



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

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

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

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

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

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

Palabras clave: Pleurotus, lacasas, silenciamiento.

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

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

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

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

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



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

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

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

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

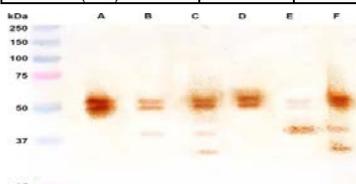


Fig. 2. Perfil zimográfico de isoenzimas de lacasa en la cepa nativa A) y mutantes B), C), D), E) y F).

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

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

Bibliografía.

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