**ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL | Fecha:2021-01-28 15:36:28 | Firmante**

mCMeb4UL8ljwAInHBnp/KZYh5H08qd+NBSwszR1epegjc4wRIRBEh10XZPLIZIsVFc9PeUtvUJ4YHCp8yzV9kkHs9CjZKGTcinP40q9KSzH7TtMs/Imp40s783e5zmHMUKd0MG  
9RaNIICn9p40YQuKt13nAZGdT8MqevFrE3R/AWII8CvsrlzgzWwIYeyZ7E8SZFek9MoBOX9Xr/XOf05TIEv2nQz8guBUyuWSP8PJ8tXhbfnY9zXmDEsvDitCEIJNqhfVOXCI7L  
//RZx6QbUt2lkadzPfazC5nwyzebPNlwgmyDWuZm4cdc/V0z7EK3xD9uGdQ6PiyW8FMd0qg==

**MARIA LUISA BARROSO GARCIA | Fecha:2021-01-28 19:07:37 | Firmante**

BPudnP08IObIUAHLuNmXx9uRQCjIJOVqCfybfFjGhyK3f7/M3c/5Oh42ZqSePUHmrk19bQTwtf5h8HjESrBhL/2AuVx2b/O9jFg3WoVoc8ZBGdeppREbEHYOX9+JpSAZ8xHOotgz  
XgtlLTUkVutoYf7GGO6ykZZUDSvZGE0pM11p5rLzPBTub9nVRht2YsuvkHYgrJl6OGTHT/32vk38ly6BGHB+JUOyTIO8c4G5N0+PhiUM7NUTJxxMSYN2CGL0sdyteJT/UM9SwP5  
blQRn4LzXUY3rGN/6ac8HD5U2MDcq58Jf0tyy3NB17A/OMB7XUtGBBslwPwcS21/U832W6w==

**MA DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA | Fecha:2021-02-01 09:35:50 | Firmante**

nkIvg/nolMDOkObG8Br0STzBMRv2e2QepchBgW26v+P23BPBVj2ctTJ/0vpc+excn/Yv5fCFy6wJoatVJ+T6loy29FV9yJAQzXPcuBVILyL1FWnNnyWHWm/ugOjoFyZEo0PMjTSsm  
1B9siicsbdt9onTu9V44zI+oje9VQ5A7ctnF2DeSRp0OE5RY1Feoug97R4NZ+JK2X/sDSvqcKQ7jAyutJnGdMGg/OI7xT5pHYJJgITONutYUXWZ+3OQAWAxIC0ZpMslRMLzLkX  
BVhQEExjeNbmju44t0rXUpSuNPZTCuaV9kfUKinEU84LiBARzytdPlybPYitBVuwXcQ==

**GERARDO DÍAZ GODÍNEZ | Fecha:2021-02-01 21:32:08 | Firmante**

gd6u+ohhZy5uPiCSsMRMg0a6MJ7W/vwVJ9i4BuFcoX6dfhxIwH+qyRnxexvDvuum4bVfS1OxcDFe3/GbwUspwIFtQK1V6tyv19us3AG8VsxIYHRSRqqEYv61jMIAtNtTrWZUnGMk  
gMN8tX2fWtU3roL0xtncugHWh1qGj4ST0SzuGg4LWDKCOsMbJYODNTObE5AyH693vtVq8coxrc4goQAOKdsEYE9HoTobprMtr0PkkAvsz9A+hhqvwuu9/rXs7VmN0/LE1Bsf16c  
uqurXiAHRepNCdeC5golQdlZR04TIJfdQSBscAnS3PvcS611tLtlgicDwM8zZFh0pcbQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



P5qgel

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vkerVzMCYk8PqNKV6b1jRcanaYfotsp5>

