

Universidad Pública de Navarra

*Nafarroako Unibertsitate Publikoa*

ESCUELA TECNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRONOMOS

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN  
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA*

**Expresión génica de peroxidasas ligninolíticas en *Pleurotus ostreatus*:  
regulación por temperatura y pH.**

presentado por

RAÚL CASTANERA ANDRÉS

GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL

MENCIÓN EN HORTOFRUTICULTURA, JARDINERÍA Y PAISAJE

Junio, 2014

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a Lucía Ramírez y a Gerardo Pisabarro la oportunidad que me han dado de realizar este trabajo en el grupo de investigación en Genética y Microbiología de la Universidad Pública de Navarra.

También quiero dar las gracias todos los compañeros del grupo por los buenos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

## ABSTRACT

*Pleurotus ostreatus* is an edible mushroom of special relevance in biotechnology due to its natural ability to degrade lignin. Its genome contains nine genes of ligninolytic peroxidases, characteristic of the white-rot fungi. These genes encode six manganese peroxidase (MnP) and three versatile peroxidase (VP) isoenzymes. The effect of environmental parameters on the expression of the above nine genes was studied by reverse transcription-quantitative PCR by changing the incubation temperature and medium pH of *P. ostreatus* cultures. The cultures maintained at 25 °C provided the highest levels of peroxidase transcripts, being *mnp3* and *vp1* the genes showing the predominant transcripts. The global analysis of the expression patterns divided peroxidase genes into three main groups according to their co-expression patterns. Decreasing or increasing the incubation temperature (to 10 °C or 37 °C) and adjusting the culture pH to acidic or alkaline conditions (pH3 and 8) generally led to downregulation of most of the peroxidase genes, as shown when the transcription levels were referred to those found in the cultures maintained at the optimal conditions. Interestingly, *mnp4* and *mnp5* were the only peroxidase genes upregulated under alkaline pH conditions. The differential behaviour of peroxidase genes to temperature and pH stress suggests that they could be the result of an adaptive response to environmental conditions.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, peroxidases, gene expression, lignin, RT-qPCR

## RESUMEN

*Pleurotus ostreatus* es un hongo comestible de gran importancia biotecnológica por ser un organismo modelo degradador de lignina. Su genoma contiene nueve genes codificantes de peroxidadas ligninolíticas, características de los hongos de podredumbre blanca. Estos genes codifican seis manganeso peroxidadas (MnP) y tres peroxidadas versátiles (VP). En este estudio se ha analizado el efecto de las condiciones ambientales en la expresión de estos nueve genes mediante RT-PCR a tiempo real, modificando la temperatura y el pH de los cultivos. Los cultivos mantenidos a 25°C mostraron los mayores niveles de transcrito, siendo *mnp3* y *vp1* los genes con expresión predominante. El análisis de los perfiles globales de transcripción agrupó las peroxidadas en tres grupos en base a su perfil de co-expresión. El aumento o disminución de la temperatura (de 10°C a 37°C) y el pH (de pH3 a pH8) produjo una represión en la mayoría de genes con respecto a las condiciones óptimas (25°C, pH 5.5). Cabe destacar que los genes *mnp4* y *mnp5* fueron los únicos sobreexpresados en condiciones alcalinas. La respuesta diferencial a estrés térmico y de pH de los genes codificantes de peroxidadas sugiere que los mismos constituyen una respuesta adaptativa a las condiciones ambientales.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*, peroxidadas, expresión génica, lignina, RT-qPCR

# ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	5
2.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
2.1.- Variedad de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	8
2.3.- Mantenimiento y expansión de la cepa.....	9
2.4.- Cultivos para obtención de ARN.....	9
2.5.- Aplicación de condiciones variables de pH y temperatura.....	9
2.6.- Extracción de ARN y retrotranscripción.....	9
2.7.- Análisis mediante PCR de la especificidad de los cebadores.....	10
2.8.- RT-PCR a tiempo real.....	10
2.9.- Diseño de cebadores.....	11
2.10.- Validación de genes de referencia.....	11
2.11.- Alineamiento de secuencias mediante BLASTN.....	11
2.12.- Procesado de datos y estrategias de cuantificación de la expresión génica.....	11
2.13.- Diseño experimental.....	13
2.14.- Análisis estadístico.....	14
3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
3.1.- Diseño de cebadores.....	15
3.2. Identificación y validación de genes de referencia para la RT-qPCR.....	16
3.3.- Análisis del perfil de expresión génica de las peroxidasas ligninolíticas de <i>P.ostreatus</i> .....	19
3.4.- Efecto de los choques de temperatura y pH en la expresión de las peroxidasas ligninolíticas de <i>P.ostreatus</i> .....	21
4- CONCLUSIONES .....	24
5.- BIBLIOGRAFÍA.....	25

## 1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos unicelulares y pluricelulares pertenecientes al Dominio Eucariota y al Reino Fungi (Cavalier-Smith, 1998). Basándose en datos moleculares, las especies que lo componen han sido clasificadas en cinco divisiones: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota y Zygomycota (Hawksworth *et al.*, 1995). *Pleurotus ostreatus* pertenece a la división Basidiomycota, y posee una gran importancia en el sector alimentario ya que su producción ocupa el segundo lugar a nivel mundial en setas cultivadas (Sanchez, 2010). *P.ostreatus* pertenece también al grupo de hongos de la podredumbre blanca, denominados así por el aspecto blanquecino que toma la madera tras ser atacada por ellos. Por su forma de vida y alimentación, los hongos digieren extracelularmente los sustratos donde crecen, excretando las enzimas apropiadas e incorporando los nutrientes en pequeñas partículas a través de su pared celular. De este modo, su capacidad para utilizar ciertas sustancias como alimento depende en gran medida de las enzimas que son capaces de producir (Jennings & Lysek, 1996). Entre estas enzimas se encuentran varias isoformas de oxidasas y peroxidasas, enzimas inespecíficas que pueden oxidar un amplio espectro de sustratos estructuralmente diferentes (Hammel, 1989; Novotny *et al.*, 2001). Por su capacidad para producirlas, *P.ostreatus* ha despertado un gran interés industrial y biotecnológico en la última década. Diversos estudios han ensalzado el valor de estas enzimas en el pretratamiento enzimático de lignocelulosa para la producción de biocombustibles (Lee, 1997; Talebnia *et al.*, 2010), en la degradación de compuestos químicos recalcitrantes y generalmente tóxicos como hidrocarburos poli-aromáticos (Baldrian *et al.*, 2000), plaguicidas (Bending *et al.*, 2002), tintes (Wesenberg *et al.*, 2003), en el biopulpado y bioblanqueo de la industria del papel (Jha & Patil, 2011; Koshy & Nambisan, 2011; Villalba *et al.*, 2006), o en la biorremediación de contaminantes en suelos y aguas (Eggen & Majcherczyk, 1998; Novotny *et al.*, 2001). De entre estas aplicaciones, su uso en el pretratamiento de biomasa lignocelulósica ofrece grandes expectativas para conseguir reducir el coste de la producción de bioetanol de segunda generación. Esto se debe a que los residuos herbáceos y leñosos derivados de las prácticas agrícolas y forestales suponen el material crudo mas abundante en la naturaleza (Lee, 1997), estimado en 200 billones de toneladas anuales (Ragauskas *et al.*, 2006). El proceso clave para el uso de la biomasa lignocelulósica es la eliminación de la lignina, un heteropolímero muy resistente a la degradación química y biológica que ofrece a las plantas resistencia frente al ataque microbiano y al estrés mecánico (Higuchi, 1990). Actualmente este proceso se realiza mediante tratamientos físico-químicos energéticamente muy costosos. La búsqueda de biocatalizadores que sustituyan estos procesos se ha centrado actualmente en algunas enzimas fúngicas como las peroxidasas (EC 1.11.1.7) y lacasas (EC 1.10.3.2), ya que son capaces de delignificar eficientemente

la madera. Del interés por estas enzimas ha surgido la necesidad de conocer más acerca de la regulación genética de estas proteínas en los organismos que las producen. En este sentido, las nuevas plataformas de secuenciación y análisis genómico han permitido avanzar enormemente en el conocimiento sobre estas enzimas. A raíz de la secuenciación de hongos de como *Phanerochaete chrysosporium* (Martinez *et al.*, 2004), *Postia placenta* (Martinez *et al.*, 2009), *Ceriporiopsis Subvermispora* (Fernandez-Fueyo *et al.*, 2012a) o *Pleurotus ostreatus* entre otros, se ha podido conocer la multiplicidad y aparente redundancia de estas enzimas en los genomas de hongos basidiomicetos. Además, se han podido asociar baterías específicas de enzimas a grupos determinados de hongos en función de su patrón de degradación de lignina (Fernandez-Fueyo *et al.*, 2012b; Floudas *et al.*, 2012), ya sea de podredumbre blanca (producen una degradación total de la lignina) o de podredumbre parda (producen una modificación parcial de la lignina). En el caso de *P.ostreatus*, las enzimas involucradas en dicha degradación son las lacasas (Lac; EC 1.10.3.2), manganeso peroxidasas (MnP; EC 1.11.1.13) y peroxidasas versátiles (VP; EC 1.11.1.16). MnP y VP pertenecen al grupo de las peroxidasas ligninolíticas (POD) junto con las lignina peroxidasas (LiP; EC 1.11.1.14). Sin embargo, estas últimas están ausentes en el genoma de *P.ostreatus*. A diferencia de las lacasas, las peroxidasas ligninolíticas no se encuentran ni en los genomas de hongos de podredumbre parda ni en hongos patógenos (Floudas *et al.*, 2012), y juegan un papel central en la degradación de lignina. Además, son muy abundantes en los hongos de podredumbre blanca. Las peroxidasas ligninolíticas de *P.ostreatus* han sido recientemente caracterizadas desde el punto de vista bioquímico y genómico en *P.ostreatus* (Fernandez-Fueyo *et al.*, 2014; Ruiz-Dueñas *et al.*, 2011) y actualmente se sabe que poseen múltiples isoformas codificadas por genes pertenecientes a familias multigénicas. Concretamente, los estudios *in silico* realizados sobre el genoma revelaron la presencia de cinco genes codificantes de MnP y cuatro genes codificantes de VP (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2011) distribuidos en 5 de los 11 cromosomas de *P.ostreatus* (Fig 1). Si embargo, estudios más recientes (Fernandez-Fueyo *et al.*, 2014) reclasificaron una VP como MnP (*mnp1* en el presente estudio). La explicación biológica de la multiplicidad de estas isoenzimas podría radicar en la regulación diferencial de su transcripción. Estudios previos llevados a cabo en otras familias multigénicas relacionadas como las lacasas de *P.ostreatus* han demostrado que diferentes isoformas se sobreexpresan o se reprimen al modificar las condiciones de cultivo (Castanera *et al.*, 2012; Castanera *et al.*, 2013; Parenti *et al.*, 2013). La regulación de la transcripción y actividad enzimática de las enzimas MnP y VP ha sido estudiada en diferentes medios de cultivo suplementados con  $Mn^{2+}$  y peptona (Cohen *et al.*, 2002; Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999). Dado que las diferentes isoformas purificadas de MnP y VP presentan actividades catalíticas y propiedades de estabilidad diferentes frente a rangos de pH y temperatura (Fernandez-Fueyo *et al.*, 2014), cabe pensar que los diferentes genes podrían estar regulados *in vivo* por dichos factores. Así, los genes que

controlan la producción de estas enzimas podrían activarse o inhibirse como respuesta a diferentes señales que ayudarían al organismo a adaptarse mejor a las condiciones ambientales.

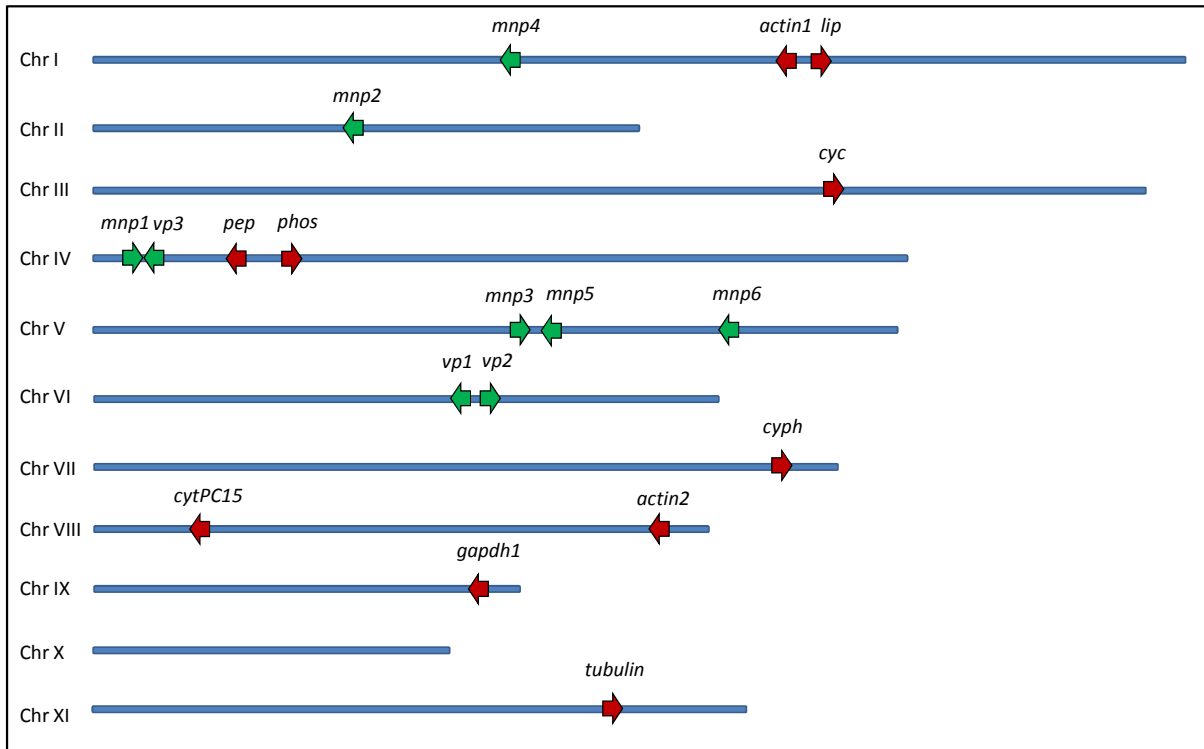


Figura 1. Localización cromosómica de las peroxidasa ligninolítica (en verde) y de los genes de referencia (en rojo) analizados en el presente estudio.

La forma de analizar el comportamiento de estos genes es cuantificado su actividad transcripcional en diferentes condiciones de cultivo. Tradicionalmente para ello se han utilizado técnicas como el Northern blot, el ensayo de protección de RNAsas, la supresión por hibridación sustractiva SSH y la RT-PCR. Posteriormente aparecieron técnicas más modernas para el estudio de la expresión génica como la RT-qPCR (o RT-PCR a tiempo real), la PCR-digital (Vogelstein & Kinzler, 1999), la secuenciación de ESTs, la tecnología SAGE y el RNAseq. La RT-qPCR fue puesta a punto en 1993 (Higuchi *et al.*, 1993), y se considera como el estándar más fiable para validar los resultados de otros métodos como los basados en secuenciación (Ej:RNA-seq) o hibridación (microarrays). La RT-qPCR combina la amplificación exponencial de un transcrito específico mediante PCR (convertido a ADNc por retrotranscripción), con la monitorización del nuevo ADN sintetizado en cada ciclo mediante detección óptica. En función de los objetivos del estudio se pueden llevar a cabo diferentes estrategias de cuantificación: absoluta y relativa. En la primera se relaciona la señal obtenida en la PCR con una curva de calibración externa, obteniendo una estimación del número de



copias de ARN mensajero (ARNm). En la segunda se miden los cambios relativos en la expresión de un gen en diferentes condiciones sin llegar a conocer el número de copias de ARNm. Entre las ventajas de esta técnica cabe destacar que es muy sensible y muestra una elevada especificidad así como un amplio rango de cuantificación. Además, con ella se puede procesar un elevado número de muestras en paralelo y con rapidez. Sin embargo, sufre de los problemas inherentes a la RT y a la PCR, como la presencia de productos inespecíficos, dímeros de primers o la amplificación con eficiencias variables (Freeman *et al.*, 1999). En el caso de la cuantificación absoluta la fiabilidad depende exclusivamente de la precisión de los estándares empleados (Pfaffl, 2004), mientras que en el caso de la cuantificación relativa, esta se ve tremendamente afectada por la elección de los genes de referencia que actúan como controles endógenos (Baker, 2011; Bustin *et al.*, 2009). Estos genes son escogidos porque su expresión es constante en todas las condiciones del estudio y eliminan la variación entre muestras debida a errores de pipeteo, degradación diferencial de las muestras de ARN, inhibición en la retrotranscripción, etc. En este sentido, múltiples estudios ponen de manifiesto la necesidad de validar experimentalmente los genes de referencia antes de ser utilizados (Bustín *et al.*, 2009). Para ello se han publicado varios algoritmos como GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) y Bestkeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), que resultan muy útiles para determinar la estabilidad de la expresión de genes de referencia candidatos. En este trabajo se ha analizado la respuesta transcripcional frente a pH y temperatura de las peroxidasas ligninolíticas de *P.ostreatus*. Los análisis de transcripción se han llevado a cabo en paralelo con otros ensayos de proteómica realizados por el grupo de investigación de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid. Los objetivos de este trabajo son: i) analizar la expresión diferencial de las peroxidasas ligninolíticas de *P.ostreatus* en un medio con lignocelulosa como única fuente de carbono; ii) detectar grupos de genes con perfiles de expresión similares ante diferentes condiciones ambientales; iii) estudiar la respuesta de las peroxidasas ligninolíticas ante cambios de temperatura y pH, para comprobar si existe una relación entre la estabilidad *in vitro* de dichas enzimas y la transcripción *in vivo* frente a los mismos rangos de pH y temperatura.

## **2.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1.- Variedad de *Pleurotus ostreatus*.**

En este estudio se empleó la cepa PC9 del hongo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* var. *florida* (Colección Española de Cultivos Tipo, número de acceso CECT-20311). Se trata de una cepa monocariote (contiene un sólo núcleo en cada célula),

obtenida por dicarionización a partir de la cepa dicarionte comercial N001 (CECT-20600) (Larraya *et al.*, 1999). Las secuencias genómicas de los dos monocariontes que constituyen dicha cepa (PC9 y PC15) se encuentran disponibles en (<http://genome.jgi-psf.org>).

### **2.3.- Mantenimiento y expansión de la cepa.**

El crecimiento y mantenimiento de la cepa se realizó en placas Petri con medio sólido PDA (24 g de caldo de patata-dextrosa y 15 g de agar por litro) a 25°C y en oscuridad.

### **2.4.- Cultivos para obtención de ARN.**

Los cultivos para obtener ARN se llevaron a cabo utilizando un sistema de fermentación semisólida basado en material lignocelulósico. La fermentación se realizó en frascos de vidrio con una relación superficie/volumen de  $1 \text{ cm}^{-1}$ , en un medio de cultivo que contenía 5g de una mezcla de virutas de chopo y paja de trigo de 4 mm (ratio 1:1) y 35 mL de agua destilada (pH final de 5.5).

### **2.5.- Aplicación de condiciones variables de pH y temperatura.**

Las condiciones óptimas de temperatura en las que se mantenían los cultivos (25°C) se modificaron hasta 10°C y 37°C en las cámaras de cultivo. La modificación del pH consistió en ajustar a pH3 y pH8 los cultivos añadiendo buffer Brighton&Robin (BRB) 0.2 M pH2 y pH9, respectivamente.

### **2.6.- Extracción de ARN y retrotranscripción.**

El micelio procedente de tres replicas biológicas se recolectó, mezcló y molió en un mortero estéril en presencia de nitrógeno líquido y se conservó a -80 °C. El ARN total se extrajo de 200 mg de muestra usando el kit comercial de extracción E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Fungal RNA (Omega Bio-Tek, Norcross, GA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para evitar la presencia de ADN genómico en las muestras se realizó un tratamiento con DNasa I (Promega, Madison, WI). La concentración de ARN fue medida usando un espectrofotómetro NanoDrop<sup>TM</sup> 2000 (Thermo-Scientific, Wilmington, DE) y la pureza de las muestras se estimó por la relación de absorbancia 260/280 nm. Posteriormente las muestras se purificaron y concentraron usando el kit comercial RNeasy® MinElute® Cleanup (Qiagen® Iberia S.L., Madrid, España), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras la purificación del ARN se reevaluó la

concentración y la pureza de las muestras. La integridad del ARN total obtenido se analizó mediante electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa al 1% (peso/volumen). Se consideró que el ARN estaba degradado si no se distinguían nítidamente las bandas correspondientes al ARN ribosomal 28S y 18S (descartando en ese caso la muestra y repitiendo el proceso de extracción). Para la reacción de retrotranscripción se utilizaron 1000 ng de ARN total en un volumen de 20 µl usando el kit comercial iScript™ ADNc Synthesis (BIO-RAD Laboratories S.A., Alcobendas, España). La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc). El protocolo consistió en 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C. Posteriormente el ADNc se diluyó a una concentración 1:20 para su uso en la RT-qPCR y se conservó a -20° C.

## **2.7.- Análisis mediante PCR de la especificidad de los cebadores.**

La PCR convencional se llevó a cabo en un termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc) sobre ADN genómico utilizando el siguiente protocolo: 4 min a 95 °C, 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 65 °C y 30 s a 72 °C. Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1.5 % y 1X de tinción *RedSafe*, y se corrieron durante 1h a 90V en buffer 1X Tris-Acetato-EDTA. La visualización de los productos de amplificación se llevó a cabo bajo luz ultravioleta. Las bandas se recortaron y se purificaron utilizando el Gel extraction Kit E.Z.N.A, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La productos de PCR se secuenciaron en Sistemas Genómicos (Paterna, Valencia).

## **2.8.- RT-PCR a tiempo real.**

Las reacciones de RT-PCR en tiempo real se realizaron en un termociclador CFX96™ Real-Time System C1000™ (Bio-Rad Laboratories, S.A.). Para detectar los productos de amplificación se usó SYBR Green. Cada reacción se ajustó a un volumen final de 20 µl que contenía: 10 µl iQ™ SYBR® Green Supermix (mezcla optimizada de iTaq™ ADN polimerasa, SYBR Green, dNTPs, buffer y estabilizadores) (Bio-Rad laboratories, S.A., Alcobendas, España), 2 µl de 3 µM de cada cebador (directo y reverso), 1 µl de ADNc de dilución 1:20 y 5 µl de agua estéril. El programa de amplificación fue el siguiente: 5 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 30 s a 63 °C, seguido de 1 min a 95 °C y una curva de disociación con incrementos de 0.5°C cada 5 s en un gradiente lineal desde 78 a 95 °C. La adquisición de los valores de fluorescencia se realizó a 78°C para eliminar los artefactos de PCR que pudieran aparecer en la cuantificación del ADNc. La corrección del ruido de fondo y la adquisición de los valores umbral de ciclo (C<sub>p</sub>, crossing point) se llevó a cabo usando el software Bio-Rad CFXManager. Las reacciones se llevaron a cabo en placas microtiter de 96 pocillos. Se añadió un control negativo (NTC, *No Template Control*) por cada

pareja de cebadores. Las eficiencias de amplificación se estimaron por regresión lineal a partir del historial logarítmico de fluorescencia registrado para cada muestra, utilizando el programa LinReg (Ramakers *et al.*, 2003).

## **2.9.- Diseño de cebadores.**

Los cebadores utilizados se diseñaron usando el programa *Primer3* (Koressaar & Remm, 2007) usando como molde los modelos de transcrito derivados de los genes predichos por el JGI para las nueve peroxidasa ligninolíticas (Tabla 1).

## **2.10.- Validación de genes de referencia.**

Se analizó en cinco muestras la expresión de diez genes del panel de referencia utilizado en nuestro grupo de investigación (Castanera *et al.*, En preparación), a las diferentes condiciones de T<sup>a</sup> y pH utilizadas en este trabajo. Se utilizaron los algoritmos NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) y GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) para analizar la estabilidad de la expresión de cada candidato, así como para obtener el número idóneo de genes de referencia a utilizar en los experimentos.

## **2.11.- Alineamiento de secuencias mediante BLASTN.**

Las secuencias correspondientes a los productos de PCR purificados se utilizaron como *query* en una búsqueda contra la base de datos de los modelos de *P. ostreatus* anotados por el JGI usando el programa BLASTN. Los resultados se analizaron manualmente para comprobar que cada producto de PCR se correspondía con el gen que se deseaba amplificar.

## **2.12.- Procesado de datos y estrategias de cuantificación de la expresión génica.**

El procesado de los datos se realizó usando el software GenEx (MultiD Analyses AB, <http://www.multid.se>) e incluyó, entre otros, la calibración de los valores Cp con la eficiencia de amplificación (Fórmula 1), la normalización con los genes de referencia (Fórmula 2), el cálculo de las cantidades relativas (Fórmula 3), y el cálculo de los ratios de expresión (Fórmula 4) de una muestra relativa a la muestra de referencia (condiciones control). Para estimar la cantidad diferencial de transcritos entre las muestras se llevó a cabo una cuantificación relativa, utilizando dos enfoques: i) cantidades relativas (RQ) de cada gen en comparación a un índice de referencia estable (fórmula 4), y ii) expresión relativa de cada gen en comparación con la muestra control usando el método delta-delta Cp (Livak & Schmittgen, 2001).

Fórmula 1:  $Cp_E = Cp_U \frac{\log(1+E)}{\log 2}$

Fórmula 2:  $\Delta Cp_E = Cp_{GOI} - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Cp_{RGI}$

Fórmula 3:  $RQ = 2^{-\Delta Cp_E}$

Fórmula 4:  $Expresión = 2^{-(\Delta Cp_E)}$

En estas ecuaciones  $Cp_E$  representa el Cp corregido con la eficiencia de amplificación.  $Cp_U$  es el Cp sin corregir, y E es la eficiencia de amplificación.  $\Delta Cp_E$  es el nivel de expresión de un gen en comparación al índice de referencia.  $Cp_{GOI}$  es el Cp corregido con la eficiencia del gen de interés y  $Cp_{RGI}$  es el Cp corregido con la eficiencia de cada gen de referencia. RQ (Cantidad relativa) es la forma lineal equivalente de  $\Delta Cp_E$ .

Tabla 1. Cebadores utilizados para la RT-qPCR, longitud del amplicón obtenido y eficiencia de la amplificación de las peroxidases y de los genes de referencia utilizados en este estudio.

Gen	Identificador			Secuencia	Longitud	Eficiencia
	PC15 <sup>a</sup>	PC9 <sup>b</sup>				
<b>Peroxidasas</b>						
<i>mnp1</i>	1096331	137760	Fw	CTACAGAAGAACTTGTTTCGACGAC	165	1,76
			Rv	GGCAGGGAAGTTAACCTCAGTAT		
<i>mnp2</i>	199510	137764	Fw	TGCTTCTCAAAGGAACGCTTGTGC	174	1,89
			Rv	CGAATCGCGAAACCATGAGCCTTT		
<i>mnp3</i>	1089546	137740	Fw	ATGGACAAGTTGGCTACACTCGGT	139	1,7
			Rv	CACACGCTTGCTCGATGTTGTTCA		
<i>mnp4</i>	1099081	121638	Fw	TCGGACAGAACCCAAAGAAGCTGA	127	1,85
			Rv	GCTTTGCGGCAGGATGCTCAATA		
<i>mnp5</i>	199511	137765	Fw	GCCGCGATGTTGAACTGTCTTTGG	171	1,85
			Rv	AGTCAAAGCGGGGAAAGGAGTAGC		
<i>mnp6</i>	1041740	51713	Fw	GCTATTGGATTCTCCCCTAAGCTCTT	81	1,86
			Rv	AGAGTGGCCATGATGGAACCATC		
<i>vp1</i>	1089895	137757	Fw	CTCCTGACAACAAGGGAGAAGTCC	198	1,89
			Rv	CAATCAGTTTGCTCTTGTCCTGG		
<i>vp2</i>	1113241	137766	Fw	TATCGCTCGTCACAACATCAGT	146	1,86
			Rv	CTGGGACAAGACCATCAGGTGGA		
<i>vp3</i>	156336	123383	Fw	TGGATTCTCTCCACCAAAG	195	1,84
			Rv	GGGCAGTTGGAAACACCTAA		
<b>Panel de Genes de referencia</b>						
<i>actin1</i>	1087906	114148	Fw	AGTCGGTGCCTTGGTTAT	129	1,83
			Rv	ATACCGACCATCACACCT		
<i>pep</i>	1092697	115017	Fw	TGATTCCAGAGGACAAGGACGCAA	148	1,7
			Rv	AAATCTTCCGCGATACGGGTCCT		
<i>cyph</i>	1058252	72928	Fw	GACATTGCTATCGACTCCAG	84	*
			Rv	GAAATTCCTTGCACTTTGGG		
<i>cyt</i>	1113744	112752	Fw	GCCTCATAAAGTCGGTCCTAAC	127	*
			Rv	CTCAAATAGGGTGTTCCTCGTCC		
<i>phos</i>	49987	49690	Fw	CATCGCAAATCATCGATCGCACCA	125	*
			Rv	GCTCTCCAGCCAATGCACCAATTT		
<i>lip</i>	1052421	75430	Fw	AGGTTTGGCGGGATAACAATACGGA	132	*
			Rv	ATGCAAGCATCATTTGCGCCGAAC		
<i>tubulin</i>	1091050	117235	Fw	AGGCTTTCTTGCAATTGGTACACGC	136	*
			Rv	TATTCGCCTTCTCCTCATCGGCA		
<i>cyc</i>	1035989	86026	Fw	ACCTGGCGTCGTTATCTCAAGTGT	122	*
			Rv	TTGGCCGAACAGCGAATGGTTTAC		
<i>actin2</i>	1114037		Fw	GCCGTGATCTTACCGACTA	134	*
			Rv	CTCCTGCTCAAAGTCCAA		
<i>gapdh1</i>	1090672	88005	Fw	TGGTCCATCGCATAAGGA	194	*
			Rv	ACACGGAAGGACAAACCA		

<sup>a,b</sup> Identificadores del modelo de transcrito correspondiente a la versión 2.0 de PC15 y la versión 1.0 de PC9 ([www.jgi.doe.gov](http://www.jgi.doe.gov)).

\* La eficiencia de estos genes no se ha determinado.

## 2.13.- Diseño experimental.

Se analizaron dos variables (temperatura y pH) a cuatro tiempos diferentes (1h, 6h, 12h y 24h), constituyendo los cuatro tratamientos de estudio (Figura 2). Se analizó el efecto que cada variable ejerció sobre la transcripción.

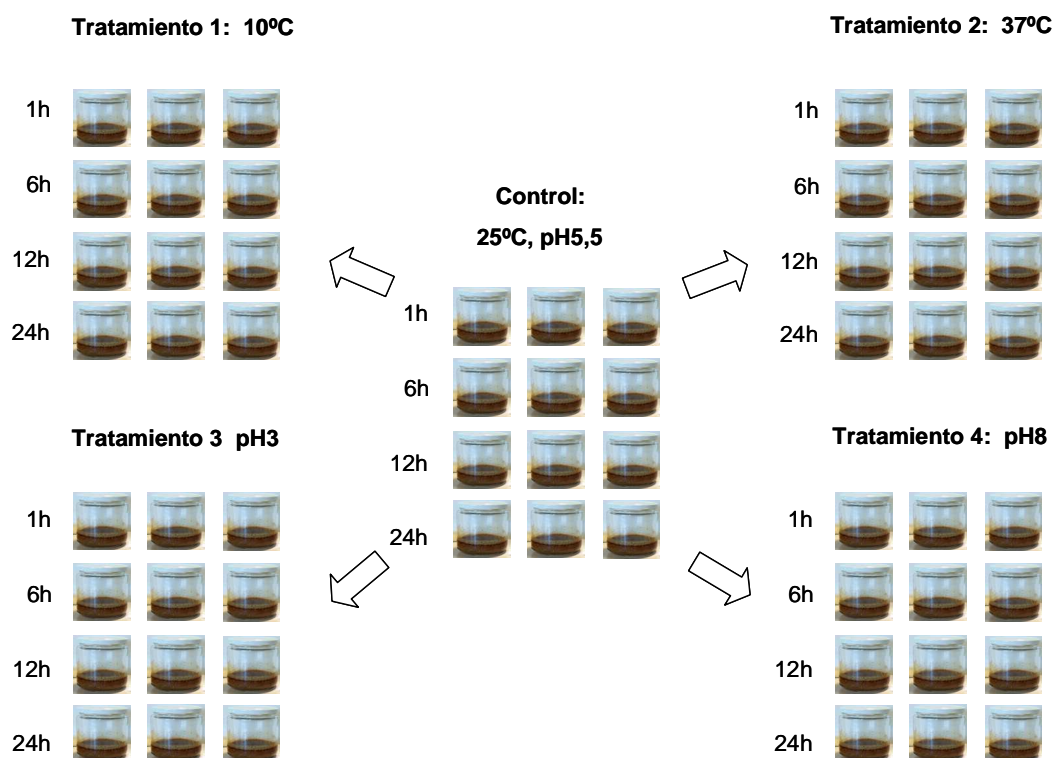


Figura 2. Representación esquemática del diseño experimental utilizado.

## 2.14.- Análisis estadístico.

La significación estadística de las diferencias observadas entre los tratamientos y su correspondiente control se obtuvo aplicando un test de aleatorización (2000 iteraciones) implementado en el programa REST (Pfaffl *et al.*, 2002), diseñado especialmente para análisis de expresión relativa mediante RT-qPCR. El mapa de calor y el análisis de *clusters* se realizaron usando el algoritmo de Ward (Ward, 1963) y la distancia Euclídea disponibles en el software GenEx. Los datos de expresión ( $\text{Log}_2(\text{RQ})$ ) se corrigieron de acuerdo a la Fórmula 5 para clasificar los genes de acuerdo a su perfil de expresión sin tener en cuenta la amplitud de los cambios (Bergkvist *et al.*, 2010; Stahlberg *et al.*, 2008).

$$\text{Fórmula 5: } X_{AS} = \frac{X - \bar{X}}{SD(X)}$$

En esta fórmula, X representa la expresión,  $\bar{X}$  la media de la expresión del gen en cuestión todas las condiciones y SD la desviación estándar en todas las condiciones.

### 3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1- Diseño de cebadores.

Se llevó a cabo una amplificación mediante PCR convencional utilizando ADN genómico y las nueve parejas de cebadores diseñados. Los productos obtenidos se separaron en un gel de agarosa (Fig 3). Se obtuvo una sola banda por cada pareja de cebadores, evidenciándose *a priori* la especificidad reacción.

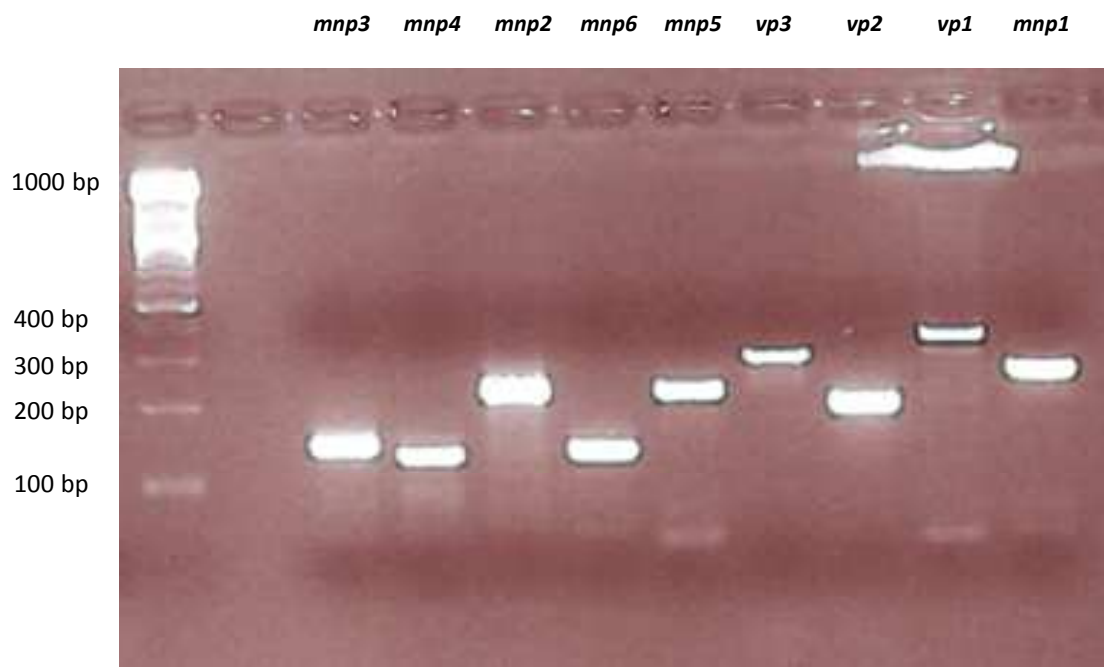
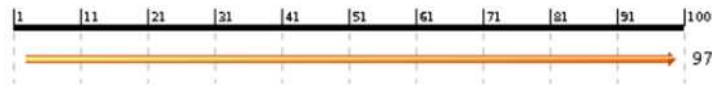


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación.

Tras la purificación y secuenciación de las 9 bandas se comprobó mediante los alineamientos generados por BLASTN que cada amplicón se correspondía con el gen que se deseaba amplificar (Fig 4).



Pleurotus ostreatus PC15 v2.0 : jg|PleosPC15\_2|1089546|estExt\_fgenes1\_kg\_C\_050290



```
Score: 97
Job: 5511775
Bit score: 192.781
E-value: 2.54588E-49
Query from: 3
Query to: 99
Hit from: 1306
Hit to: 1402
Scaff frame: 1
Hit frame: 1
Identity: 97 (100.0 %)
Positive: 97 (100.0 %)
Gaps: 0
Align length: 97
Scaffold: Seq
```

```
sbjct:      3 ATTGACTGCTCTGATGTTATCCCTGTCCCAAGCCATTGCAGAGCAAGGC 52
          |||
Scaff:    1306 ATTGACTGCTCTGATGTTATCCCTGTCCCAAGCCATTGCAGAGCAAGGC 1355

sbjct:     53 CCATCTCCCTGCTGGCCTGACGATGAACAACATCGAGCAAGCGTGTG 99
          |||
Scaff:    1356 CCATCTCCCTGCTGGCCTGACGATGAACAACATCGAGCAAGCGTGTG 1402
```

Figura 4. Resultados de BLASTN. Alineamiento de DNA del amplicón purificado (en este caso correspondiente al gen *mnp3*) con su correspondiente modelo génico. Obsérvese un 100% de identidad entre ambos.

### 3.2. Identificación y validación de genes de referencia para la RT-qPCR

El algoritmo GeNorm identificó *actin1* y *pep* como los genes de referencia más estables teniendo en cuenta todas las condiciones analizadas (Fig 5A). La combinación de estos genes dio como resultado un valor de estabilidad de  $M = 0.45$ , aceptable basándonos en el valor de corte de 0.7 sugerido por los autores (Vandesompele *et al.*, 2002). NormFinder identificó *actin1* como el gen más estable, mostrando una desviación estándar  $SD_{Norm}$  de 0.23 ciclos. Esta desviación es una medida del error sistemático que se introduce en el ensayo al usar dicho gen de referencia. La desviación acumulada  $accSD_{NORM}$  nos indica como dicho error disminuye hasta 0.21 ciclos al introducir un segundo gen de referencia (*pep*). La introducción de un tercero (*cytPC15*) hace que la desviación suba, debido a que su estabilidad en la expresión es menor que los anteriores. De este modo, el índice de referencia óptimo para la normalización de nuestros datos lo constituyen los genes *actin1* y *pep*, en base a su demostrada estabilidad en las condiciones experimentales que se describen en este trabajo.

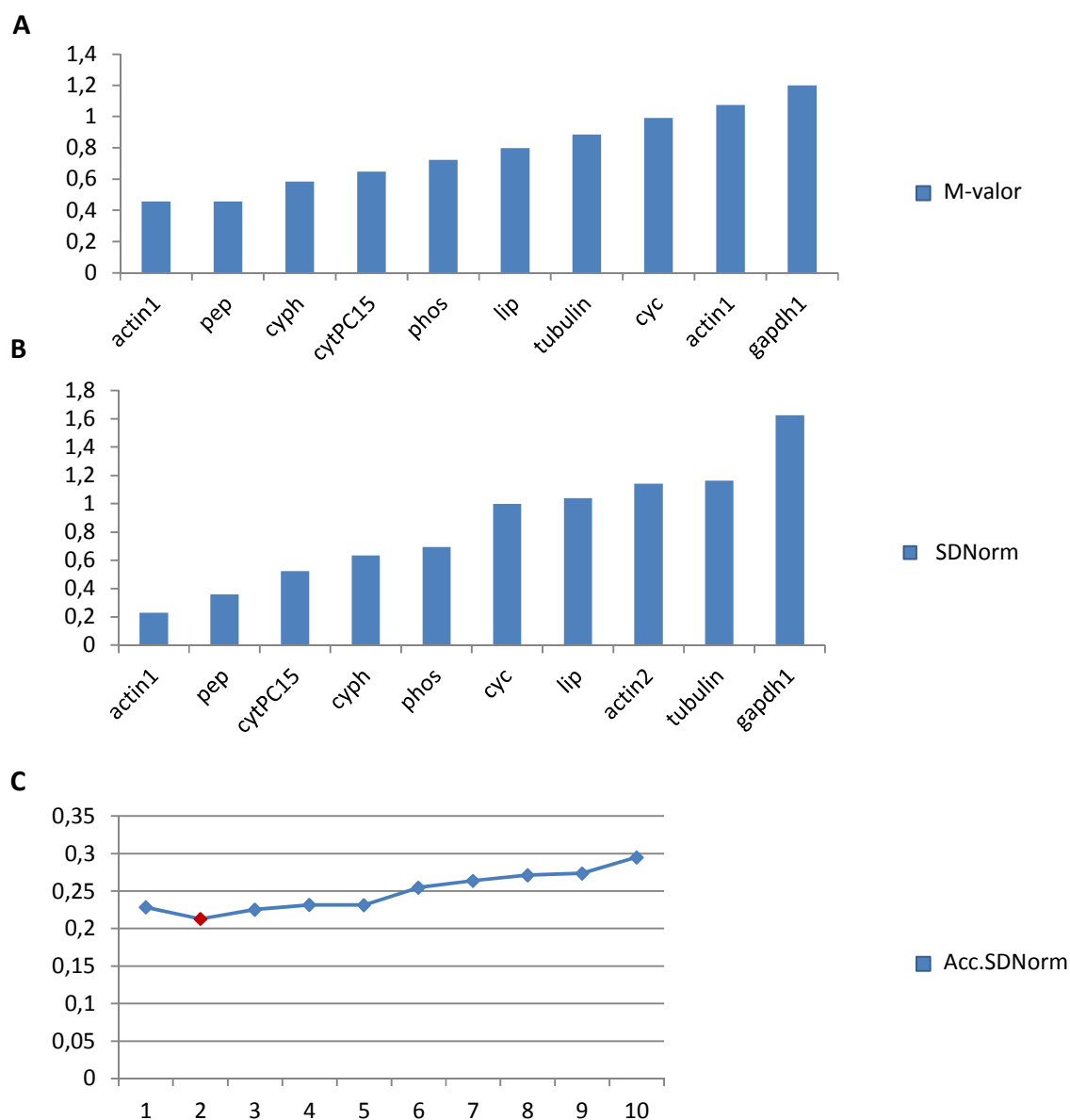


Figura 5. Resultados del análisis de estabilidad en la expresión de los genes de referencia usando los algoritmos GeNorm (A) y NormFinder (B y C).

Además del análisis con GeNorm y NormFinder se realizó una exploración de los valores umbral de ciclo ( $C_p$ , *crossing points*) para cada gen de referencia en las condiciones de estudio (Fig 6). En ella se observó como de forma general, la transcripción de la muestra procedente del cultivo modificado a pH3 estaba reprimida (valores  $C_p$  muy altos), probablemente debido a que ese pH de cultivo es inadecuado para el desarrollo del hongo.

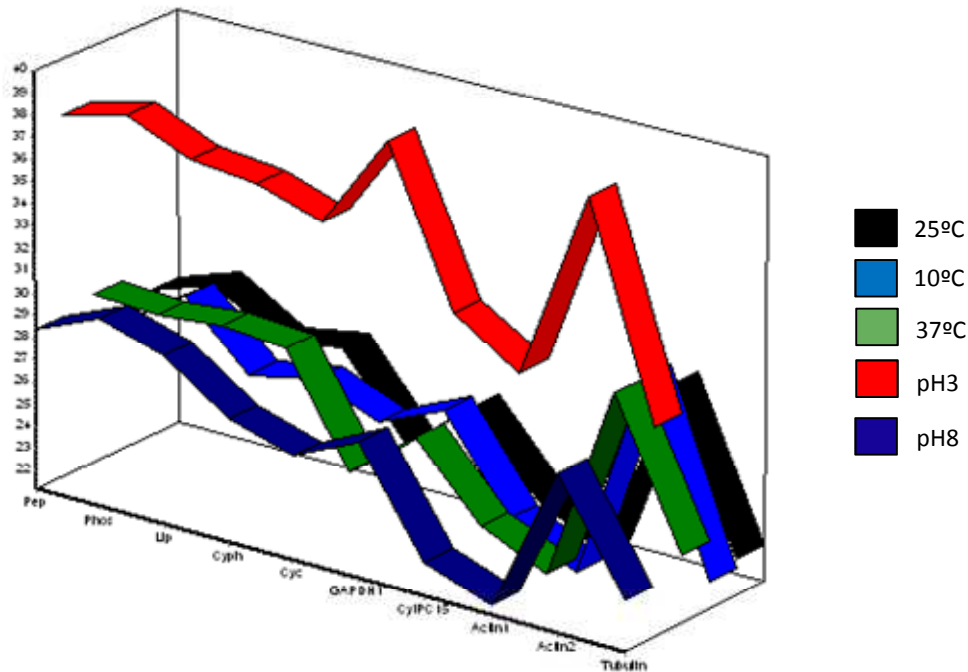


Figura 6. Variabilidad en los valores  $C_p$  entre muestras a los diferentes niveles de pH y temperatura.

El estrés de pH produjo finalmente la muerte de los cultivos, precedida por una represión de la expresión génica general. Este resultado tiene varias implicaciones a saber: i) es muy probable que no exista un gen de referencia válido para unas condiciones tan extremas y ii) la expresión del índice de referencia (derivado de *actin1* y *pep*) está claramente regulada a pH3 por lo que los valores de expresión relativa calculados en RQs (Materiales y métodos, fórmula 3) no son comparables cuantitativamente con el resto de muestras. No obstante, las RQs del tratamiento 3 (pH3) pueden ser utilizadas en el análisis multivariante, ya que éste agrupa los genes de acuerdo a los cambios relativos de expresión entre todas las condiciones y no en base a la cantidad de transcrito. Finalmente, la expresión de los genes en las muestras de pH3 se determinó en base al método delta-delta Ct normalizando únicamente en base al ARN total como estándar interno, para poder comparar cuantitativamente entre condiciones. A pesar de que éste último método no es recomendable, resultados previos de nuestro grupo de investigación apuntan a que el impacto de esta normalización es menor que el de usar genes de referencia inestables (Castanera *et al.*, En preparación). Del mismo modo, numerosos estudios desaconsejan totalmente el uso de genes inestables como controles endógenos para el análisis con RT-qPCR (Baker, 2011; Bustin *et al.*, 2009), ya que en la mayoría de casos llevan a la obtención de resultados erróneos.

### 3.3- Análisis del perfil de expresión génica de las peroxididasas ligninolíticas de *P.ostreatus*.

Con el objetivo de analizar la regulación transcripcional de manganeso peroxididasas y peroxididasas versátiles a diferentes temperaturas y pH, la cepa PC9 de *P.ostreatus* se cultivó en un medio conteniendo lignocelulosa como única fuente de carbono, que denominamos condición control. Más adelante se analizó la expresión de los 9 genes a lo largo de 24h (tomando muestras cada 6h) después de modificar la temperatura (de 25°C a 10°C y a 37°C) y el pH (de pH5.5 a pH3 y a pH8). Los cambios de temperatura (temperaturas de choque) corresponden a los límites en los que el hongo todavía es capaz de crecer (dato no mostrado), mientras que los valores de pH se eligieron en base a los utilizados por los autores en (Fernandez-Fueyo *et al.*, 2014), para contrastar los valores de transcripción con la estabilidad *in vitro* de las proteínas a los diferentes niveles de acidez. El tratamiento de los datos que se realizó se basó en dos aproximaciones diferentes: i) un análisis exploratorio para descubrir grupos de genes o de muestras con perfiles similares de transcripción, y ii) un análisis clásico de expresión utilizando el método delta-delta Ct en un diseño pareado en el que se comparó la expresión del tratamiento (ej. 10°C, 6h) con las condiciones control en los diferentes tiempos de muestreo (ej. 25°C, 6h). La transcripción se analizó en primer lugar en las condiciones control a lo largo de 24h. El objetivo fue obtener un mapa de expresión basal de las peroxididasas del hongo en condiciones de degradación de la lignina. El resultado se muestra en la figura 7A, en forma de mapa de calor combinado con un dendrograma de clusters jerárquicos, en el que se clasifican los genes y las muestras (tiempos de muestreo) en grupos de acuerdo a sus perfiles similares de expresión. En este sentido, se diferenciaron claramente tres grupos de genes en base a su alta (Grupo I: *mnp3* y *vp1*), media (Grupo II: *mnp2*, *vp2*, *mnp6*, *vp3* y *mnp1*) o baja (Grupo III: *mnp4* y *mnp5*) expresión. Por su parte, las muestras agruparon en tiempos alternos, probablemente debido a la fluctuación observada en los genes del grupo II. Los resultados mostraron que *mnp3* y *vp1* son los genes que más se expresan en condiciones de degradación de lignina, mientras que los que menos se expresaron fueron *mnp4* y *mnp5*. Este resultado concuerda con estudios previos realizados en medios de cultivo no basados en lignocelulosa (Irie *et al.*, 2000; Salame *et al.*, 2013). En dichos estudios se observó que *vp1*, *mnp3* y *mnp2* eran los genes con mayores niveles de transcripción en *P.ostreatus*.

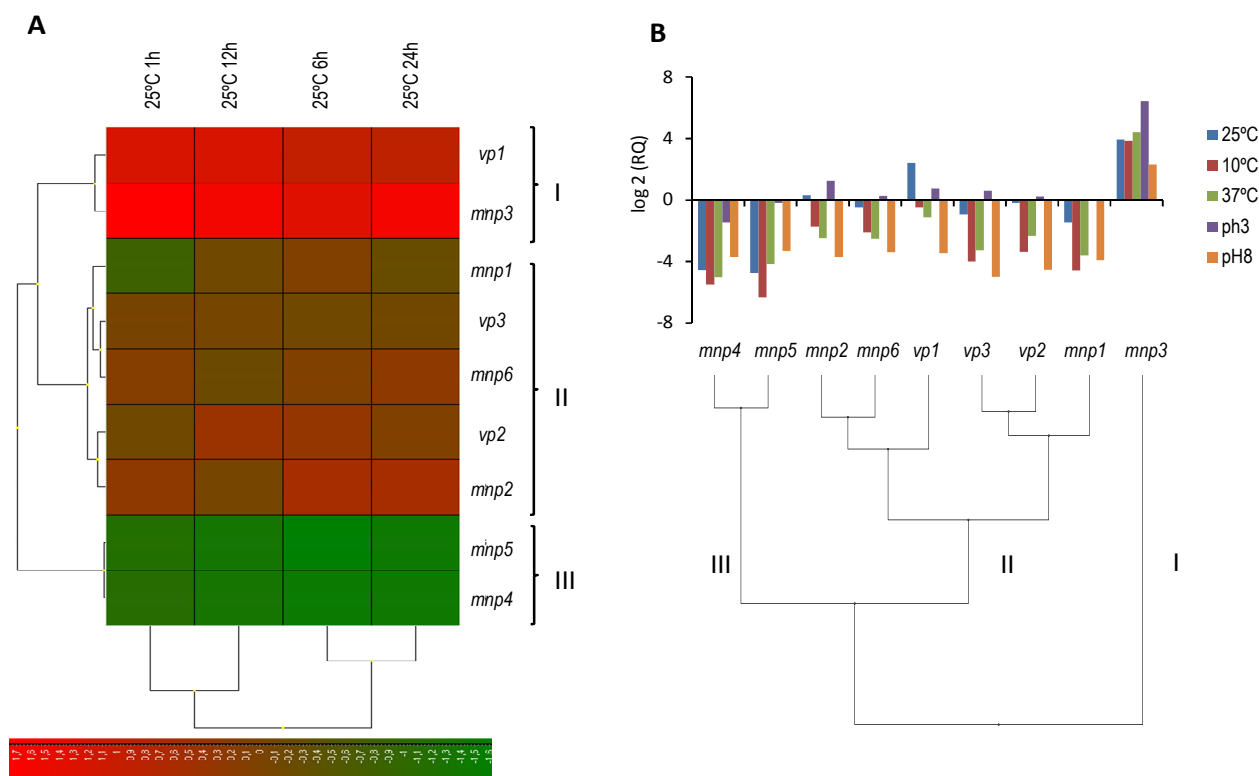


Figura 7. Análisis exploratorio de la expresión de 9 genes codificantes de peroxidasas ligninolíticas de *P.ostreatus*. Mapa de calor combinado con dendrogramas (A). La expresión media de cada gen a lo largo de 24h se muestra en (B), combinada con un análisis de clusters.

La variabilidad en los niveles de expresión de genes pertenecientes a familias multigénicas se ha observado también en genes de lacasas involucradas en la degradación de lignina (Castanera *et al.*, 2013; Pezzella *et al.*, 2012), así como en otros hongos de podredumbre de la madera (Fernandez-Fueyo *et al.*, 2012a). La existencia de varios de estos genes en el genoma de *P.ostreatus* pone de manifiesto su aparente redundancia. Si sólo unas pocas peroxidasas son utilizadas para la función que se les supone (degradar lignina), cabe pensar que el resto tengan funciones hasta ahora desconocidas, o que puedan actuar como reserva en el *pool* genético ante eventuales deleciones de otros genes con una función relacionada. Un análisis similar al realizado en las condiciones control se llevó a cabo usando la media (en RQs) de todas las muestras después de los choques de temperatura y pH (Fig 7B). El objetivo fue analizar si existía una co-regulación de la expresión de los distintos genes en las condiciones extremas de nuestro estudio. Los resultados del análisis de clusters mostraron que los grupos de expresión obtenidos en las condiciones control se mantenían, con la única excepción de *vp1*, que fue reclasificada como miembro del grupo II. Este resultado indica que el perfil de co-expresión de los genes de cada grupo es independiente de los

cambios en las condiciones ambientales, lo que sugiere que éstos puedan tener una función coordinada.

### **3.4- Efecto de los choques de temperatura y pH en la expresión de las peroxidasas ligninolíticas de *P.ostreatus*.**

El efecto de las diferentes condiciones de T<sup>a</sup> y pH en la expresión de los nueve genes a lo largo de 24h se analizó utilizando el método comparativo delta-delta Cp (materiales y métodos, fórmula 4), en el que la condición de referencia es el medio control (ej: 10°C 1h vs 25°C 1h). Los resultados de esta comparación se expresan en *Fold Changes* (FC, Log<sub>2</sub>(expresión)), que indican cuántas veces se duplica la cantidad de transcrito en la condición analizada en comparación con la del control. Los cambios en las condiciones de cultivo tuvieron como consecuencia una represión de la expresión de los genes de la mayoría de peroxidasas, salvo en contadas excepciones (Fig 8). Con respecto al efecto de la temperatura, en los cultivos expuestos a 10°C la expresión disminuyó gradualmente a lo largo del tiempo, alcanzando los valores mínimos entre las 12 y 24 h posteriores al choque. La máxima represión con respecto al control se dio en las VP (-5.3 a -5.9 FCs). Por el contrario, la expresión de *mnp3* fue la menos alterada, fluctuando entre una ligera activación en las primeras 12h hasta una leve represión a las 24h (-1.7 FC). Los cultivos expuestos a 37°C mostraron un perfil muy interesante, alternando sobreexpresiones y represiones a lo largo de las 24h en la mayoría de genes. Nuevamente, *mnp3* mostró un perfil diferente, siendo su expresión similar (1h, 12h y 24h) o superior al control (2 FC a las 6h). A pH3 todos los genes analizados estaban prácticamente reprimidos. Este comportamiento se observó a la primera hora después del cambio a la nueva condición, y se mantuvo a lo largo de las 24h. Los genes más reprimidos fueron los pertenecientes al grupo III, llegando a mínimos de -8,1 y -8.3 FC en *mnp4* y *mnp5* respectivamente. Este resultado contrasta con el hecho de que la máxima actividad ligninolítica de enzimas degradadoras de este polímero como las LiP o las VP, ocurre frecuentemente en condiciones ácidas (Ruiz-Dueñas & Martinez, 2009). A pH8, los genes de los grupos I y II mostraron un perfil de expresión similar al observado a pH3, si bien la represión más fuerte se observó a partir de las 6h. El grupo III nuevamente fue el que mostró un comportamiento más diferente, ya que tanto *mnp4* como *mnp5* se sobreexpresaron en esta condición con respecto al control (1,55 y 1,77 FC respectivamente).

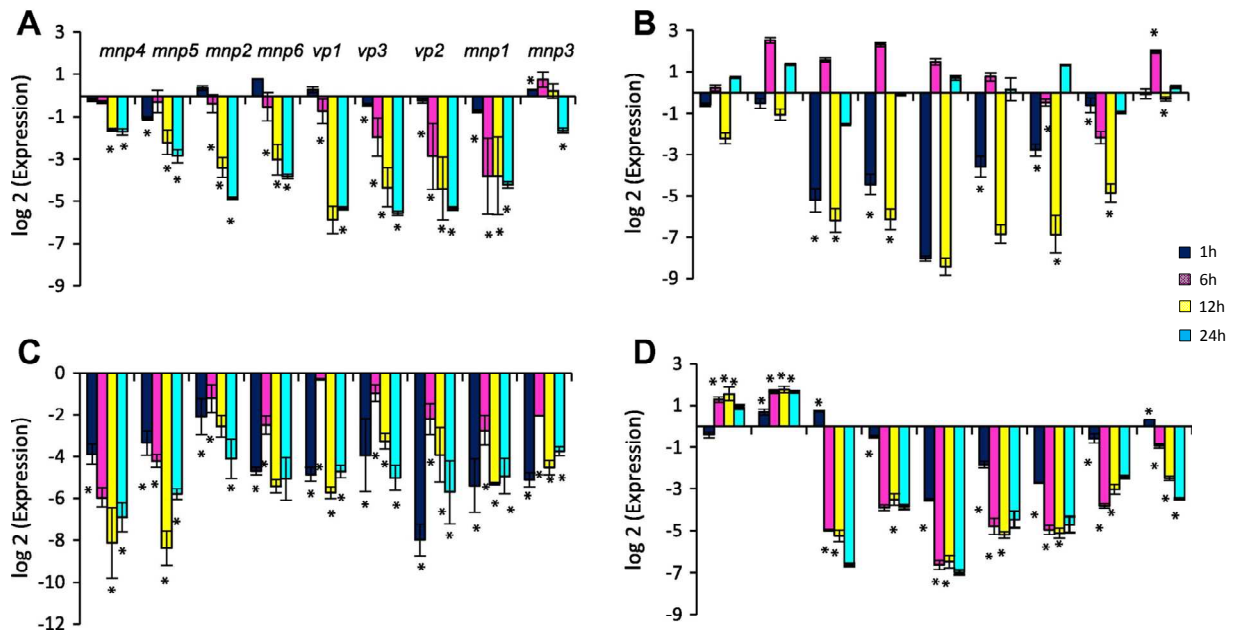


Figura 8. Efecto de los cambios de pH y temperatura en la expresión de las peroxididasas ligninolíticas de *P.ostreatus*. 10 °C (A), 37 °C (B), pH 3 (C), pH 8 (D). Las barras de error representan la desviación estándar de tres amplificaciones independientes. Los asteriscos indican un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

Este resultado es interesante, ya que se ha demostrado que salvo excepciones, a pH8 las peroxididasas ligninolíticas se inactivan debido a la pérdida de iones estructurales de  $\text{Ca}^{2+}$  así como debido a la formación de complejos heme hierro bis(histidyl) (Ruiz-Dueñas & Martinez, 2009). De forma general, las modificaciones de pH y temperatura tuvieron como consecuencia una represión en todos los genes analizados, siendo ésta más constante en los choques de pH que en los de  $T^a$ . Este resultado era esperable ya que las condiciones control (25°C, pH 5,5) son las óptimas de crecimiento. Las condiciones analizadas resultaron en algunos casos demasiado extremas para *P.ostreatus*. Este es el caso de la condición de pH3, que provocó una detención total del crecimiento de los cultivos y una represión generalizada tanto en las peroxididasas como en los genes de referencia analizados. En el caso de los choques de temperatura, lo más relevante fue el comportamiento de *mnp3* y del grupo III (*mnp4* y *mnp5*), cuya expresión se vio menos alterada que el resto de genes. Considerando que *mnp3* es el gen más expresado en las condiciones óptimas de degradación (Fig. 7A), cabe pensar que entre las peroxididasas ligninolíticas, *mnp3* desempeña una función central, y de ahí que su expresión sea constitutiva. En el caso de los choques de pH, lo más relevante fue la sobreexpresión a pH8 de *mnp4* y *mnp5* (Fig. 8D). Cabe destacar en este sentido que de entre las peroxididasas ligninolíticas de *P.ostreatus*, la isoenzima MnP4 es la de que muestra una mayor estabilidad *in vitro* en condiciones alcalinas (Fernandez-Fueyo *et al.*, 2014). Esto sugiere que *mnp4* y *mnp5* podrían activarse en la naturaleza cuando el

hongo coloniza sustratos alcalinos, confiriéndole plasticidad ante las diferentes condiciones ambientales.

Con el objetivo de analizar la contribución individual de cada gen a la expresión peroxidasa global, se analizó la transcripción de cada gen (en base a las RQs, Fórmula 3) tomando la suma de las expresiones en cada condición a lo largo de las 24h como el 100% (Fig. 9). La expresión predominante de *mnp3* quedó patente al representar los datos. Además, el predominio fue mayor en las condiciones extremas en comparación con las condiciones óptimas de crecimiento y degradación. La peroxidasa versátil *vp1* también mostró niveles elevados de expresión (en torno a un 20 % del total) en las condiciones óptimas y tras los cambios de temperatura. Al eliminar de la representación la expresión de *mnp3* pudimos analizar la expresión de otras enzimas que quedaban enmascaradas. Del perfil de expresión medio de las 24h se deduce que los genes *mnp3*, *vp1* y los pertenecientes al grupo III de co-expresión (*mnp4* y *mnp5*) fueron los más regulados estaban por las condiciones de cultivo utilizadas. Por el contrario, los miembros del grupo II (con la excepción de *mnp1* a pH3) mostraron un porcentaje similar de expresión con respecto al total en todas las condiciones.

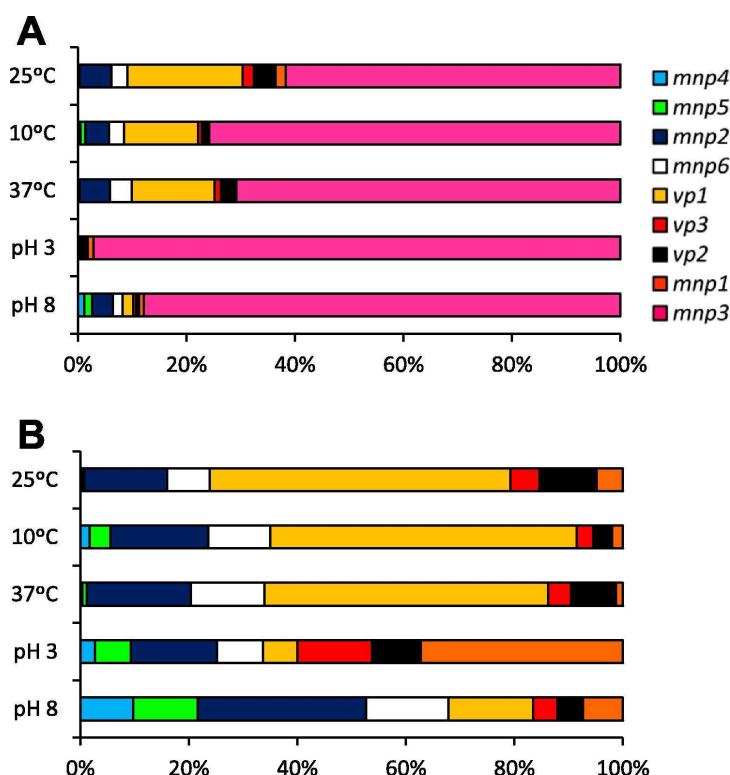


Figura 9. A) Expresión relativa de las nueve peroxidosas ligninolíticas de *P.ostreatus*, expresada en porcentaje (el 100% en cada condición es igual a la suma de la expresión de todos los genes). B) Expresión relativa de los genes excluyendo los valores de expresión predominante de *mnp3*.



## 4- CONCLUSIONES

- Las nueve peroxidasas ligninolíticas de *P.ostreatus* muestran niveles de expresión diferentes cuando *P.ostreatus* crece en sustratos lignocelulósicos en condiciones óptimas de crecimiento.
- Los genes que codifican las isoenzimas *mnp3* y *vp1* son los que mayor expresión muestran en las condiciones mencionadas anteriormente.
- Los genes que controlan la expresión de peroxidasas ligninolíticas se agrupan en tres grupos de co-expresión independientes de la T<sup>a</sup> y pH del cultivo.
- El cambio de temperatura a 37°C provocó un perfil alterno de activación/represión en la mayoría de genes a lo largo de un ciclo de 24h.
- El cambio de pH a pH3 produjo una marcada represión en todos los genes analizados, a pesar de que las peroxidasas ligninolíticas son muy activas a pH ácidos.
- El cambio de pH a pH8 provocó una represión en todos los genes salvo en *mnp4* y *mnp5*, a pesar de que a este pH tan alcalino la mayoría de enzimas ligninolíticas se inactivan.

## 5.- BIBLIOGRAFÍA

**Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Orntoft, T. F. (2004).** Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* **64**, 5245-5250.

**Baker, M. (2011).** qPCR: quicker and easier but don't be sloppy. *Nature Methods* **8**, 207-212.

**Baldrian, P., der Wiesche, C. I., Gabriel, J., Nerud, F. & Zadrazil, F. (2000).** Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2471-2478.

**Bending, G. D., Friloux, M. & Walker, A. (2002).** Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *Fems Microbiology Letters* **212**, 59-63.

**Bergkvist, A., Rusnakova, V., Sindelka, R., Garda, J. M. A., Sjogreen, B., Lindh, D., Forootan, A. & Kubista, M. (2010).** Gene expression profiling - Clusters of possibilities. *Methods* **50**, 323-335.

**Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A. & other authors (2009).** The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55**, 611-622.

**Castanera, R., Perez, G., Omarini, A., Alfaro, M., Pisabarro, A. G., Faraco, V., Amore, A. & Ramirez, L. (2012).** Transcriptional and Enzymatic Profiling of *Pleurotus ostreatus* Laccase Genes in Submerged and Solid-State Fermentation Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 4037-4045.

**Castanera, R., Omarini, A., Santoyo, F., Perez, G., Pisabarro, A. G. & Ramirez, L. (2013).** Non-Additive Transcriptional Profiles Underlie Dikaryotic Superiority in *Pleurotus ostreatus* Laccase Activity. *Plos One* **8**, 9.

**Castanera, R., Varas, L., Pisabarro, G. & Ramirez, L. (En preparación ).** Selection and validation of stable reference genes suitable for RT-qPCR analyses in the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. (En preparación).

**Cavalier-Smith, T. (1998).** A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* **73**, 203-266.

**Cohen, R., Yarden, O. & Hadar, Y. (2002).** Lignocellulose affects Mn<sup>2+</sup> regulation of peroxidase transcript levels in solid-state cultures of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3156-3158.

**Eggen, T. & Majcherczyk, A. (1998).** Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **41**, 111-117.

**Fernandez-Fueyo, E., Ruiz-Duenas, F. J., Ferreira, P. & other authors (2012a).** Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 5458-5463.

**Fernandez-Fueyo, E., Ruiz-Duenas, F. J., Miki, Y., Martinez, M. J., Hammel, K. E. & Martinez, A. T. (2012b).** Lignin-degrading Peroxidases from Genome of Selective Ligninolytic Fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 16903-16916.

**Fernandez-Fueyo, E., Ruiz-Duenas, F. J., Martinez, M. J., Romero, A., Hammel, K. E., Medrano, F. J. & Martinez, A. T. (2014).** Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. *Biotechnology for Biofuels* **7**.

**Floudas, D., Binder, M., Riley, R. & other authors (2012).** The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. *Science* **336**, 1715-1719.

**Freeman, W. M., Walker, S. J. & Vrana, K. E. (1999).** Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *Biotechniques* **26**, 112-+.

**Hammel, K. E. (1989).** Organopollutant Degradation by Ligninolytic Fungi. *Enzyme and Microbial Technology* **11**, 776-777.

**Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C. & Pegler, D. N. (1995).** *Dictionary of the fungi*. London: International Mycological Institute.

**Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993).** Kinetic PCR Analysis - Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio-Technology* **11**, 1026-1030.

**Higuchi, T. (1990).** Lignin Biochemistry - Biosynthesis and Biodegradation. *Wood Science and Technology* **24**, 23-63.

- Irie, T., Honda, Y., Ha, H. C., Watanabe, T. & Kuwahara, M. (2000).** Isolation of cDNA and genomic fragments encoding the major manganese peroxidase isozyme from the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Wood Science* **46**, 230-233.
- Jennings, D. H. & Lysek, G. (1996).** Fungal biology: understanding the fungal lifestyle. Oxford: Bios Scientific.
- Jha, H. & Patil, M. (2011).** Biopulping of sugarcane bagasse using Manganese peroxidase from *Penicillium oxalicum* isolate-1. *Rom Biotech Lett* **16**, 6809-6819.
- Koressaar, T. & Remm, M. (2007).** Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **23**, 1289-1291.
- Koshy, J. & Nambisan, P. (2011).** Biopulping of Paddy Straw by *Pleurotus eous*. *Advanced BioTech* **11**.
- Larraya, L. M., Perez, G., Penas, M. M., Baars, J. J. P., Mikosch, T. S. P., Pisabarro, A. G. & Ramirez, L. (1999).** Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 3413-3417.
- Lee, J. (1997).** Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology* **56**, 1-24.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* **25**, 402-408.
- Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N. & other authors (2004).** Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology* **22**, 695-700.
- Martinez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I. & other authors (2009).** Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 1954-1959.
- Novotny, C., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Sasek, V. & Molitoris, H. P. (2001).** Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology* **89**, 113-122.
- Parenti, A., Muguerza, E., Iroz, A. R. & other authors (2013).** Induction of laccase activity in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts. *Bioresource Technology* **133**, 142-149.

- Pezzella, C., Lettera, V., Piscitelli, A., Giardina, P. & Sannia, G. (2012).** Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**, 705-717.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. (2002).** Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* **30**.
- Pfaffl, M. W. (2004).** Quantification Strategies in Real-Time PCR. *A-Z of Quantitative PCR* 87-120.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. (2004).** Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* **26**, 509-515.
- Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H. & other authors (2006).** The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* **311**, 484-489.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L. & Moorman, A. F. M. (2003).** Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* **339**, 62-66.
- Ruiz-Dueñas, F. J., Guillen, F., Camarero, S., Perez-Boada, M., Martinez, M. J. & Martinez, A. T. (1999).** Regulation of peroxidase transcript levels in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4458-4463.
- Ruiz-Dueñas, F. J. & Martinez, A. T. (2009).** Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microb Biotechnol* **2**, 164-177.
- Ruiz-Dueñas, F. J., Fernandez, E., Martinez, M. J. & Martinez, A. T. (2011).** *Pleurotus ostreatus* heme peroxidases: An in silico analysis from the genome sequence to the enzyme molecular structure. *Comptes Rendus Biologies* **334**, 795-805.
- Salame, T. M., Knop, D., Levinson, D., Yarden, O. & Hadar, Y. (2013).** Redundancy among Manganese Peroxidases in *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 2405-2415.
- Sanchez, C. (2010).** Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**, 1321-1337.

- Stahlberg, A., Elbing, K., Andrade-Garda, J. M., Sjogreen, B., Forootan, A. & Kubista, M. (2008).** Multiway real-time PCR gene expression profiling in yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals altered transcriptional response of ADH-genes to glucose stimuli. *Bmc Genomics* **9**.
- Talebnia, F., Karakashev, D. & Angelidaki, I. (2010).** Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology* **101**, 4744-4753.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002).** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**.
- Villalba, L. L., Scott, G. M. & Schroeder, L. R. (2006).** Modification of loblolly pine chips with *Ceriporiopsis subvermispota* part 1: Effect of fungal treatment. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **26**, 339-348.
- Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (1999).** Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 9236-9241.
- Ward, J. H. (1963).** Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association* **58**, 236-&.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. & Agathos, S. N. (2003).** White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* **22**, 161-187.