

**ESTUDIO DE LA VARIACIÓN EN LOS NIVELES DE  
TRANSCRIPCIÓN DE GENES DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE LIGNINA  
EN CULTIVOS SÓLIDOS Y SUMERGIDOS DE *Pleurotus ostreatus***

**Raúl Castanera Andrés  
Máster en Biotecnología 2011**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero dar las gracias a Gerardo Pisabarro y a Lucía Ramírez por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo en el grupo de investigación de Genética y Microbiología GENMIC de la Universidad Pública de Navarra.

Gracias a Gumer Perez, por todo lo que me ha enseñado y por el tiempo que ha dedicado a guiarme y a ayudarme a que este trabajo tomase forma.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio y de despacho, por los buenos momentos que hemos pasado dentro y fuera de la Facultad.

Gracias a mi familia, a todos mis amigos y a María, por entenderme y hacer que cada día merezca la pena.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1. El reino de los hongos .....	1
1.1 Hongos Basidiomicetos .....	1
1.2. Hongos de podredumbre blanca .....	2
1.3. Enzimas degradadoras de lignina: Lacasas .....	4
2. Estudio de la expresión génica .....	5
2.1 PCR a tiempo real.....	6
2.1.2 Fundamentos de la RT-PCR a tiempo real .....	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
1. Microorganismo .....	11
1.1 Origen y características de las cepas. ....	11
2. Diseño experimental:.....	12
3 Medios de cultivo y soluciones: .....	13
3.1 Medios de cultivo: .....	13
3.2 Soluciones: .....	14
4. Condiciones de cultivo. ....	14
4.1 Mantenimiento y expansión de las cepas .....	14
4.2 Obtención de inóculos .....	14
4.3. Cultivos para aislamiento de RNA y extracto enzimático.....	15
5. Métodos de análisis de ácidos nucleicos .....	15
5.1 Aislamiento de RNA .....	15
5.2 Evaluación de la cantidad y calidad de RNA .....	16
5.3 Síntesis de cDNA .....	17
5.4 PCR a tiempo real.....	18
5.5 Cuantificación de la expresión génica.....	19
6. Análisis enzimático. ....	20
6.1 Cuantificación de la actividad enzimática extracelular .....	20
6.2 SDS-PAGE.....	20
7. Análisis de datos.....	21
7.1 Expresión génica relativa .....	21

3. RESULTADOS .....	22
Capítulo 1: Análisis de la expresión génica relativa de genes codificantes de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	22
1.1- Extracción de ARN .....	22
1.2. Optimización de la qPCR:.....	22
1.3. Cuantificación de la expresión génica.....	23
1.3.1 Cuantificación de la expresión relativa normalizada.....	23
1.3.2 Cuantificación de la expresión por el método $2^{-\Delta Ct}$ .....	25
1.4. Análisis estadístico:.....	29
Capítulo 2: Estudio de la actividad enzimática extracelular codificada por la familia multigénica de las lacasas. ....	30
2.1 Actividad enzimática extracelular .....	30
2.1.1 Actividad enzimática en medio líquido.....	31
2.1.2. Actividad enzimática en medio sólido .....	31
2.2 Geles SDS-PAGE.....	32
2.1.1 SDS-PAGE a partir de extracto de medio líquido.....	32
2.1.1 SDS-PAGE a partir de extracto de medio sólido .....	33
4. DISCUSIÓN.....	35
5. CONCLUSIONES.....	40

### Listado de abreviaturas:

A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
col.	Colaboradores
Ct	Ciclo umbral de la PCR cuantitativa
DMP	2,6-dimetoxifenol
E	Eficiencia
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EST	Marcador de secuencia expresada (Expressed Sequence Tag)
g, mg, µg	Gramos, miligramos, microgramos
h, min, seg	Horas, minutos, segundos
Io	Inóculo cero
kDa	Kilodaltons
L, ml, µL	Litro, mililitro, microlitro
Lacc	gen codificante de lacasa de <i>P.ostreatus</i>
M	Molar
M7G	Medio M7 suplementado con glucosa
MOPS	Ácido 3(N-morfolino)
nmol	nanomoles
°C	Grados Celsius
PAH	Hidrocarburo aromático policíclico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa
QTL	<i>Locus</i> de carácter cuantitativo
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa del ARNm
SAGE	Análisis seriado de expresión génica ( <i>Serial analysis gene expression</i> )
SDS	Dodecilsulfato sódico
SSH	Hibridación sustractiva por supresión ( <i>Suppression subtractive hybridization</i> )
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Unidades internacionales
UV	Ultravioleta
V	Voltios

## Abstract

Lignocellulose is the predominant component of woody and dead plant materials, and the most abundant biomass on the earth. Lignin is a heterogeneous polymer present in lignocellulose, nevertheless it is recalcitrant towards chemical and biological degradation. A group of fungal species known as white-rot fungus produce extracellular enzymes that make them able to efficiently degrade this polymer. White-rot fungi are being extensively studied because of their capacity to increase cellulose accessibility of lignocellulosic wastes in pre-treatment processes directed to ethanol production. The edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus* is among this group of species, and it has been used as a lignin-degrading model in this project.

Five *P. ostreatus* strains were grown on straw, and in a chemically defined liquid medium supplemented with an aqueous wheat straw extract as a putative inducer of laccase activity. Gene expression assays were carried out using qPCR, and laccase activity was measured using DMP as a substrate. Among the 12 *Lacc* genes coding for laccase isoforms, *Lacc2*, *Lacc4*, and *Lacc10* relative expression was significantly increased in liquid media by the presence of the inducer in all strains, but extracellular laccase activity was surprisingly induced only in higher growth rate strains. Moreover, we found that *Lacc2* shows a specific-dikaryon expression pattern. Finally, an unexpected 40 kDa laccase isoform was detected in SDS-PAGE gels stained DMP in both liquid and solid extracellular broth that still need to be associated to a specific *Lacc* gene.

## Resumen

La lignocelulosa es el componente principal de la madera y de los residuos vegetales, lo que supone la mayor cantidad de biomasa de la tierra. La lignina es un polímero heterogéneo recalcitrante a la degradación química y biológica presente en la lignocelulosa. Existe un grupo de hongos denominados hongos de podredumbre blanca, que producen enzimas extracelulares capaces de degradar eficientemente este polímero. Los hongos de podredumbre blanca están siendo muy estudiados por su capacidad de incrementar la accesibilidad de la celulosa en el pretratamiento de residuos lignocelulósicos para la obtención de etanol. Dentro de este grupo de especies se encuentra *Pleurotus ostreatus*, un basidiomiceto comestible utilizado como modelo en este proyecto.

Se cultivaron cinco cepas de *P. ostreatus* en paja y en un medio líquido sintético suplementado con extracto acuoso de paja de cereal como inductor de actividad lacasa. Se llevaron a cabo ensayos de expresión génica mediante qPCR y se midió la actividad lacasa usando DMP como sustrato. De entre los 12 genes *Lacc* que codifican lacasas, *Lacc2*, *Lacc4* y *Lacc10* incrementaron significativamente su expresión en medio líquido en presencia del inductor. No obstante, la actividad lacasa extracelular sólo aumentó en las cepas de crecimiento rápido. Además, el gen *Lacc2* mostró un patrón de expresión específico de dicariontes. Finalmente, se detectó una isoforma de 40 kDa en geles SDS-PAGE teñidos con DMP en los extractos enzimáticos obtenidos a partir de cultivos líquidos y sólidos, que todavía no ha sido posible asociar a un gen *Lacc* en concreto.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1. El reino de los hongos

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos unicelulares y pluricelulares entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y las setas. Antiguamente los hongos se incluían en el reino *Plantae*, hasta que Whittaker (1969) propuso incluirlos en un nuevo reino al no poder ubicarlos en ninguno de los conocidos anteriormente, enfatizando en su forma de vida y modo de nutrición ya que viven alojados en un sustrato que digieren excretando las enzimas apropiadas, incorporando los nutrientes en pequeñas partículas disueltas que atraviesan su pared celular. La capacidad de un hongo de utilizar ciertas sustancias como alimento depende en gran medida de las enzimas que es capaz de producir (Jennings et al., 1996) y existen muy pocos componentes orgánicos o inorgánicos en el planeta que algún hongo no pueda utilizar o transformar (Moore, 1998). Esto tiene repercusiones muy importantes en el medio natural, haciendo que estos organismos sean esenciales en el reciclado de residuos orgánicos y en la reposición de nutrientes de vuelta en los ecosistemas. En el sistema de clasificación de los seres vivos en seis reinos (Cavalier-Smith, 1998) los hongos se encuentran clasificados en el Reino *Fungi*, que Hawksworth *et al.* (1995) dividieron en cinco Divisiones o *Phyla* basándose en datos moleculares, denominadas *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota*, *Chytridiomycota* y *Glomeromycota*.

### 1.1 Hongos Basidiomicetos

De entre las cinco divisiones, los hongos Basidiomicetos (*Basidiomycota*) constituyen aproximadamente el 30% de los hongos conocidos. Incluido en este *Phylum* se encuentra *Pleurotus ostreatus*, especie utilizada en este trabajo y que se encuadra en la subdivisión *Hymenomycotina*, clase *Basidiomycetes*, subclase *Holobasidiomycetidae*, orden *Agaricales*, familia *Tricholomataceae* (Hawksworth et al., 1995). Los hongos basidiomicetos se caracterizan porque presentan una fase vegetativa típicamente micelial formada por hifas bien desarrolladas y septadas, con una fase dicariótica prolongada que da lugar a esporóforos de varios tipos, en los que se producen basidios (estructuras donde tiene lugar la cariogamia y la meiosis) portadores de basidiosporas. Estas



basidiosporas germinan desarrollando hifas monocarióticas que acabarán formando micelio dicariótico al entrar en contacto con otras hifas monocarióticas compatibles. (figura 1).

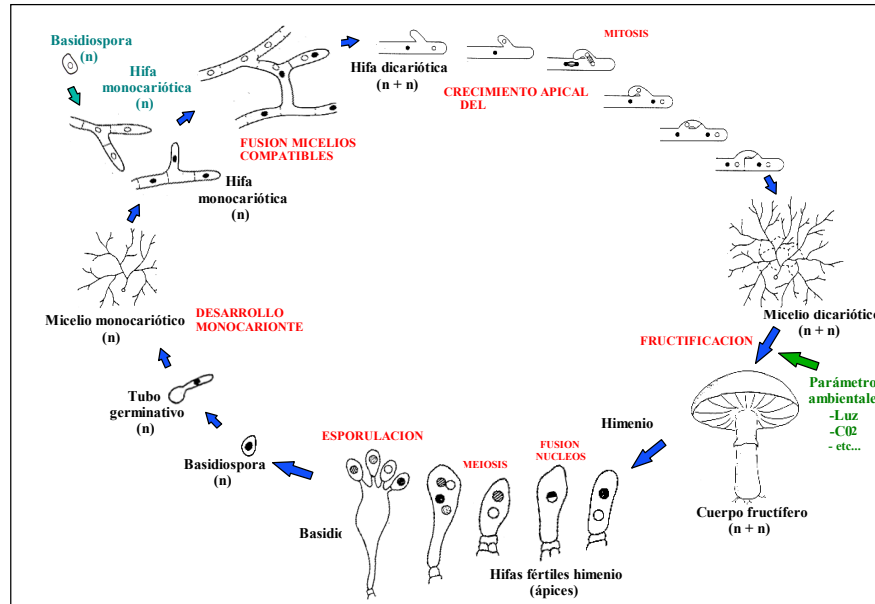


Figura 1. Ciclo biológico de un hongo basidiomiceto agarical (Peñas, 1999)

## 1.2. Hongos de podredumbre blanca

*Pleurotus ostreatus* se encuentra dentro los llamados hongos de podredumbre blanca o *White-Rot Fungi*, junto con otros hongos pertenecientes principalmente a la división *Eumycota* y la subdivisión *Basidiomycotina*. El nombre deriva del aspecto blanquecino que toma la madera tras ser atacada por estos hongos, capaces de producir varias isoformas de oxidasas y peroxidasas extracelulares involucradas en la degradación de lignina en su ambiente natural (figura 2). La lignina es un polímero heterogéneo compuesto por unidades metoxiladas de fenilpropano que se encuentra formando parte de los tejidos vasculares de las plantas superiores. Es uno de los tres componentes esenciales de la madera (Sjostrom, 1981) a la que proporciona soporte estructural, impermeabilidad y resistencia frente al ataque microbiano y al estrés mecánico (Higuchi, 1990).

Las oxidasas y peroxidasas son enzimas inespecíficas que pueden oxidar un amplio espectro de sustratos estructuralmente diferentes, como componentes fenólicos tóxicos (Hammel, 1989), colorantes sintéticos (Hammel, 1989; Novotny *et al.*, 2001),

pesticidas organoclorados y PAHs (Tekere *et al.*, 2010), de modo que han adquirido gran importancia industrial dado su amplio abanico de aplicaciones:

- Pretratamiento de desechos agrícolas con el fin de hacer más accesible la celulosa para obtener bioetanol como combustible alternativo al petróleo.
- Tratamiento de aguas residuales de industrias de diferentes ámbitos, en especial de las industrias textiles que generan aguas muy coloreadas.
- Detoxificación de desechos contaminantes.
- Industria de pasta de celulosa y papel.
- Tecnología agroalimentaria.
- Aplicaciones analíticas y biosensores.

De entre estas aplicaciones, la utilización de biomasa lignocelulósica ofrece grandes expectativas para conseguir reducir el coste de la producción de bioetanol, ya que los residuos herbáceos y leñosos derivados de las prácticas agrícolas y forestales suponen el material crudo más abundante en la naturaleza (Lee, 1997).

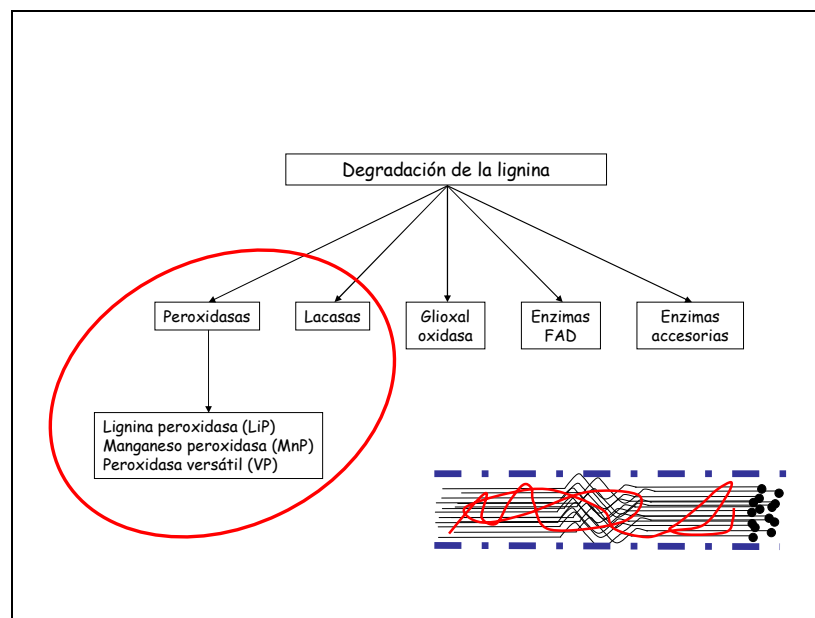


Figura 2. Enzimas degradadoras de lignina secretadas por hongos de podredumbre blanca

Estudios realizados sobre enzimas secretadas por *P. ostreatus* han demostrado la presencia de fenoloxidasas (Palmieri *et al.*, 2003) y manganeso peroxidadas (Giardina *et al.*, 1999; Giardina *et al.*, 2000), algunas de las cuales han sido localizadas en el mapa de

ligamiento realizado en nuestro laboratorio (Larraya *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2006). Otros estudios llevados a cabo con *P.ostreatus* profundizan en la dinámica de los procesos ligninolíticos llevados a cabo por estas enzimas (Kerem *et al.*, 1992; Ruhl, 2009; Valmaseda *et al.*, 1991)

### **1.3. Enzimas degradadoras de lignina: Lacasas**

Las lacasas (Lac, E.C1.10.3.2) son enzimas N-glicosiladas pertenecientes al grupo de proteínas de cobre azul. Están ampliamente distribuidas en plantas, hongos de diferentes clases (Gianfreda *et al.*, 1999) y algunas bacterias (Diamantidis *et al.*, 2000). Se descubrieron en el látex de la planta *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883) y se identificaron como sustancias protectoras frente a lesiones y responsables del endurecimiento de la resina. Desde que fueron descritas por primera vez en hongos (Bertrand, 1985) su función se ha relacionado con la morfogénesis, con el desarrollo de cuerpos fructíferos (Thurston, 1994b) y con la patogénesis (Lewis and Yamamoto, 1990). Otros estudios sugieren que las manganeso-peroxidasas en combinación con las lacasas o con las lignina-peroxidasas podrían ser el conjunto mínimo de enzimas oxidativas necesario para la degradación de lignina (De Jong *et al.*, 1992)

Los estudios de secuenciación ADN genómico y de ADNc han puesto de manifiesto que la mayoría de las lacasas presentan secuencias que codifican entre 520 y 550 aminoácidos incluido el péptido señal, y que existen secuencias muy conservadas como las correspondientes a la unión del cobre (Thurston, 1994a). En general la actividad lacasa en los basidiomicetos está codificada por varios genes (Saloheimo *et al.*, 1991). A día de hoy se han anotado un total de doce genes codificantes de lacasas en el genoma de *Pleurotus ostreatus*. La mayoría de ellos se encuentran agrupados en el cromosoma VI, aunque se han encontrado otros en el IV, VII, VIII y XI (ver figura 3). En este trabajo se va a evaluar cómo afecta el tipo de sustrato sobre el que crece el hongo en los niveles de transcripción de dichos genes y se comprobará si existe concordancia con la cantidad de enzimas secretadas al medio.

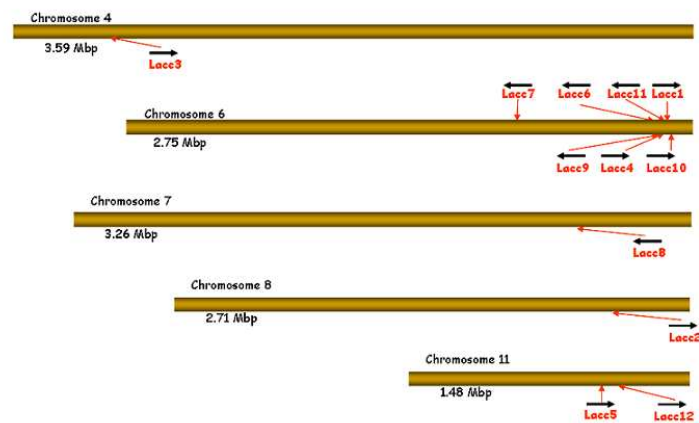


Figura 3. Localización cromosómica de las 12 lacasas en *Pleurotus ostreatus* var *florida*.

## 2. Estudio de la expresión génica

La expresión génica es el proceso por el que la información de un gen es usada en la síntesis de un producto génico funcional. Estrictamente el término abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura se localiza en el lugar adecuado y realiza su función (Hernandez *et al.*, 1994), aunque en algunos casos como en los genes no codificantes de proteínas el producto génico es un ARN funcional (ARNm, ARNr o ARNt). En todos los organismos vivos las células regulan sus actividades activando o desactivando la expresión de sus genes y esta expresión es generalmente proporcional al número de copias de ARN mensajero de un gen determinado. Este hecho es crucial si tratamos de identificar la presencia de productos celulares específicos ya que el ARNm es traducido en los ribosomas para formar proteínas. Por lo tanto, es posible obtener datos relativos a la producción de elementos biológicos si la expresión de los genes de una célula es conocida (McPherson *et al.*, 2008). Los métodos de estudio de la expresión génica se basan en su capacidad para detectar ARNm específicos, y durante mucho tiempo el Northern blot ha sido la técnica más utilizada para detectar moléculas de ARN. Actualmente han aparecido técnicas mucho más precisas para el estudio de la expresión génica como la RT-qPCR (o RT-PCR a tiempo real), y técnicas de alta productividad como los chips de ADN, la secuenciación de ESTs, el RNAseq o la tecnología SAGE y SSH. Las estrategias basadas en la secuenciación masiva proporcionan enormes cantidades de datos y son muy útiles para estudios de transcriptómica comparada, mientras que la RT-qPCR es más específica y adecuada para el estudio de genes concretos. En este trabajo se han analizado las variaciones en la cantidad de ARNm correspondiente a 12 genes codificantes de lacasas de cinco cepas de

*Pleurotus ostreatus* var. *florida* (ver Materiales y métodos, 1.1) cultivadas en diferentes medios utilizado la RT-qPCR.

## 2.1 PCR a tiempo real

Higuchi y col. (1993a) desarrollaron un método de análisis cuantitativo para cualquier secuencia de ADN amplificable que utiliza una videocámara para monitorizar múltiples PCRs simultáneas detectando la acumulación de ADN de doble cadena en base al incremento de fluorescencia del bromuro de etidio. Hoy en día esta técnica es conocida como qPCR o PCR a tiempo real y su capacidad para detectar y medir minúsculas cantidades de ácidos nucleicos en un amplio rango de muestras de diferentes orígenes la convierte en una herramienta excelente para el diagnóstico molecular, las ciencias de la vida, agricultura y medicina (Bustin, 2000) . Sus aplicaciones se dividen claramente en técnicas de diagnóstico y de investigación, siendo en ésta última muy útil para amplificar y cuantificar moléculas de ADNc específicas obteniendo datos precisos y fiables sobre la expresión genética de las células en estudio (Heid *et al.*, 1996). Algunas de las ventajas que hacen esta tecnología tan competitiva son:

- Todo el proceso se realiza dentro del termociclador.
- Posee una gran sensibilidad, detectando bajos niveles de ADNc molde.
- Es muy precisa en la cuantificación.
- Posee un amplio rango de cuantificación, de hasta siete órdenes de magnitud.
- Procesamiento de un elevado número de muestras en paralelo.
- Rapidez.
- Reproducibilidad.

Los principales inconvenientes de ésta técnica son:

- No aporta información sobre los tamaños de ARNm.
- Es sensible a la estructura del ARNm.
- Tiene menos capacidad de resolución que otros métodos.
- Requiere información previa sobre la secuencia del transcrito.
- El resultado se ve afectado por el error cometido por la Taq DNA polimerasa.
- La cuantificación absoluta requiere un trabajo muy complejo.

### 2.1.2 Fundamentos de la RT-PCR a tiempo real

En conjunto, el método RT-qPCR consiste en una extracción de ARN seguida de la síntesis de una cadena de ADNc a partir del ARNm utilizando una transcriptasa inversa y de una PCR en la que el producto amplificado puede detectarse a tiempo real dado que la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADNc producida en cada ciclo. Para ello son componentes imprescindibles los elementos de excitación (láser, diodos o lámparas halógenas), elementos ópticos de detección integrados al termociclador y marcadores fluorescentes, que pueden ser de dos tipos:

- **Marcadores específicos:** Utilizan sondas de ácidos nucleicos marcadas con moléculas fluorescentes que se unen a productos amplificados específicos y emiten señales luminosas que se miden en el termociclador a medida que se obtiene el producto de la PCR. Éstos métodos son muy precisos, aunque requieren de un diseño de secuencias específicas para su uso como sondas y por consiguiente es más laborioso y costoso
- **Marcadores genéricos:** Son moléculas fluorescentes que se unen inespecíficamente al ADN de doble cadena emitiendo una señal fluorescente que se procesa a tiempo real, de modo que un aumento en el producto de PCR supone un aumento de fluorescencia detectada en cada ciclo de la PCR. Estos marcadores son muy utilizados por su bajo coste y porque no requieren de un diseño experimental previo (Ririe *et al.*, 1997). A este tipo de marcadores pertenece el fluoróforo SYBR Green, utilizado en este trabajo.

Los valores acumulados en la generación de fragmentos quedan registrados formando una curva de fluorescencia (figura 4) que sigue una ecuación logística similar a la que describe el crecimiento bacteriano (Wang *et al.*, 1989). En ésta curva el investigador fija un punto por encima de la línea base que se denomina umbral del ciclo. Los valores umbral del ciclo (*Ct value*) se determinan identificando el ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente atraviesa el punto umbral, por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción, y son los valores que se utilizarán para calcular la expresión génica relativa.

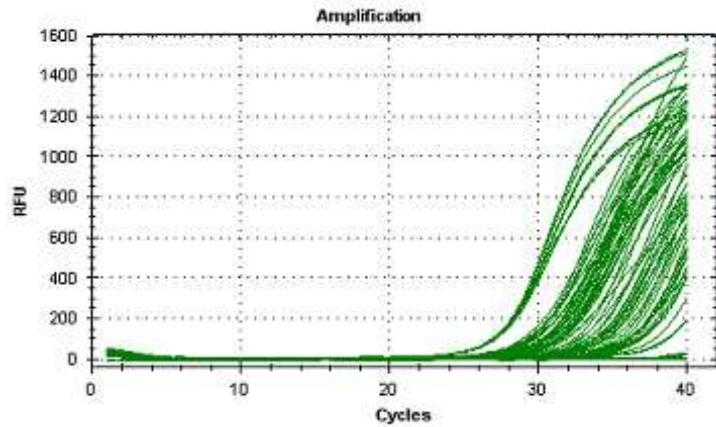


Figura 4. Curva de amplificación de ADNc detectada en el termociclador CFX 96 (BIO-RAD)

Por otra parte, al representar gráficamente la fluorescencia detectada en función de la temperatura se obtienen curvas de fusión. Ririe y col (1997) determinaron que la forma y posición de esta curva dependía del contenido de GC/AT y de la longitud de la secuencia, concluyendo que en muchos casos elimina la necesidad de realizar geles de electroforesis ya que en ellas se pueden diferenciar los productos específicos de la PCR de dímeros de *primer* y amplificaciones inespecíficas (figura 5).

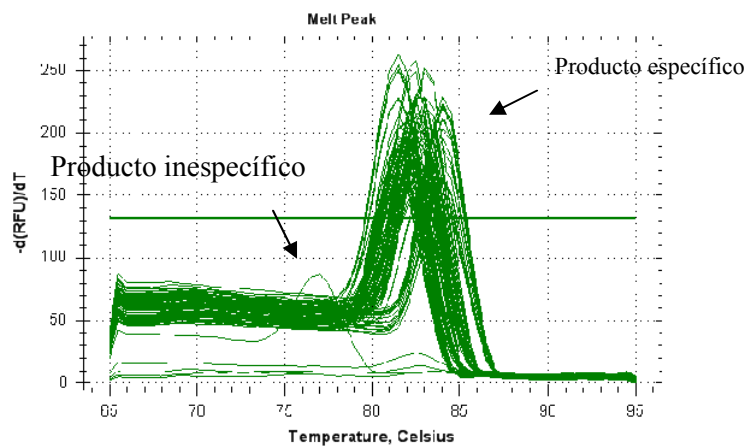


Figura 5. Curva de fusión ADNc detectada en el termociclador CFX 96 (BIO-RAD) durante la optimización del protocolo de RT-qPCR

A la hora de poner a punto un protocolo de RT-qPCR es muy importante conseguir que las variaciones normales de la prueba no causen efectos importantes en los valores Ct y que tengan un impacto mínimo en la cantidad de fluorescencia observada. Los criterios más importantes para la optimización son especificidad, eficiencia y reproducibilidad de la PCR en tiempo real (Edwards, 2004). La especificidad depende exclusivamente de los cebadores usados, y la eficiencia de cada reacción se calcula a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas (figura 6) de ADNc

(Pfaffl, 2004). En condiciones óptimas es del 100%, lo que significa que en cada ciclo se duplica el número de copias obtenidas.

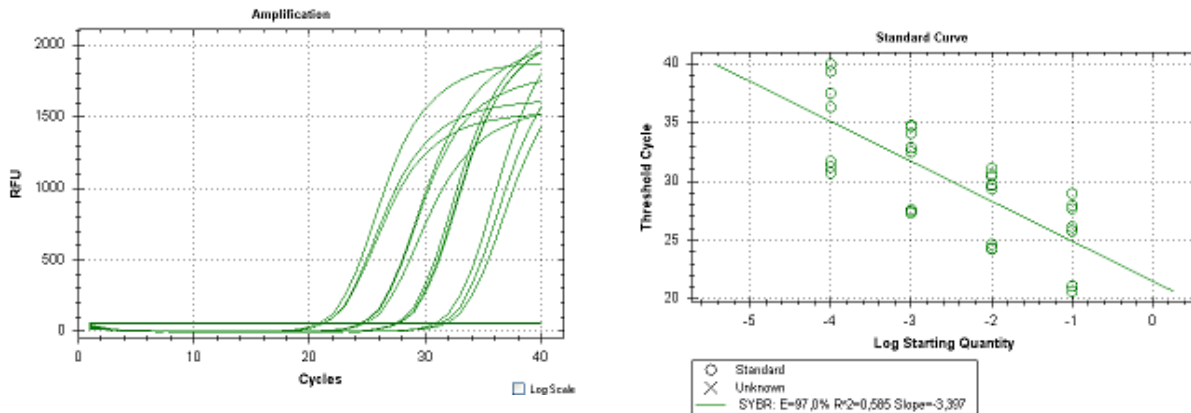


Figura 6. Izq: Curvas de amplificación de las diluciones seriadas de ADNc. Dcha: Representación los valores del logaritmo de la cantidad de ADNc detectado para cada dilución a lo largo de los 40 ciclos. La eficiencia de la reacción se calcula en base a la pendiente de la recta de regresión ajustada según la fórmula  $E=10^{[-1/\text{pendiente}]}$ .

En función de los objetivos del estudio se pueden llevar a cabo diferentes estrategias de cuantificación. Una de ellas es la cuantificación absoluta, mediante la cual es posible conocer el número de copias de ARNm de un gen relacionando la señal de fluorescencia obtenida con un número de copias fijo de una secuencia estándar utilizando una curva de calibración. Estas curvas son muy reproducibles y permiten la generación de datos específicos y sensibles, pero deben ser rigurosamente validadas ya que la cuantificación de la expresión genética dependerá exclusivamente de la precisión de los estándares empleados (Pfaffl, 2004)

En otros casos, como en este trabajo, el objetivo no es determinar de forma absoluta el número de moléculas de ARNm, sino detectar diferencias cuantitativas en la expresión de varios genes en distintas situaciones, lo que se conoce como cuantificación relativa.

Esta técnica se utiliza para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de un gen en estudio en comparación con uno o más genes de referencia (Pfaffl, 2004). Estos genes, comúnmente llamados *housekeeping genes* o controles endógenos, son escogidos porque su expresión es constante en todas las condiciones del estudio y actúan como control interno eliminando la variación debida a posibles diferencias producidas por la degradación parcial el ARN en alguna muestra, distinta eficiencia en la transcripción inversa, errores de pipeteo, etc (Hernandez *et al.*,



1994). Algunos de los controles internos más utilizados son la  $\beta$ -actina, cicloflina, gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenasa, hipoxantina guanina, fosforibosil-transferasa y 18S del ARN ribosomal (Huggett *et al.*, 2005). Existen varios modelos matemáticos disponibles para el cálculo de la expresión relativa, y todos ellos se basan en la comparación de los valores Ct obtenidos en cada condición del estudio, normalizados con los controles internos. Uno de los métodos más utilizados es el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , desarrollado por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, Forster City, CA), que asume una eficiencia del 100% en todas las reacciones. Otros métodos, como el propuesto por Pfaffl (2001) sí tienen en cuenta la eficiencia de la reacción tanto para el gen diana como para el gen de referencia.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 1. Microorganismo

#### 1.1 Origen y características de las cepas.

En este trabajo se han utilizado cinco cepas del hongo *Pleurotus ostreatus* var *florida* procedentes de la colección del Laboratorio de Genética y Microbiología de la UPNA:

- **N001.** Proporcionada por la empresa Gurelan S.C. (Huarte, Pamplona, España), es la cepa dicariótica modelo de estudio en nuestro laboratorio. Se trata de una cepa de crecimiento rápido y aéreo. Su genotipo para los genes de apareamiento es  $A_1A_2B_1B_2$ .
- **PC9.** Proclón haploide obtenido por de-dicariotización de N001(Larraya et al., 1999), actualmente disponemos de la secuencia completa de su genoma. Muestra el mismo patrón de crecimiento que N001 y su genotipo para los genes de apareamiento es  $A_2B_1$ . Depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de referencia 20311.
- **PC15.** Proclón haploide obtenido por de-dicariotización de N001(Larraya et al., 1999), actualmente disponemos de la secuencia completa de su genoma. Crece muy lentamente y de forma superficial. Su genotipo para los genes de apareamiento es  $A_1B_2$ . Depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de referencia 20312.
- **LL.** Cepa dicariótica obtenida mediante cruzamiento dirigido entre monocariontes de crecimiento lento aislados de la descendencia de N001 (MO19 x MO104). Su patrón de crecimiento es lento y de tipo superficial. Las características de los monocariontes utilizados para su obtención se resumen en la tabla 1.
- **RR.** Cepa dicariótica obtenida mediante cruzamiento dirigido entre monocariontes de crecimiento rápido aislados de la descendencia de N001 (MO67 x MO69). Su patrón de crecimiento es rápido y aéreo. Las características de los monocariontes utilizados para su obtención se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Características de los monocariontes utilizados para la obtención de RR y LL

Cepa	Factor de apareamiento	Tipo de crecimiento	Velocidad de crecimiento
MO67	<i>A2B1</i>	Aéreo	Rápido
MO69	<i>A1B2</i>	Aéreo	Rápido
MO19	<i>A2B1</i>	Superficial	Lento
MO104	<i>A1B2</i>	Aéreo	Lento



Figura 7. Cepas N001, PC9, PC15, RR y LL a día 11 de crecimiento en medio sólido agar malta

## 2. Diseño experimental:

Se llevaron a cabo dos experimentos principales, en primer lugar un ensayo de inducción de expresión génica y de actividad extracelular de enzimas degradadoras de lignina en cultivos sumergidos y en segundo lugar un seguimiento de dichas variables a lo largo del tiempo en cultivos en medio sólido.

Para el ensayo en medio líquido se utilizó extracto de paja como factor tratamiento y se analizó su efecto como inductor de la expresión génica y la actividad enzimática en la fase estacionaria de crecimiento. Se utilizaron cinco cepas distintas y se realizaron triplicados biológicos en las muestras inducidas y sin inducir.

Para el cultivo sólido se utilizó paja de trigo al 70% de humedad. Se asignaron al azar 20 matraces para cada cepa, sumando un total de 4 réplicas para cada uno de los cinco estadios (días 3, 5, 7, 9 y 11). De las 4 réplicas una se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar extracciones de ARN y las 3 restantes se utilizaron para extraer las enzimas secretadas al medio.

### 3 Medios de cultivo y soluciones:

#### 3.1 Medios de cultivo:

##### Medio Agar malta (Eger et al., 1976)

El Agar malta fue utilizado como medio sólido para el mantenimiento y expansión de inóculo de todas las cepas. Su composición es la siguiente:

Extracto de malta.....20 g/L

Agar.....15g/L

El medio fue autoclavado a 121°C durante 20 minutos

##### Medio M7G (Guillen, 1991)

Se utilizó como medio líquido definitivo para el crecimiento del hongo en todos los ensayos. Se trata de un medio basal en el que todos sus componentes son conocidos.

Amonio tartrato ..... 2 g/L

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O .....0,5 g/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....1 g/L

KCl .....0,5 g/L

<sup>1</sup>Glucosa..... 10g/L

<sup>2</sup>Solución de elementos traza.....1 ml/L

<sup>1</sup> Suplemento no presente en la composición del medio original

<sup>2</sup> Solución de elementos traza:

Na<sub>2</sub>BO.7H<sub>2</sub>O ..... 0,1 g/L

ZnSO<sub>4</sub> .....0,07 g /L

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ..... 0,01 g/L

MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O ..... 0,01 g/L

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O .....0,05 g /L

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ..... 0,01 g/L

El medio fue autoclavado a 110°C durante 15 minutos

### **3.2 Soluciones:**

#### Solución inductora

La sustancia inductora consistió en un extracto acuoso de paja de trigo que se preparó como se detalla a continuación:

Se añadieron 150 g de paja liofilizada en 1.5 L de agua destilada. La mezcla se mantuvo en agitación a 150 rpm y 25°C durante 5h. Posteriormente se separaron las fases. El líquido resultante se filtró, centrifugó y esterilizó durante 20 minutos a 121°C. Una vez enfriado se utilizó como complemento en los medios de cultivo líquidos para evaluar su eficacia como inductor de la expresión de genes degradadores de lignina.

## **4. Condiciones de cultivo.**

### **4.1 Mantenimiento y expansión de las cepas**

El micelio de cada cepa se sembró en placas de Petri con medio sólido agar malta, que fueron incubadas en oscuridad a 24°C hasta que el hongo cubrió la totalidad de la placa. Todas las maniobras de siembra y repicado se realizaron en condiciones de esterilidad frente a un flujo laminar estéril.

### **4.2 Obtención de inóculos**

Para la obtención de los inóculos primarios ( $I_0$ ) se utilizaron matraces de 500ml con 150 ml de medio M7 suplementado con 10g/l de glucosa (M7G). Cada matraz fue inoculado utilizando todo el micelio que albergaba una placa petri de 90mm. Los cultivos fueron triturados en esterilidad e incubados en oscuridad a 24°C, en agitación orbital a 150 rpm durante 3 días. Posteriormente se inocularon con 50 ml de cada  $I_0$  nuevos matraces que contenían 100ml de medio M7 con glucosa. Éstos fueron incubados en oscuridad a 24°C en agitación orbital durante 3 días para obtener el inóculo definitivo ( $I_1$ ) de cada cepa.

### **4.3. Cultivos para aislamiento de RNA y extracto enzimático**

#### **4.3.1 Cultivos en medio líquido**

##### Cultivos sin inducir

Se utilizaron matraces de 500ml con 135ml de medio M7G. Cada uno de ellos fue inoculado con 15ml de I<sub>1</sub> e incubado durante 11días en oscuridad a 24°C en agitación orbital y sin limitaciones de intercambio gaseoso. A los cultivos obtenidos en estas condiciones se los denominó tratamiento “control”.

##### Cultivos inducidos con extracto de paja

Se siguió el mismo procedimiento que en el caso anterior para cada cepa, salvo que se añadieron 50 ml de extracto de paja a los nueve días de cultivo. Tras la inducción, los matraces fueron incubados durante 48h en las condiciones ambientales descritas anteriormente antes de proceder a la separación del micelio y el extracto enzimático. A los cultivos obtenidos en estas condiciones se los denominó tratamiento “inducido”.

El micelio y el medio líquido con las enzimas secretadas fueron separados por filtración y se almacenaron a -80°C y -20°C, respectivamente.

#### **4.3.2 Cultivos en medio sólido**

Se utilizaron tarros de cristal con 10g de pellets de paja liofilizada triturada a la que se le añadieron 15 ml de agua destilada. Una vez autoclavados los tarros se inocularon con 18 ml de I<sub>1</sub> quedando la humedad final del sustrato cercana al 70%, de forma similar a los sustratos donde se desarrolla el hongo en condiciones de producción industrial. El micelio se extrajo de la superficie de la paja utilizando un asa de siembra estéril. Para extraer las enzimas secretadas se añadieron a cada frasco 50ml de buffer acetato de sodio 0.1M a pH 5 y se incubó durante 4h a 10 °C. Posteriormente se filtró el líquido resultante, conservando el micelio y el extracto enzimático a -80°C y -20°C, respectivamente.

## **5. Métodos de análisis de ácidos nucleicos**

### **5.1 Aislamiento de RNA**

El micelio de cada muestra, previamente extraído y conservado a -80°C fue triturado en un mortero estéril en presencia de nitrógeno líquido hasta quedar reducido a

polvo. Se extrajo el RNA total utilizando el kit “Fungal RNA e.Z.N.A” (Omega), siguiendo las indicaciones del fabricante que se describen brevemente a continuación:

- Colocar 100mg de micelio pulverizado congelado en un microtubos de 1,5 ml, añadir inmediatamente 500 uL de Buffer RB/2-mercaptoethanol y vortexear.
- Pipetear la mezcla en la columna de homogenización colocada sobre un tubo de 2ml y centrifugar a 13000x g durante 5min a temperatura ambiente.
- Transferir el filtrado a un nuevo tubo sin arrastrar el *pellet* y añadir 0.5 veces el volumen obtenido de etanol absoluto. Mezclar vortexeando y añadir toda la mezcla a la columna HiBind®. Centrifugar a 10000x g durante 30 segundos y descartar el líquido eluido.
- Añadir 500 µL de *Wash Buffer I* y centrifugar a 10000x g durante 30 segundos.
- Colocar la columna en un tubo nuevo y realizar dos lavados con 700 µL de *Wash Buffer II* diluido con etanol, centrifugando a 10000x g durante 30 segundos.
- Realizar la elución del RNA en 50 – 100 µL de agua tratada con DEPC precalentada a 65°C. Conservar a -80°C

## 5.2 Evaluación de la cantidad y calidad de RNA

La cuantificación de la cantidad de ARN aislado en cada muestra se llevó a cabo midiendo la absorbancia con espectofotómetro *Nanodrop* (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260nm para obtener la concentración de la suspensión, teniendo en cuenta que una unidad de  $A_{260}$  equivale a 50µg/ml de ARN. Para la estimación de su pureza se hicieron lecturas a 280nm y se obtuvo el cociente  $A_{260}/A_{280}$ , índice que informa de la pureza del ARN extraído. Valores cercanos a 1,8 – 2 indican una baja contaminación de nuestra muestra. Las muestras poco concentradas y/o con valores bajos de pureza se concentraron y purificaron utilizando el kit “RNeasy<sup>R</sup> MiniElute<sup>R</sup> Cleanup” (QUIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La calidad del ARN se evaluó en geles de agarosa al 1%. Se consideró que el ARN estaba degradado (descartándose la muestra) si no se podían distinguir nítidamente las bandas correspondientes al ARN ribosomal 28S y 18S (figura 8).

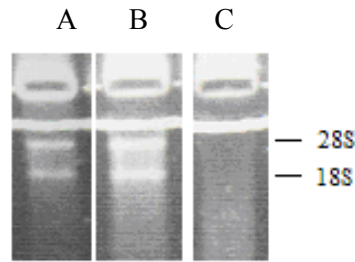


Figura 8. Diferentes niveles de degradación del RNA, evaluados en gel de agarosa al 1%  
A= Muestra intacta. B = muestra ligeramente degradada. C = muestra totalmente degradada

Para la elaboración de los geles, la agarosa se disolvió en agua miliQ estéril y se llevó a ebullición en el microondas. Se dejó enfriar hasta 60°C y se añadió tampón MOPS 10x y formaldehído al 37% (v/v). Se vertió en un molde adecuado y se dejó solidificar. En cada pocillo se cargó un volumen final de 19,2  $\mu$ L compuesto por 1  $\mu$ g de RNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ L), 2,2  $\mu$ L de MOPS 10X, 3,9  $\mu$ L de Formaldehido al 37%, 11,1  $\mu$ L de Formamida y 1  $\mu$ L de Bromuro de Etidio (5 mg/ml). Esta mezcla de componentes se incubó durante 5 minutos a 65°C y 2 minutos en hielo antes de cargarlas en el gel. A continuación se añadieron 3  $\mu$ L de tampón de carga 6X y se cargó el gel. La electroforesis se realizó a un voltaje de 80V durante una hora.

**Buffer amortiguador:** 20 mM MOPS (ácido 3(N-morfolino), 5 mM NaAC, 0,5 mM EDTA, 37 % Formaldeído.

**Tampón de carga 6X:** 0,2% azul de bromofenol (p/v), 0,2% xilen cianol (p/v), 25% glicerol,

**Formamida** estabilizada con serdolit

**Bromuro de etidio:** 5 mg/ml

### 5.3 Síntesis de cDNA

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1 $\mu$ g de ARN utilizando el *iScript* ADNc Synthesis Kit (BIO-RAD), que además de la retrotranscriptasa reversa incluye una mezcla de oligo(dT) y cebadores hexámeros aleatorios optimizada para la síntesis de ADNc a partir del ARN mensajero.

Para un volumen final de 20  $\mu$ l por reacción se añadieron 4 $\mu$ l de la mezcla de reacción *iScript* (5X), 1 $\mu$ l de retrotranscriptasa reversa, 1 $\mu$ g de ARN total (1 $\mu$ g/  $\mu$ l) y agua libre de nucleasas. Posteriormente se incubó 5 minutos a 25°C, 30 minutos 42°C y 5 minutos a 85°C.

Con el ADNc resultante se hicieron 4 diluciones seriadas que se conservaron a -20C hasta su utilización.



## 5.4 PCR a tiempo real

Las reacciones de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador CFX 96 de BIO-RAD con capacidad para placas de 96 pocillos. En cada uno de ellos se cargaron 20 µl de la siguiente mezcla de reacción: 10 ng de cDNA (10 ng/ µl), 10 µl de iQ SYBR Green Supermix (mezcla optimizada de iTaq™ DNA polimerasa, SYBR Green, dNTPs, buffer y estabilizadores) 100nmol de cebador específico directo, 100nmol de cebador específico reverso y agua libre de nucleasas. El programa de PCR utilizado, denominado *Cyph1*, consistió en una desnaturalización inicial de 5min a 95°, seguida de 40 ciclos 15 seg a 95°C, 30 seg a 65°C y finalmente una desnaturalización de 1min a 95°C y una renaturalización de 1min a 65°C. Se incluyó un control negativo (NTC) por cada mezcla de reacción para descartar posibles contaminaciones cruzadas entre muestras.

En la tabla 2 se muestran todos los cebadores utilizados en las reacciones de PCR a tiempo real y el tamaño del producto que amplifican.

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la qPCR a tiempo real y tamaño de los fragmentos amplificados.

Gen	Cebador	Secuencia (5'- 3')	Amplición (pb)
Lacc1	Directo	GGT ACA TCC TAG CAC CCA ATG	80
	Reverso	GAC GAG ATC AGT TTC CAA GAG G	
Lacc2	Directo	CCC TGG CAG ATT GGT ATC ATG	142
	Reverso	ATG ACA GCG TAA GGG ACA AG	
Lacc3	Directo	TCG TTT CCG TCT CGT TTC TC	134
	Reverso	CTG CGA AGA TTT GGA TGC TG	
Lacc4	Directo	CCC CAT CCT TTC CAT CTT CAC	72
	Reverso	GTA GTT ATA CAC CGA GCT TCC G	
Lacc5	Directo	CGC ATT TGC CGC TTT CTT	136
	Reverso	GGT GAC TAG GAC TGA GTA TCT C	
Lacc6	Directo	GTA CAA CTA CGA AAA CCC CG	140
	Reverso	CAA GGT CAA GAT GCC AGT	
Lacc7	Directo	GTT GAT AGC CTC CAG ATC TTC G	142
	Reverso	GTA GGA TGG CGG AGT TGA TG	
Lacc8	Directo	CAT TGG CTG TGA CTC GAA	137
	Reverso	GGA TCA GAG AAT AGC GTT GG	
Lacc9	Directo	CTA TCC TTC GGT ATG CTG GTG	145
	Reverso	ATA TTG ATG TCT GCG CCT CC	
Lacc10	Directo	CCT ACT TCC CCT TTG GCT ATC	122
	Reverso	ATG ACG AGC AAA GAG TGA CC	
Lacc11	Directo	CCT GAA TGG TCT GAT CTC TGC	93

Lacc12	Reverso	CCT ATG ACT TGG GCT CTT CG
	Directo	GTA CTC ATT TTC GGC TCC TG
	Reverso	CCA CGT AGT CCA TCG CAA TA

84

En estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio con las cepas N001, PC9 y PC15 se pudo constatar que no existían diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica entre réplicas biológicas para varios genes, por lo que se mezclaron y homogeneizaron los micelios de los triplicados durante la extracción de RNA y se realizaron tres repeticiones técnicas con el cDNA obtenido a partir de dicho RNA en cada qPCR.

Después de cada qPCR se analizaron las curvas de fusión con el *software* BioRad CFX Manager para identificar los productos específicos de la PCR, teniendo en cuenta que estos se disocian a una temperatura más alta que los artefactos como dímeros de *primer* (Ririe et al., 1997). La eficiencia de las reacciones se calculó a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo real de acuerdo a la siguiente fórmula (Higuchi *et al.*, 1993b):

$$E=10^{[-1/\text{pendiente}]}$$

### 5.5 Cuantificación de la expresión génica.

Las cuantificaciones se llevaron a cabo en base al valor del ciclo umbral (Ct) registrado en el software CFX de BIO-RAD en base a dos modelos distintos:

- Cuantificación relativa normalizada: Este método se basa en el modelo Delta-Delta Ct desarrollado por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, Forster City, CA), uno de los más utilizados para obtener cuantificaciones rápidas de muchos genes ya que no tiene en cuenta la eficiencia de la reacción. Los valores obtenidos para cada gen (gen diana) son normalizados con los niveles de Ct obtenidos para un gen calibrador, que en todos los casos consistió en el mismo gen diana en las condiciones de tratamiento control (ver Materiales y métodos, 4.3.1). Para ello se utilizó la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

$$\Delta Ct = Ct(\text{gen diana}) - Ct(\text{Control endógeno})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct(\text{calibrador})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Incremento de expresión del gen diana sobre el calibrador}$$

Los valores Ct del gen diana y del calibrador se corrigieron con los obtenidos en el control endógeno para eliminar variaciones debidas a errores de pipeteo, degradación parcial del ARN o diferencias en la eficiencia de la retrotranscripción a ADNc.

- Cuantificación  $2^{-\Delta Ct}$ : Es una derivación del método anterior, mediante la cual eliminamos de la ecuación la expresión de los genes calibradores y así podemos ver su expresión en verdadera magnitud en lugar de normalizada a un valor constante de 1. Además, aplicando este modelo obtenemos valores de expresión directamente proporcionales a la cantidad absoluta transcrito, por lo que además de comparar cuantas veces más se expresa un gen diana respecto a su control (modelo anterior), podemos conocer que si un gen diana A se expresa más o menos que otro gen diana B.

## **6. Análisis enzimático.**

### **6.1 Cuantificación de la actividad enzimática extracelular**

Las actividad lacasa extracelular se determinó por espectrofotometría usando 2,6-dimetoxifenol (DMP) como sustrato específico (Slomczynski et al., 1995). El volumen total de reacción por cubeta fue de 1ml, conteniendo 450  $\mu$ L de muestra y 500  $\mu$ L de DMOP 10mM en *buffer* acetato de sodio 0,1M. Se utilizó un espectofotómetro *Shimadzu* UV-1800 y el producto de la oxidación del DMPO fue valorado como incremento de la absorbancia durante 60 segundos a una longitud de onda de 468nm y a una temperatura de 20°C. El valor resultante de la medición son Unidades Internacionales de actividad (U), que es la cantidad de enzima necesaria para consumir 1  $\mu$ mol de sustrato en 1 minuto.

### **6.2 SDS-PAGE**

Los geles de proteínas se realizaron siguiendo lo descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook et al., 1989). Las diferente bandas se separaron en geles SDS-PAGE (Laemmli, 1970) de acrilamida al 12% en una cubeta de electroforesis BIO-RAD Modelo Mini Protean. Tatra System a 120V durante 90 min. Con la finalidad de identificar cada fracción según su peso molecular se cargó en cada extremo del gel un patrón de proteínas de peso molecular conocido. Se realizaron 2 lavados consecutivos de 5 minutos con *buffer* acetato de sodio 0,1M y se realizó una tinción activa con 2,6-dimetoxifenol. La identificación de las distintas bandas se estableció por comparación con los marcadores de peso moleculares

Las características de los geles y bufferes utilizados durante la preparación y la electroforesis se describen a continuación:

**Stacking gel: 4 ml**

H <sub>2</sub> O.....	2,7 ml
Mezcla de acrilamida 30% .....	0,67ml
Tris pH 6,8 1M .....	0,5 ml
SDS 10% .....	0,04 ml
Persulfato amónico 10% .....	0,04 ml
TEMED .....	0,004 ml

**Resolving gel: 15 ml**

H <sub>2</sub> O.....	4ml
Mezcla de acrilamida 30%.....	3,3 ml
Tris pH 8,8 1,5 M .....	2,5 ml
SDS 10%.....	0,1 ml

**Buffer de carga:**

Agua destilada .....	3,8ml
Tris HCl 0.5M (pH 6,8).....	1ml
Glicerol.....	0,8ml
SDS 10%.....	1,6ml
Bromofenol blue (1%) .....	0,4 ml

**Buffer de corrida**

Tris Base .....	15 g/L
Glicina .....	72 g/L
SDS.....	5 g/L
pH = 6,8	

## 7. Análisis de datos

### 7.1 Expresión génica relativa

Los datos fueron analizados con el software estadístico *R*. La prueba estadística *t* de Student fue utilizada para comparar de forma aislada la expresión de cada gen entre los dos tratamientos y el control. Se realizó la prueba de ANOVA con cada cepa para comprobar si existían diferencias significativas entre los tratamientos, y se utilizó el test de Tukey (Tukey, 1949) para confirmar entre que tratamientos se daban dichas diferencias. Se realizó el test de Shapiro-Wilk (Shapiro and Wilk, 1965) para comprobar la normalidad de todos los modelos. Un  $p < 0.05$  fue considerado como diferencia estadísticamente significativa.

## 3. RESULTADOS

---

---

### **Capítulo 1: Análisis de la expresión génica relativa de genes codificantes de lacasas de *Pleurotus ostreatus*.**

*Pleurotus ostreatus* es un hongo de podredumbre blanca que de forma natural libera enzimas degradadoras de lignina al medio en el que se aloja. De entre estas enzimas son de gran interés las lacasas, un grupo de fenol oxidasas capaces de oxidar inespecíficamente compuestos fenólicos y aromáticos. En *Pleurotus ostreatus* se han identificado hasta hoy doce genes codificantes de lacasas que componen la familia multigénica responsable de su actividad lacasa total. En este trabajo se ha cuantificado la expresión génica relativa mediante qPCR de los doce genes en cinco cepas de *Pleurotus ostreatus* cultivadas en tres medios de cultivo diferentes: un medio mínimo sintético (tratamiento control), un medio mínimo sintético en presencia de un inductor (tratamiento inducido) y un medio a base de paja de cereal.

#### **1.1- Extracción de ARN**

Se realizaron extracciones de ARN total de las cinco cepas en las diferentes condiciones de cultivo, obteniéndose la cantidad y calidad suficiente para la posterior retrotranscripción de 1µg de ARN a ADNc.

#### **1.2. Optimización de la qPCR:**

Todas las reacciones de qPCR llevadas a cabo usando como molde el cDNA de RR, LL, N001, PC9 y PC15 con el programa de amplificación *Cyph1*, dieron lugar a curvas de fusión que fueron analizadas para detectar la posible presencia de artefactos en la reacción. Se utilizó una mezcla de reacción optimizada y cebadores diseñados sobre transcrito que mostraron elevada especificidad, de modo que no se amplificaron productos inespecíficos en ninguna de ellas (figura 9). La eficiencia de las reacciones se mantuvo en todos los casos entre el 95 y el 100%, aunque para los cálculos de cuantificación relativa se consideró óptima (correspondiente al 100%) e idéntica, según

lo establecido por Livaka y Schmittgen (2001). Los resultados de las reacciones de qPCR se presentaron en forma de valores Ct (Valor umbral del ciclo, ver Materiales y métodos, 9.1) que fueron utilizados para calcular los niveles de expresión génica.

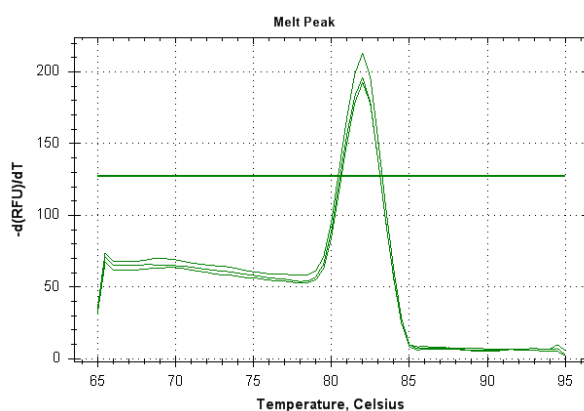


Figura 9. Ejemplo de curva de fusión de los triplicados del gen Lacc3 en PC9 cultivado en paja. Se observa la amplificación de específica de un solo producto de PCR y la ausencia de dímeros de primer y amplificaciones inespecíficas.

### 1.3. Cuantificación de la expresión génica

#### 1.3.1 Cuantificación de la expresión relativa normalizada

A continuación se presentan los niveles de expresión relativa de los doce genes estudiados en las cinco cepas, en medios líquido (control e inducido) y sólido (paja de trigo) a día 11 de cultivo, calculados por el método Delta-Delta Ct desarrollado por PE Applied Biosystems en base a la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Los valores obtenidos representan el número de veces que se expresa más el gen diana que el calibrador, que es el mismo gen diana en las condiciones del tratamiento control (ver Materiales y métodos 4.3.1). Es decir, valores iguales a uno representan una expresión idéntica entre el gen diana y el calibrador. Valores menores que uno, expresión menor del gen diana frente al calibrador y valores mayores que uno, expresión mayor del gen diana frente al calibrador.

#### Efecto del inductor en la expresión génica en cultivos líquidos:

Con el objetivo de estudiar el mecanismo de regulación de la transcripción de las lacasas por inductores de tipo aromático, se cuantificó la expresión relativa de los doce genes 48 horas después de la inducción con extracto de paja de trigo y se normalizó con respecto a los valores de expresión de los doce genes en el tratamiento control (Tabla 4). Aparentemente la inducción provocó un efecto mayor en las cepas de crecimiento lento (LL y PC15) que en las de crecimiento rápido (RR, N001y PC9) ya

que en ellas los 12 genes mostraron una expresión relativa mayor que el control. No obstante, teniendo en cuenta el error de precisión de esta tecnología hemos fijado el umbral mínimo de significatividad del incremento en 2 (el gen diana se expresa 2 veces más en el medio inducido que en el control), por lo que el incremento observado en la mayoría de los genes de LL y PC15 no es significativo. En las cepas de crecimiento rápido se sobreexpresaron menos genes pero en ellos el incremento fue más fuerte, llegando a mostrar niveles de expresión hasta 6 veces mayores que en el control (Lacc10 en N001). Los genes Lacc2 y Lacc10 fueron los más sobreexpresados en todas las cepas. Lacc8 no mostró expresión en PC9 ni en RR, ya que se trata de un gen hemicigótico localizado en el cromosoma VII de PC15 pero no en el de PC9. Por otra parte, no se observaron tendencias distintas en la inducción de la expresión entre monocariontes (PC9 y PC15) y dicariontes (LL, RR, N001).

Tabla 3. Cuantificación relativa de las 12 lacasas evaluada mediante RT-qPCR en medio líquido M7 en agitación a día 11, 48h después de la inducción con extracto de paja de trigo. Valores: Inducido (diana) vs Control (calibrador)

<b>Gen</b>	<b>LL</b>	<b>RR</b>	<b>N001</b>	<b>PC9</b>	<b>PC15</b>
Lacc1	1,18 ± 0,07	0,11 ± 0,01	0,97 ± 0,07	0,33 ± 0,02	1,26 ± 0,04
Lacc2	1,35 ± 0,04	4,92 ± 0,22	1,77 ± 0,12	1,7 ± 0,22	3,17 ± 0,41
Lacc3	1,48 ± 0,05	0,24 ± 0,02	0,7 ± 0,04	0,97 ± 0,01	1,03 ± 0,07
Lacc4	1,01 ± 0,04	1,45 ± 0,05	0,98 ± 0,05	2,36 ± 0,18	4,28 ± 0,2
Lacc5	2,56 ± 0,11	0,34 ± 0,01	1,84 ± 0,18	1,37 ± 0,01	2,15 ± 0,05
Lacc6	1,26 ± 0,12	0,38 ± 0,04	N	0,27 ± 0,01	1,66 ± 0,11
Lacc7	1,47 ± 0,05	0,15 ± 0,0	0,99 ± 0,06	0,41 ± 0,05	1,08 ± 0,04
Lacc8	1,98 ± 0,16	0	0,68 ± 0,08	0	2,06 ± 0,11
Lacc9	1,34 ± 0,08	0,23 ± 0,0	N	0,38 ± 0,00	1,32 ± 0,03
Lacc10	2,04 ± 0,03	2,74 ± 0,04	6,41 ± 0,33	3,07 ± 0,05	1,36 ± 0,09
Lacc11	1,42 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,77 ± 0,04	0,37 ± 0,01	1,39 ± 0,06
Lacc12	1,22 ± 0,04	N	0,9 ± 0,05	0,34 ± 0,02	1,23 ± 0,14

Las casillas con N representan valores ausentes debido a fallos en la reacción de PCR

### Expresión relativa normalizada en cultivos sólidos

Para obtener más información sobre el efecto del medio de cultivo en la transcripción de los genes codificantes de lacasas, se cuantificó la expresión relativa de los doce genes *Lacc* en micelio de las cinco cepas cultivadas en medio sólido a base de paja de trigo a día 11, y se normalizó con respecto a los valores de expresión de los doce genes en el tratamiento control en medio M7G sin inducir (Tabla 5). La expresión mostrada por los doce genes a día 11 fue claramente menor cuando el hongo fue

cultivado en paja que cuando se cultivó en medio control, con la excepción de Lacc3 (PC9), Lacc8 (N001) y Lacc2 (RR). Éste último fue el gen que mostró mayor incremento de expresión respecto al control (cuatro veces más). Por otra parte, no se encontraron diferencias aparentes entre monocariontes y dicariontes ni entre cepas de crecimiento rápido y lento.

Tabla 4. Cuantificación relativa de las 12 lacasas evaluada mediante RT-qPCR en paja de trigo a día 11. Valores: Paja (diana) vs Control (calibrador)

	LL	RR	N001	PC9	PC15
Lacc1	0,34 ± 0,01	0,37 ± 0,03	0,91 ± 0,08	0,16 ± 0,00	0,49 ± 0,04
Lacc2	0,05 ± 0,01	4,11 ± 0,1	0,19 ± 0,02	0,6 ± 0,14	0,17 ± 0,45
Lacc3	0,39 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,72 ± 0,07	2,1 ± 0,03	0,47 ± 0,1
Lacc4	0,5 ± 0,05	0,44 ± 0,07	0,57 ± 0,06	0,17 ± 0,01	0,52 ± 0,26
Lacc5	1,08 ± 0,2	0,32 ± 0,03	0,64 ± 0,07	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,26
Lacc6	0,2 ± 0,03	0,49 ± 0,0	N	0,4 ± 0,00	0,96 ± 0,19
Lacc7	0,47 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,75 ± 0,07	0,26 ± 0,01	0,55 ± 0,11
Lacc8	0,61 ± 0,03	0	2,02 ± 0,18	0	0,73 ± 0,3
Lacc9	0,62 ± 0,04	0,24 ± 0,02	1,01 ± 0,09	0,36 ± 0,00	1,21 ± 0,03
Lacc10	1,36 ± 0,03	0,3 ± 0,00	0,82 ± 0,07	0,53 ± 0,03	0,54 ± 0,09
Lacc11	0,57 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,86 ± 0,07	0,31 ± 0,01	0,67 ± 0,16
Lacc12	0,52 ± 0,01	N	0,9 ± 0,1	0,37 ± 0,02	0,51 ± 0,06

Las casillas con N representan valores ausentes debido a fallos en la reacción de PCR

### 1.3.2 Cuantificación de la expresión por el método $2^{-\Delta Ct}$

La cuantificación normalizada proporciona información sobre la cantidad de expresión de un gen en valores relativos. Podemos saber cuánto se expresa un gen con respecto a su calibrador, pero no nos da ninguna información de esta con respecto a los demás genes estudiados. Como estamos trabajando con una familia multigénica, es muy importante poder comparar las expresiones de los doce genes en la misma escala. Es conocido que para una eficiencia de la reacción del 100% el valor absoluto de expresión guarda una correlación positiva con el valor  $2^{-Ct}$  (Livaka and Schmittgen, 2001). Mediante la transformación  $2^{-\Delta Ct}$  eliminamos las variaciones debidas al efecto “tubo” (diferencias producidas por la degradación parcial el ARN en alguna muestra, distinta eficiencia en la transcripción inversa, errores de pipeteo, etc) al incluir un control endógeno y obtenemos un valor directamente proporcional a la cantidad total de transcrito de cada gen, pudiendo comparar así cantidades de expresión de un gen respecto a otro dentro de una misma cepa, o entre cepas distintas. Además, al eliminar de



la ecuación los genes calibradores (las doce lacasas en las condiciones de tratamiento control) podemos ver su expresión en verdadera magnitud, en lugar de normalizada a un valor constante e igual a 1. En las figuras 10, 11, 12, 13 y 14 se muestra de forma gráfica la expresión de los doce genes en base a la fórmula  $2^{-\Delta Ct}$  para cada una de las cepas analizadas en este trabajo. Las barras van acompañadas con letras que indican si la diferencia entre tratamientos (medios de cultivo) es o no estadísticamente significativa según la prueba estadística *t* de Student ( $p < 0.05$ ).

En el **dicarionte LL** (Figura 10) el gen Lacc2 fue el que registró una expresión más alta en los cultivos líquidos, tanto en el tratamiento control como en el inducido, mientras que Lacc10 fue el que más se expresó en medio sólido. La expresión aumentó en 11 de los 12 genes tras ser inducidos con el extracto de paja, si bien este aumento sólo fue significativo en 3 de ellos (Lacc5, Lacc10 y Lacc11). En el cultivo en paja la expresión de 10 de los 12 es significativamente menor que en el control, siendo mayor en tan sólo en uno de ellos (Lacc10).

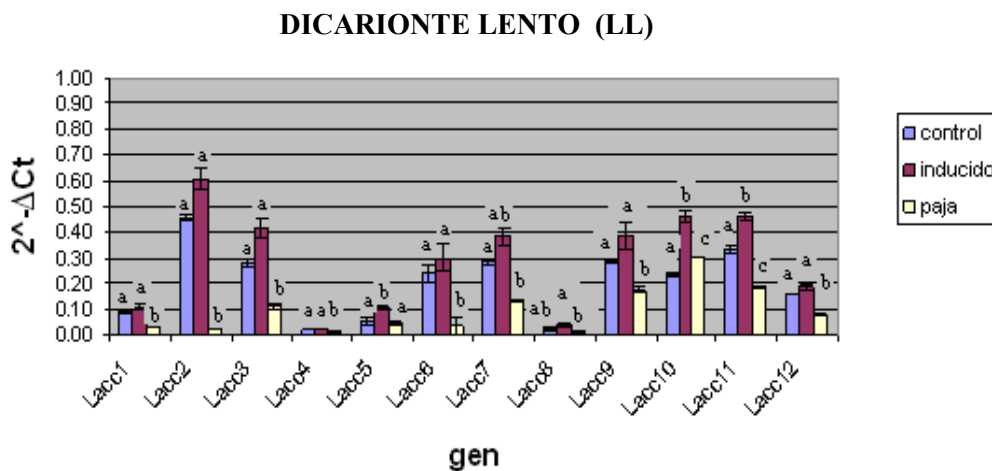


Figura 10. Representación gráfica de los valores del parámetro  $2^{-\Delta Ct}$  en el dicarionte lento (LL). La misma letra en columnas diferentes dentro de un mismo gen indica ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

En el **dicarionte RR** (Figura 11) el gen Lacc6 fue el que más expresión mostró en el medio líquido control, mientras que tras la inducción los valores más altos se registraron para Lacc10. Tan sólo Lacc2 y Lacc10 tuvieron una inducción positiva significativa. Lacc3, Lacc5, Lacc6, Lacc9 y Lacc11 disminuyeron significativamente su expresión tras la inducción, justo al contrario que en el dicarionte lento LL, cepa en la que estos cinco genes se sobreexpresaron. Esto pone

de manifiesto la posible existencia de un sistema de regulación para estos genes que podría estar ligado a la velocidad de crecimiento. En el medio sólido Lacc2 mostró una expresión significativamente mayor que la del control, mientras la de todos los demás genes se vio disminuida.

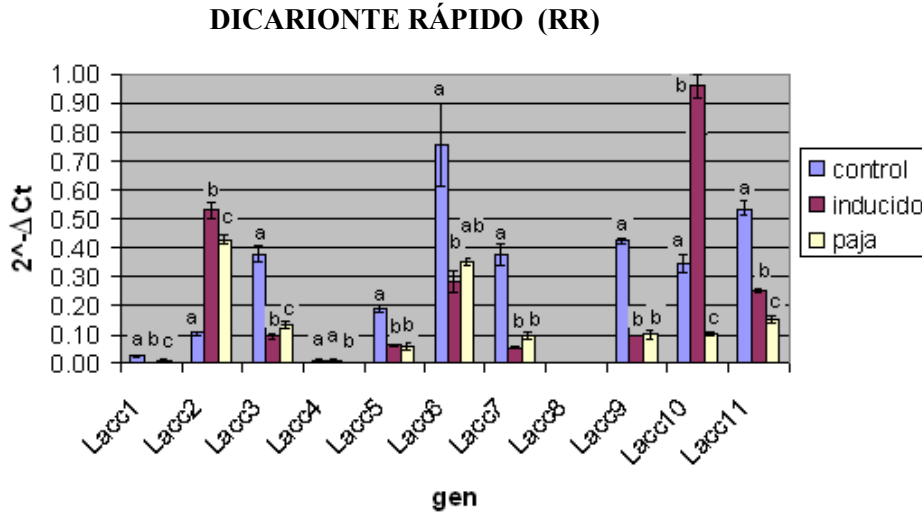


Figura 11. Representación gráfica de los valores del parámetro  $2^{-\Delta Ct}$  en el dicarionte rápido (RR). La misma letra en columnas diferentes dentro de un mismo gen indica que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

En el **dicarionte N001** (Figura 12) el gen Lacc11 fue el más expresado en el medio control. La inducción fue significativa en los genes Lacc2, Lacc6 y Lacc10. En este último gen la expresión se incrementó más de 6 veces sobre su nivel basal. En el medio sólido los 12 genes se expresaron menos que en el control, si bien estas diferencias sólo fueron significativas en Lacc1, Lacc2 y Lacc7.

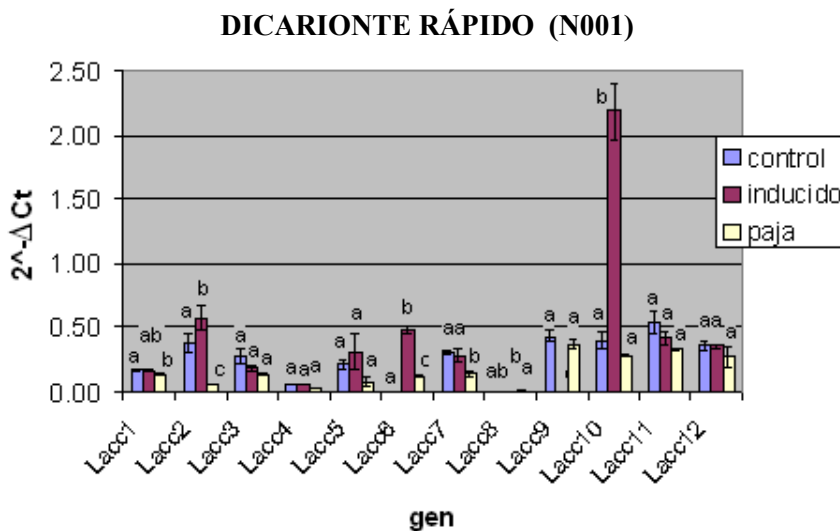


Fig 12. Representación gráfica de los valores del parámetro  $2^{-\Delta Ct}$  en N001. La misma letra en columnas diferentes dentro de un mismo gen indica que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

En el **monocariote PC9** (Figura 13), Lacc9 y Lacc11 fueron los genes que más se expresaron en el medio control. La inducción sólo fue significativa en Lacc4 y Lacc10. En éste último se observó (de la misma forma que en N001) un elevado aumento en la expresión de dicho gen (más de 3 veces respecto al medio control). Por el contrario, la expresión en los genes Lacc1, Lacc6, Lacc7, Lacc9, Lacc11 y Lacc12 se redujo tras la inducción. En el medio sólido la expresión fue significativamente menor en todos los genes salvo en Lacc2, en el que permaneció invariable (aunque en cantidades muy pequeñas) y Lacc3, en el que aumentó significativamente.

### MONOCARIOTE RÁPIDO (PC9)

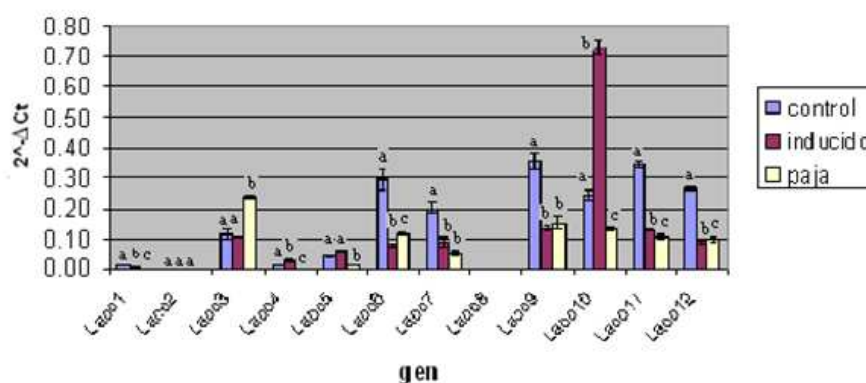


Fig 13. Representación gráfica de los valores del parámetro  $2^{-\Delta Ct}$  en PC9. La misma letra en columnas diferentes dentro de un mismo gen indica que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

En el **monocariote PC15**, Lacc9 y Lacc11 fueron los genes más expresados en el control. La inducción produjo un aumento de expresión significativa en los genes Lacc1, Lacc4, Lacc5, Lacc6, Lacc7, Lacc8, Lacc9, Lacc10, y Lacc11, siendo en el gen Lacc4 donde más se incrementó. En cuanto al medio sólido, la expresión con respecto al control disminuyó significativamente en todos los genes salvo en Lacc9, donde aumentó, y en Lacc4, Lacc6, Lacc8 y Lacc11, donde la variación no fue significativa.

### MONOCARIONTE LENTO (PC15)

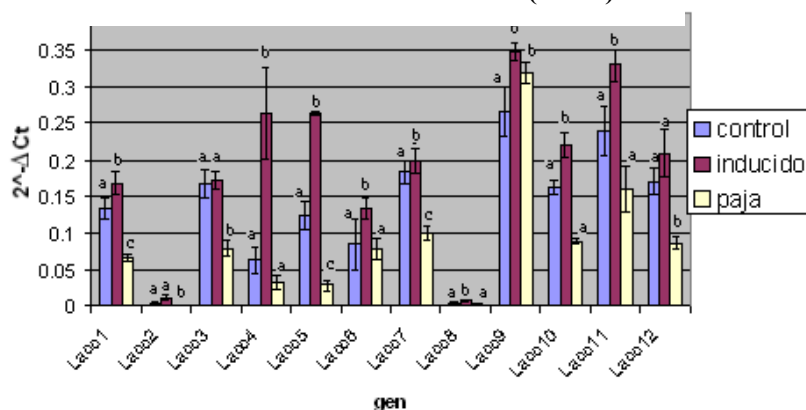


Fig 14. Representación gráfica de los valores del parámetro  $2^{-\Delta Ct}$  en PC15. La misma letra en columnas diferentes dentro de un mismo gen indica que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ )

#### 1.4. Análisis estadístico:

Se realizó la prueba de ANOVA y un test de Tukey de comparación de medias para cada una de las cinco cepas utilizando los valores de cuantificación  $2^{-\Delta Ct}$  (donde  $\Delta Ct = Ct$  (diana) -  $Ct$  (control endógeno)) de cada gen para comprobar si la inducción con extracto de paja en medio líquido y el cultivo en paja de trigo producen cambios estadísticamente significativos en la expresión de los doce genes respecto al tratamiento control. En la tabla 6 se resumen los resultados del análisis estadístico.

Tabla 5. Resultados del test de Tukey para LL, RR, N001, PC9, PC15

	Control	Inducido	Paja
LL	a	b	c
RR	a	a	b
N001	a*	a*	a*
PC9	a*	a*	a*
PC15	a	b	c

La presencia de una misma letra en columnas distintas indica que no existen diferencias significativas entre medios de cultivo para un  $\alpha=0.05$

\*Los resultados obtenidos en el ANOVA para N001 y PC9 no son concluyentes dado que los residuos del modelo no se ajustan a una distribución normal

Del tratamiento estadístico de los datos se obtiene la siguiente información:

- El extracto de paja de trigo provoca cambios significativos en la expresión global de la familia multigénica en las cepas de crecimiento lento (LL y PC15) a día 11, 48h después de ser añadido al medio de cultivo M7G.

- El extracto de paja de trigo no provoca cambios estadísticamente significativos en la expresión global de la familia multigénica en RR a día 11, 48h después de ser añadido al medio de cultivo M7G.
- Los niveles de expresión global de la familia multigénica en las cepas de crecimiento lento (LL y PC15) a día 11 son diferentes para cada medio de cultivo analizado, con un nivel de significación del 95%.
- Los niveles de expresión global de la familia multigénica en RR en los medios líquidos (tanto inducido como control) son diferentes a los del medio sólido, con un nivel de significación del 95%.

Para N001 y PC9 no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tres medios, aunque los resultados para estas dos cepas no son concluyentes ya que tras la realización del ANOVA se comprobó que el modelo no cumplía la hipótesis básica de normalidad.

## **Capítulo 2: Estudio de la actividad enzimática extracelular codificada por la familia multigénica de las lacasas.**

### **2.1 Actividad enzimática extracelular**

Desde hace tiempo se conoce que la actividad lacasa en los basidiomicetos está codificada por varios genes (Saloheimo *et al.*, 1991). Estudios más recientes llevados a cabo en diferentes laboratorios (entre ellos el nuestro) han aportado información más precisa acerca de la familia multigénica de las lacasas en *Pleurotus ostreatus* (Giardina *et al.*, 1999; Kilaru *et al.*, 2006; Pezzella *et al.*, 2009; Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2008), y actualmente disponemos de la secuencia y la localización de doce genes que forman dicha familia multigénica. No obstante, existe muy poca información sobre qué genes tienen más peso en la actividad extracelular en diferentes condiciones de cultivo. Uno de los objetivos principales de este trabajo es analizar la regulación de la transcripción de estos genes en cultivos sólidos y líquidos, y tratar de asociar aumentos de expresión en determinados genes con aumentos de actividad de las diferentes isoenzimas para conocer qué genes son los responsables de la mayor parte de la actividad extracelular detectada

en cada medio. Para ello se midieron las actividades enzimáticas de las cinco cepas en los tres medios utilizados a día 11 y se corrieron geles de proteínas SDS-PAGE para identificar las isoenzimas más abundantes en cada medio. Además se realizó una monitorización de la actividad lacasa extracelular del cultivo en paja en función del tiempo que ayudará a comprender mejor el comportamiento del hongo en procesos de pretratamiento de materiales lignocelulósicos.

### 2.1.1 Actividad enzimática en medio líquido

La figura 15 muestra los valores de actividad lacasa extracelular de las cinco cepas en medio líquido M7G en las condiciones de tratamiento control e inducido. En las cinco cepas la actividad enzimática obtenida en el tratamiento control resultó nula. 48 horas después de la inducción con extracto de paja, RR, PC9 y N001 experimentaron un gran aumento en la actividad extracelular, detectándose una actividad de entre 40 y 100 U.L<sup>-1</sup>. Por el contrario las cepas de crecimiento lento LL y PC15 no mostraron ningún cambio respecto al tratamiento control.

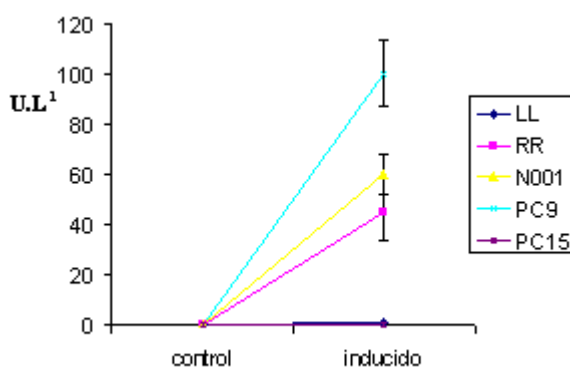


Figura 15. Actividad lacasa extracelular a día 11 en los medios M7G “control” y M7G “inducido”.

### 2.1.2. Actividad enzimática en medio sólido

Las figuras 16 y 17 muestran las curvas de actividad lacasa extracelular de RR, LL, N001, PC9 y PC15 cultivadas en paja de trigo a días 0, 3, 5, 7 y 11. En la cepa LL la actividad registró un aumento suave durante los primeros siete días de crecimiento. A partir de entonces mostró un pico que llegó a su máximo el día nueve con una media de 120 U.L<sup>-1</sup>. A partir de aquí la actividad cayó en picado hasta el día once, registrándose valores similares a los obtenidos a día tres. En la cepa RR la actividad lacasa extracelular aumentó rápidamente, registrándose al tercer día valores cercanos al pico máximo de alrededor de 110 U.L<sup>-1</sup>. A partir de aquí la actividad cayó hasta el día nueve a partir del cual volvió a aumentar ligeramente.

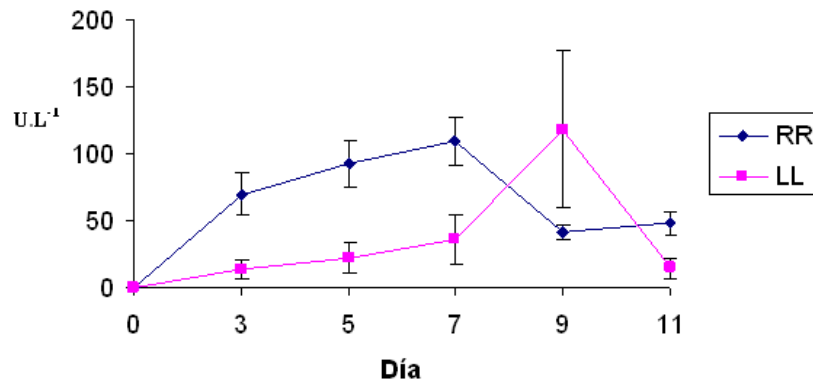


Figura 16. Actividad lacasa extracelular de las cepas RR y LL en paja de trigo

N001 mostró un patrón de secreción en oleadas, registrándose dos picos de actividad a días tres y once de 60 y 80 U.L<sup>-1</sup> respectivamente. PC9 mostró un patrón de secreción muy similar a N001 con un pico máximo de 45 U.L<sup>-1</sup> de media a día tres, mientras que PC15 no secretó lacasas al medio en los 11 días de cultivo.

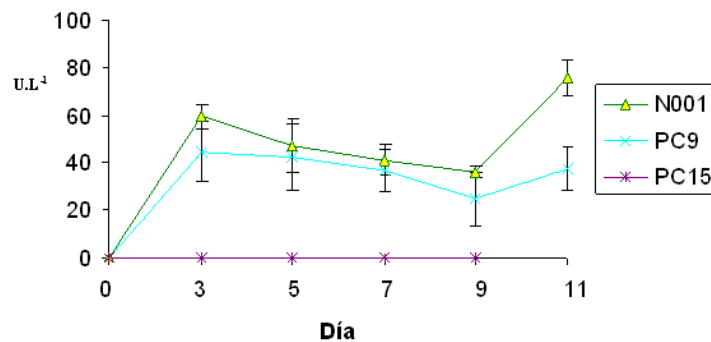


Fig 17. Actividad lacasa extracelular de las cepas N001, PC9 y PC15 en paja de trigo

## 2.2 Geles SDS-PAGE

### 2.1.1 SDS-PAGE a partir de extracto de medio líquido

Los geles SDS-PAGE corroboraron los datos de actividad enzimática obtenidos para los cultivos líquidos en el tratamiento control e inducido. En la figura 18 se muestra como la tinción activa con DMPO no produjo ninguna banda en las extracciones de los cultivos control (C) de ninguna cepa, confirmando que en estas condiciones el hongo no secretó lacasas al medio (ver Resultados, 2.2.1). En las extracciones a partir de cultivos

inducidos (I) en medio líquido apareció una banda de 40 kDa, correspondiente a la principal isoenzima responsable de la actividad lacasa medida por espectrofotometría. El extracto de PC15 no mostró bandas en las condiciones de control ni tras la inducción, indicando que no es capaz de secretar enzimas al medio bajo las condiciones de cultivo ensayadas. Las bandas del marcador de peso molecular de las figuras 18, 19 20 21 y 22 se corresponden con los siguientes valores (kDa), en orden descendente: 199-116-79-52-37-29-19-6.

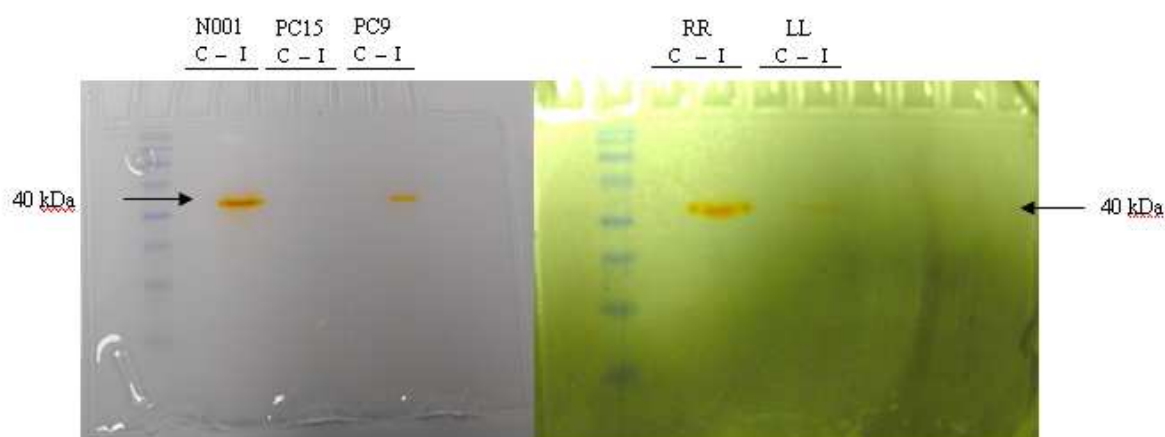


Fig 18. Gel SDS-PAGE cargado con extracto enzimático crudo obtenido a partir de cultivos líquidos inducidos (I) y sin inducir (c).

### 2.1.1 SDS-PAGE a partir de extracto de medio sólido

En las figuras 19, 20 y 21 se muestran los geles SDS-PAGE cargados con extracto enzimático obtenido a partir de los cultivos en paja a días 3, 5, 7 y 9 y teñidos con DMPO. En los cinco tiempos de cultivo apareció la isoforma de 40 kDa de forma mayoritaria. Otra isoforma de 65 kDa apareció en extracto de la cepa RR a día 7, coincidiendo con la fase de cultivo que mayor actividad presenta. En los geles cargados con el extracto de PC15 no se detectó la presencia de ninguna isoforma, evidenciando nuevamente la ausencia de enzimas secretadas al medio por esta cepa.



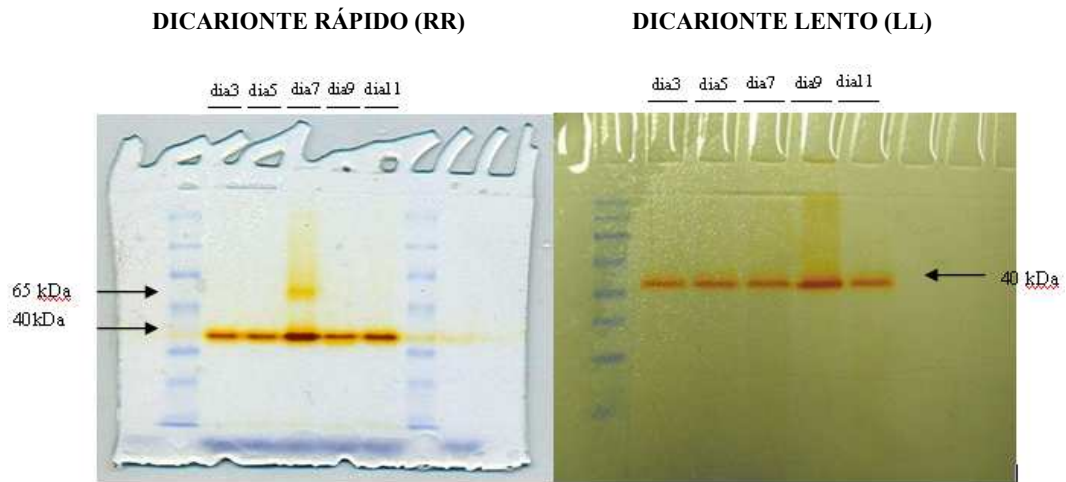


Figura 19. Geles SDS-PAGE cargados con extracto enzimático crudo obtenido a partir de cultivo en paja de la cepa

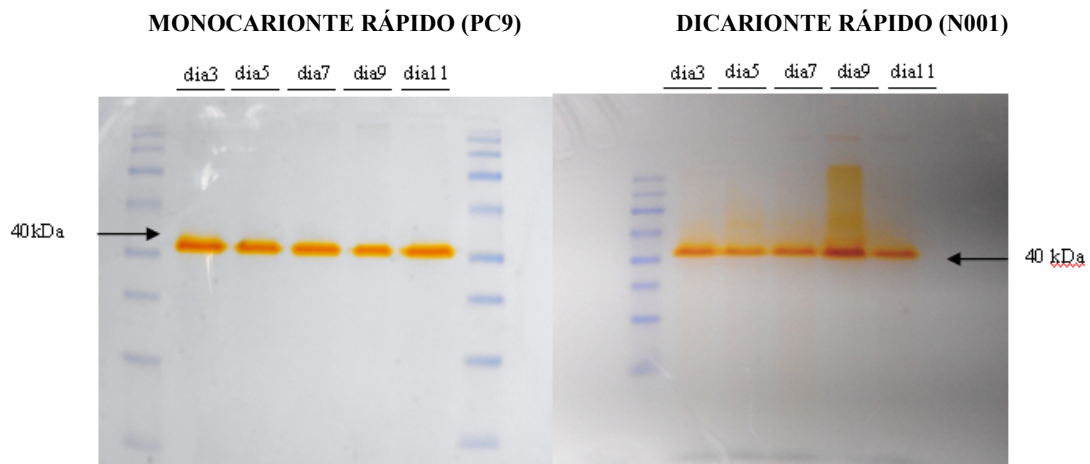


Figura 20. Gel SDS-PAGE cargado con extracto enzimático crudo obtenido a partir de cultivo en paja de la cepa monocarionte PC9 (izq), y el dicarionte N001 a días.

**MONOCARIONTE LENTO (PC15)**

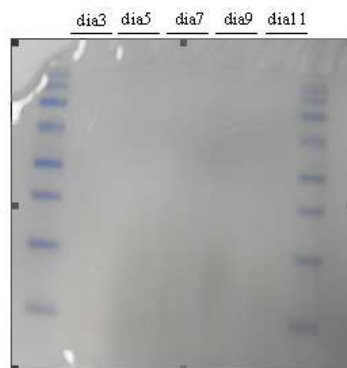


Figura 21. Gel SDS-PAGE cargado con extracto enzimático crudo obtenido a partir de cultivo en paja de la cepa monocarionte PC15, a días 3,5,7,9 y 11

## 4. DISCUSIÓN

---

Los hongos basidiomicetos secretan lacasas extracelulares de forma constitutiva y se ha demostrado que su producción es estimulada por la presencia en el medio de cultivo de un amplio rango de sustratos inductores, principalmente componentes aromáticos o fenólicos relacionados con la lignina, como ácido ferúlico, 2,5-xylidine, veratryl alcohol, etc.(Gianfreda *et al.*, 1999). También se han utilizado previamente inductores de tipo metálico (Palmieri *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2009), ya que es conocido que las secuencias promotoras de las lacasas contienen múltiples elementos de respuesta a metales (Faraco *et al.*, 2003) .

Los materiales lignocelulósicos como la paja de trigo representan una fuente barata y abundante de compuestos fenólicos como los ácidos ferúlico, *p*-cumárico, caféico, gentísico, vainílico y siríngico (Pan *et al.*, 1998), fácilmente extraíbles en medios acuosos y con gran potencial para su uso en la industria de la biotecnología blanca. Por ello resulta de gran interés conocer la respuesta biológica a nivel de transcripción de los genes que codifican enzimas degradadoras de lignina frente a estos compuestos.

Con este objetivo se ha evaluado el efecto de un extracto de paja de trigo sobre de la expresión génica de doce genes codificantes de lacasas en cinco cepas de *Pleurotus ostreatus* var *florida* cultivadas en medio líquido sintético. Para ello se realizaron experimentos de qPCR sobre ADNc y se analizaron los datos mediante dos modelos de cuantificación de la expresión génica:

Los resultados obtenidos mediante la cuantificación relativa normalizada con genes de referencia (método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  desarrollado por *Applied Biosystems*) aportaron información valiosa sobre el comportamiento aislado de cada gen, siendo importante remarcar que estos valores se corresponden con incrementos relativos sobre el gen calibrador y no con la expresión absoluta. Para profundizar más en el estudio y determinar que genes se expresan más de forma absoluta en cada medio, hemos utilizado el método  $2^{-\Delta Ct}$ , una variación del anterior que elimina el gen de referencia de la ecuación y mediante el cual podemos representar valores de expresión directamente proporcionales a la cantidad total de transcrito de cada gen, siempre que la eficiencia de las reacciones sea idéntica o muy similar.

Los resultados obtenidos por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  indican que, teniendo en cuenta las cinco cepas, los genes Lacc2, Lacc4, Lacc5 y Lacc10 fueron los más sobreexpresados 48 horas después de la inducción con extracto de paja. Se fijó el umbral mínimo de significatividad del aumento de expresión en un valor de 2 (el gen diana se expresa el doble que el calibrador). En base a este criterio el monocarionte lento PC15 fue la cepa con mayor número de genes sobreexpresados significativamente (Lacc2, Lacc4, Lacc5 y Lacc8) mientras que el dicarionte rápido N001 la cepa con menor número de genes sobreexpresados (Lacc10). No obstante, el aumento de expresión de este gen fue el máximo registrado en todas las cepas y en todas las condiciones de cultivo (6,4 veces más en el medio inducido que en el control, en la cepa N001). Estos resultados sugieren que de entre los doce genes que componen la familia de las lacasas, los genes Lacc2, Lacc4, Lacc5 y Lacc10 tienen un papel importante en el conjunto de procesos que dan lugar a la degradación de la lignina, ya que su expresión se ve incrementada significativamente en presencia de compuestos fenólicos característicos de la paja de cereal.

La información de la cuantificación  $2^{-\Delta Ct}$  confirmó que Lacc10 (además de ser el gen con mayor sobreexpresión relativa) fue el gen con mayor cantidad de transcrito en RR, N001 y PC9 (cepas de crecimiento rápido), y el segundo en LL y PC15 (cepas de crecimiento lento). Palmieri y col. (2000) obtuvieron resultados similares para Lacc10 con otros inductores y encontraron que la isoenzima para la que codifica era la más abundante en todos los medios de cultivo utilizados. Por otra parte, gracias a los resultados de este modelo ( $2^{-\Delta Ct}$ ) pudimos detectar que la expresión del gen Lacc2 es específica de dicariontes. La expresión de éste gen es mínima cuando la cepa contiene un sólo alelo (monocariontes PC15 y PC9), y experimenta un drástico aumento en los dicariontes (N001, RR y LL) cuando los dos alelos están presentes (ver Resultados, figuras 10-14). También se estableció una comparativa entre los perfiles de expresión de las cepas LL y RR, obtenidas a partir de cruzamientos dirigidos entre monocarionte lentos y rápidos respectivamente y anteriormente utilizadas en el mapeo de QTLs relacionados con la actividad degradadora de lignina (Santoyo *et al.*, 2008). Pudo comprobarse que tras la inducción, los genes Lacc6, Lacc9 y Lacc11 tuvieron comportamientos antagónicos en las dos cepas (en LL aumentó la expresión y en RR disminuyó). Estos tres genes se encuentran en el mismo cluster y se transcriben en la misma dirección. La cepa LL es heterocigótica en esta región cromosómica (alelos de

PC9 y PC15) mientras que RR es homocigótica (posee los dos alelos de PC9), por lo que podríamos encontrarnos ante un fenómeno de heterosis.

De forma paralela se cuantificó la expresión relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  a partir del micelio cultivado en paja de cereal a día 11 de cultivo. Se obtuvieron niveles de expresión menores que en el medio líquido control (M7G) para la mayoría de genes en todas las cepas, considerando que una expresión menor de 0,5 (el gen diana se expresa la mitad que el gen calibrador) era significativa. Los únicos genes sobreexpresados fueron Lacc2 en RR, Lacc3 en PC9 y Lacc8 en N001. Estos resultados por sí solos no aportan información concluyente, ya que únicamente disponemos de información sobre la expresión en un momento muy concreto (día 11). Es muy probable que las diferencias en los niveles de expresión de los genes *Lacc* entre el medio sólido y el control sean consecuencia directa de las condiciones de cultivo, ya que muchos parámetros relacionados con la expresión diferencial de estos genes como la producción de biomasa, el contenido en glucosa, el contenido en carbono y nitrógeno (Patel *et al.*, 2009) o el pH (Mansur *et al.*, 2003) son totalmente distintos en ambos medios. No obstante, constituyen un punto de partida para el estudio de la dinámica de la expresión génica a lo largo del tiempo de cultivo en medios compuestos por materiales lignocelulósicos como la paja de cereal.

Para poder aportar información más profunda sobre la regulación de la expresión génica de los genes *Lacc* y su importancia en el proceso ligninolítico global es necesario contrastar los datos obtenidos sobre el nivel de transcripción con el comportamiento de la actividad enzimática. El análisis del patrón de isoenzimas secretadas al medio nos ha permitido elaborar teorías sobre qué genes tienen un papel más importante en la actividad ligninolítica en las condiciones de cultivo utilizadas, y la cuantificación la actividad lacasa extracelular a lo largo del tiempo de cultivo nos ha permitido entender la cinética de secreción de estas enzimas, y establecer los tiempos clave de estudio de la expresión génica para futuros trabajos en función de los picos de secreción observados.

En los ensayos realizados en medio líquido M7G la actividad enzimática de las cepas de crecimiento rápido (RR, N001 y PC9) se vio claramente inducida por el extracto de paja, mientras que en las de crecimiento lento (LL y PC15) no produjo ningún efecto y no se detectó actividad extracelular. Los resultados a nivel de transcripción indican que tanto en PC15 como en LL hay una inducción significativa en los genes *Lacc*, así que la ausencia de actividad extracelular podría deberse a un

hipotético silenciamiento postranscripcional, a una incapacidad de secretar enzimas al medio, o a la presencia de proteasas en los medios de cultivo. No obstante, este último razonamiento es poco probable ya que se llevaron a cabo triplicados biológicos de cada cepa y las unidades experimentales se asignaron al azar en las 5 cepas. Por otra parte, al separar el extracto enzimático mediante electroforesis en SDS-PAGE y realizar una tinción activa con DMPO, se observó una isoforma de alrededor de 40 kDa exclusivamente en los cultivos inducidos en N001, PC15 y PC9. Sin embargo, no apareció ninguna banda en PC15 ni en LL. Estos datos, que por una parte concuerdan con los obtenidos en las actividades enzimáticas, resultan sorprendentes dado que los doce genes codificantes de lacasas anotados hasta ahora codifican proteínas sustancialmente más grandes, de entre 54 y 67 kDa. Esta discordancia puede deberse a que el grado de desnaturalización de las enzimas que forman moléculas muy compactas y/o no esféricas afecta a la estimación de su peso molecular en los geles SDS-PAGE. Este fenómeno se ha detectado anteriormente en otros basidiomicetos como en *Schizophyllum commune*, que produce una lacasa que migra con un aparente peso molecular de 37 kDa en geles SDS-PAGE, pero después de desnaturalizarla hirviéndola durante 5 minutos lo hace a 64 kDa (Thurston, 1994a). De ser así, es probable que la mayor parte de la actividad se deba a uno de los genes que mayor expresión génica mostraron en la cuantificación  $2^{-\Delta Ct}$  (Lacc2, Lacc4, Lacc5 o Lacc10). La existencia de *splicing* alternativo podría explicar la presencia de una enzima de menor tamaño, y también lo haría la existencia de otro gen *Lacc* todavía sin anotar, aunque esta opción parece poco probable ya que las secuencias genómicas completas de PC9 y PC15 están disponibles desde 2008 y todos los genes *Lacc* han sido anotados y curados de forma manual.

Las mediciones de actividad lacasa liberada al medio compuesto por paja de cereal nos permitieron intuir un sistema de secreción en oleadas modulado por la velocidad de crecimiento. Comparando el dicarionte rápido RR frente al lento LL se observó que el RR tardó 7 días en alcanzar su pico máximo de secreción, mientras que LL se demoró hasta 9 días. En cuanto las actividades detectadas en el dicarionte N001 y en los dos monocariontes derivados de él (PC9 y PC15), se observó un fenómeno de sobredominancia entre PC9 y PC15. La curva de actividad de PC9 fue muy similar a la de N001 mientras que PC15 no secretó lacasas durante todo el ciclo (ver Materiales y Métodos, figura 17), lo que sugiere que toda la actividad de N001 se debe en realidad al núcleo correspondiente a PC9.

En cuanto al patrón de isoenzimas mostrado por el extracto enzimático de cultivos en paja en los geles SDS-PAGE, volvió a detectarse la misma banda de entorno a 40 kDa en los extractos de los 5 días analizados y en todas las cepas salvo en PC15. Este dato, junto con el de la ausencia de actividad en todos los medios hace que la teoría sobre la incapacidad de PC15 de secretar lacasas al medio cobre fuerza. Además, ocasionalmente apareció otra banda de alrededor de 65 kDa en los días de mayor actividad en cepas rápidas como en RR. En otros trabajos realizados con *Pleurotus ostreatus* se han identificado hasta 6 isoformas en geles SDS-PAGE incubados en DMPO en rangos de pH de 3.5 a 8.5 y en diferentes tiempos de cultivo (Díaz, 2009). La existencia de tantos genes codificando para isoformas distintas que muestran mayor o menor actividad en diferentes condiciones ambientales podría explicarse, desde un punto de vista evolutivo, como una ventaja adaptativa que permite al hongo ser más selectivo y eficaz en los procesos de degradación de lignina inherentes a su sistema de alimentación y por lo tanto indispensables para su supervivencia.

## 5. CONCLUSIONES

- La actividad lacasa extracelular de las cepas de crecimiento rápido RR, N001 y PC9 se incrementa significativamente en los cultivos líquidos en medio M7G tras la adición de extracto acuoso de paja de trigo en la fase estacionaria de crecimiento.
- Dentro de la familia multigénica que codifica lacasas en *Pleurotus ostreatus*, los genes Lacc2, Lacc4, Lacc5 y Lacc10 son los que más incrementan su expresión como respuesta a la adición de extracto acuoso de paja de cereal una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento en medio líquido M7G en las cinco cepas analizadas.
- La expresión del gen Lacc2 es específica de dicariontes.
- Se ha identificado una isoenzima que migra a 40 kDa en geles SDS-PAGE como la principal responsable de la actividad lacasa en los medios líquidos inducidos y en los medios a base de paja de cereal.
- Por el momento no ha sido posible asociar de forma inequívoca la isoenzima de 40 kDa a uno de los 12 genes *Lacc*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bertrand, G. (1985) Sur la laccase et sur le pouvoir oxidant de cette diastase. *CR Acad. Sci.*: 266-269.
- Bustin, S.A. (2000) Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**: 169-193.
- Cavalier-Smith, T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* **73**: 203-266.
- De Jong, E., De Vries, F.P., Field, J.A., van der Zwan, R.P., and de Bont, J.A.M. (1992) Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity. *Mycological Research* **96**: 1098-1104.
- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P., and Bally, R. (2000) Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 919-927.
- Diaz, R. (2009) Efecto del pH inicial del desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de laccasas. (*unpublished*).
- Edwards, K.J. (2004) Real-Time PCR; An Essential Guide. *Horizon Bioscience*.
- Eger, G., Eden, G., and Wissig, E. (1976) &lt;i>Pleurotus Ostreatus&/i>; — breeding potential of a new cultivated mushroom. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **47**: 155-163.
- Faraco, V., Giardina, P., and Sannia, G. (2003) Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology-Sgm* **149**: 2155-2162.
- Gianfreda, L., Xu, F., and Bollag, J.M. (1999) Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* **3**: 1-25.
- Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G., and Sannia, G. (1999) Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* **341**: 655-663.
- Giardina, P., Palmieri, G., Fontanella, B., Rivieccio, V., and Sannia, G. (2000) Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **376**: 171-179.
- Guillen, F. (1991) Aryl-alcohol oxidase of *Pleurotus eryngii*. Study in relation with the degradation of lignin.
- 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., and Pegler, D.N. (1995) Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*: xii + 616 pp.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**: 986-994.
- Hernandez, A., Martin Vasallo, P., Torres Ramirez, A., and Salido, E. (1994) RNA analysis: The study of genic expression. *NEFROLOGIA* **14**: 145-162.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993a) Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* **11**: 1026-1030.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993b) 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.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., and Zumla, A. (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity* **6**: 279-284.
- Jennings, D.H., Lysek, G., Jennings, D.H., and Lysek, G. (1996) Fungal biology: Understanding the fungal lifestyle. *Fungal biology: Understanding the fungal lifestyle*: xvii+156p.
- Kerem, Z., Friesem, D., and Hadar, Y. (1992) Lignocellulose Degradation During Solid-State Fermentation - *Pleurotus-Ostreatus* Versus *Phanerochaete-Chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1121-1127.



- Kilaru, S., Hoegger, P., and Kues, U. (2006) The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Current Genetics* **50**: 45-60.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* **227**: 680-8.
- Larraya, L., Penas, M.M., Perez, G., Santos, C., Ritter, E., Pisabarro, A.G., and Ramirez, L. (1999) Identification of incompatibility alleles and characterisation of molecular markers genetically linked to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetics* **34**: 486-493.
- Larraya, L.M., Perez, G., Ritter, E., Pisabarro, A.G., and Ramirez, L. (2000) Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5290-5300.
- Lee, J. (1997) Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology* **56**: 1-24.
- Lewis, N.G., and Yamamoto, E. (1990) Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 455-496.
- Livaka, K., and Schmittgen, T. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$  Method. *METHODS* **25**: 402-408.
- Mansur, M., Arias, M.E., Copa-Patino, J.L., Flardh, M., and Gonzalez, A.E. (2003) The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. Vol. 95, pp. 1013-1020.
- McPherson, M.J., Hames, B.D., and Taylor, G.R. (2008) PCR: a Practical Approach. *Oxford University Press*.
- Moore, D. (1998) Fungal Morphogenesis. *Developmental and Cell Biology Series*.
- Novotny, C., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Sasek, V., and Molitoris, H.P. (2001) Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology* **89**: 113-122.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., and Sannia, G. (2000) Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 920-924.
- Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G., and Giardina, P. (2003) Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology* **33**: 220-230.
- Pan, G.X., Bolton, J.L., and Leary, G.J. (1998) Determination of Ferulic and p-Coumaric Acids in Wheat Straw and the Amounts Released by Mild Acid and Alkaline Peroxide Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 5283-5288.
- Park, S.K., Penas, M.M., Ramirez, L., and Pisabarro, A.G. (2006) Genetic linkage map and expression analysis of genes expressed in the lamellae of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genetics and Biology* **43**: 376-387.
- Patel, H., Gupte, A., and Gupte, S. (2009) Effect of Different Culture Conditions and Inducers on Production of Laccase by a Basidiomycete Fungal Isolate *Pleurotus Ostreatus* Hp-1 under Solid State Fermentation. *Bioresources* **4**: 268-284.
- Peñas, M.M. (1999) Hidrofobinas asociadas a diferentes fases del desarrollo del hongo *Pleurotus ostreatus*.
- Pezzella, C., Autore, F., Giardina, P., Piscitelli, A., Sannia, G., and Faraco, V. (2009) The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Current Genetics* **55**: 45-57.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**.
- Pfaffl, M.W. (2004) Quantification Strategies in Real-Time PCR. *A-Z of Quantitative PCR* 87-120.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., and Wittwer, C.T. (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**: 154-160.

- Ruhl, M. (2009) Laccases and other ligninolytic enzymes of the basidiomycetes *Coprinopsis cinerea* and *Pleurotus ostreatus*- submerged and solid state fermentation, morphological studies of liquid cultures and characterisation of new laccases.
- Saloheimo, M., Niku-Paavola, M.-L., and Knowles, J.K.C. (1991) Isolation and structural analysis of the laccase gene from the ligninegrading fungus *Phlebia radiata*. Vol. 137, pp. 1537-1544.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Molecular cloning: a laboratory manual*.: xxxviii + 1546 pp.
- Santoyo, F., Gonzalez, A.E., Terron, M.C., Ramirez, L., and Pisabarro, A.G. (2008) Quantitative linkage mapping of lignin-degrading enzymatic activities in *Pleurotus ostreatus*. *Enzyme and Microbial Technology* **43**: 137-143.
- Shapiro, S.S., and Wilk, M.B. (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **52**: 591-611.
- Sjostrom, E. (1981) Wood chemistry. *Academic Press*: 223.
- Slomczynski, D., Nakas, J.P., and Tanenbaum, S.W. (1995) Production and Characterization of Laccase from *Botrytis-Cinerea*-61-34. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 907-912.
- Tekere, M., Read, J.S., and Mattiasson, B. (2010) An evaluation of organopollutant biodegradation by some selected white rot fungi: An overview. In *WIT Transactions on Ecology and the Environment*. Vol. 132, pp. 131-141.
- Thurston, C.F. (1994a) The structure and function of fungal laccases. Vol. 140, pp. 19-26.
- Thurston, C.F. (1994b) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26.
- Tlecuitl-Beristain, S., Sánchez, C., Loera, O., Robson, G.D., and Díaz-Godínez, G. (2008) Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. *Mycological Research* **112**: 1080-1084.
- Tukey, J. (1949) Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*.
- Valmaseda, M., Martinez, M.J., and Martinez, A.T. (1991) Kinetics of Wheat Straw Solid-State Fermentation with *Trametes-Versicolor* and *Pleurotus-Ostreatus* - Lignin and Polysaccharide Alteration and Production of Related Enzymatic-Activities. *Applied Microbiology and Biotechnology* **35**: 817-823.
- Wang, A.M., Doyle, M.V., and Mark, D.F. (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 9717-9721.
- Whittaker, R.H. (1969) New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science* **163**: 150-&.
- Yoshida, H. (1883) LXIII.-Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *Journal of the Chemical Society, Transactions* **43**: 472-486.

