



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS**



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Pycnoporus* spp.”

PRESENTA:

BIÓL. LIZBETH CORONEL PASTOR

PARA OBTENER EL GRADO:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL

CUERNAVACA MORELOS, MAYO 2019

INDICE GENERAL

| | Págs. |
|--|-------|
| ABREVIATURAS | 6 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 7 |
| 2. MARCO TEORICO | 9 |
| 2.1 <i>Pycnoporus</i> spp. | 9 |
| 2.1.1 Clasificación taxonómica | 9 |
| 2.1.2 Descripción morfológica | 10 |
| 2.1.3 Distribución geográfica | 11 |
| 2.1.4 Metabolitos de <i>Pycnoporus</i> | 13 |
| 2.1.5 Enzimas de interés biotecnológico en hongos de pudrición blanca | 14 |
| 2.2. Métodos de identificación de hongos | 16 |
| 2.2.1 Marcadores moleculares | 16 |
| 3. ANTECEDENTES | 18 |
| 3.1 Identificación morfológica de las especies del género <i>Pycnoporus</i> | 18 |
| 3.2 Uso de Marcadores moleculares para la identificación de <i>Pycnoporus</i> sp | 18 |
| 4. JUSTIFICACION | 22 |
| 5. HIPÓTESIS | 22 |
| 6. OBJETIVOS | 23 |
| 6.1 Objetivo general | 23 |
| 6.2 Objetivos específicos | 23 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| 7.1 Organismos | 24 |
| 7.2 Medios de cultivo | 24 |
| 7.3 Reactivos | 24 |
| 7.4 Siembra de las cepas | 24 |
| 7.5 Extracción del DNA | 24 |
| 7.6 Amplificación por PCR | 25 |
| 7.6.1 Diseño de los oligonucleótidos | 25 |
| 7.6.2 Estandarización de las condiciones para PCR | 26 |
| 7.7 Secuenciación y análisis bioinformático | 27 |
| 7.7.1 Secuencias de las bases de datos | 27 |
| 7.7.2 Programas utilizados para el análisis de secuencias | 28 |
| 7.7.3 Programas utilizados para la construcción de árboles filogenéticos | 28 |
| 8. RESULTADOS | 29 |

| | | |
|-------|--|----|
| 8.1 | Diseño de oligonucleótidos | 29 |
| 8.2 | Extracción de ADN | 29 |
| 8.3 | Amplificación de las regiones genómicas por PCR | 30 |
| 8.3.1 | Amplificación del gen <i>lcc3-1</i> usando los oligos internos | 32 |
| 8.4 | Análisis bioinformáticos | 34 |
| 8.4.1 | Análisis BLAST | 34 |
| 8.4.2 | Construcción de árboles filogenéticos | 39 |
| 8.5 | Análisis de resultados | 41 |
| 9. | CONCLUSIONES | 44 |
| 10. | PERSPECTIVAS | 44 |
| 11. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 45 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Págs. |
|---|-------|
| Figura 1. Tipos principales de pudrición en la madera | 7 |
| Figura 2. Hongo de <i>Pycnoporus</i> sp. sobre un tronco | 9 |
| Figura 3. Morfología de <i>Pycnoporus</i> sp. | 10 |
| Figura 4. Distribución actualizada de <i>Pycnoporus sanguineus</i> con base a lo reportado por los herbarios nacionales | 11 |
| Figura 5. Mapas con los reportes de los avistamientos de <i>Pycnoporus</i> spp. | 13 |
| Figura 6. Representación gráfica de las dos regiones de ITS | 17 |
| Figura 7. Arbol filogenético de Maximum likelihood basado en las secuencias de la región ITS de las 36 cepas de <i>Pycnoporus</i> | 20 |
| Figura 8. Arbol filogenético de Maximum likelihood basado en secuencias parciales del gen de la β -tubulina de las 36 cepas de <i>Pycnoporus</i> | 21 |
| Figura 9. Arbol filogenético de Maximum likelihood basado en secuencias parciales del gen de la lacasa (F2-R8) de las 36 cepas de <i>Pycnoporus</i> | 21 |
| Figura 10. Tabla con los organismos utilizados en la identificación de Lesage-Meessen y colaboradores | 21 |
| Figura 11. Secuencia de <i>Pycnoporus</i> ejemplificando donde pegarían los oligos diseñados para amplificar el fragmento del gen <i>lcc3-1</i> en 3 fragmentos más pequeños de 566 pb, 611 pb y 507. | 26 |
| Figura 12. Gel de electroforesis al 0.8% de la amplificación de la región ITS de la cepa HEMIM-51 | 31 |
| Figura 13. Gel de electroforesis al 0.8% de la amplificación de la región parcial del gen de β -tubulina de la cepa HEMIM-51 | 31 |
| Figura 14. Gel de electroforesis al 0.8% de la amplificación del gen <i>lcc3-1</i> de la cepa HEMIM-51 | 32 |
| Figura 15. Gel de electroforesis al 0.8% con la amplificación del gen <i>lcc3-1</i> usando los oligos F2 (Lesage-Meeseen) y RL3 | 33 |
| Figura 16. Gel de electroforesis al 0.8% con la amplificación del gen <i>lcc3-1</i> usando los oligos FL3 y RL4 | 33 |
| Figura 17. Alineación de las secuencias ITS de la cepa HEMIM-51 con secuencias ITS del banco de datos | 35 |
| Figura 18. Resultados del análisis BLAST del primer fragmento del gen <i>lcc3-1</i> | 37 |
| Figura 19. Resultado del análisis BLAST para el segundo fragmento del gen <i>lcc3-1</i> | 38 |
| Figura 20. Resultados del BLAST de los dos fragmentos unidos del gen <i>lcc3-1</i> | 39 |
| Figura 21. Árbol filogenético de Máxima verosimilitud con base a las secuencias ITS de la cepa HEMIM-51 | 40 |
| Figura 22. Árbol filogenético de Máxima verosimilitud con base a las secuencias β -tubulina de la cepa HEMIM-51. | 40 |

INDICE DE TABLAS

| | Págs. |
|--|-------|
| Tabla 1. Características de las esporas del estudio realizado por Díaz en el 2013 | 18 |
| Tabla 2. Oligonucleótidos degenerados diseñados para el gen <i>lcc3-1</i> | 25 |
| Tabla 3. Condiciones de tiempo y temperatura para las reacciones de PCR para la amplificación de las regiones genómicas | 26 |
| Tabla 4. Cantidades de reactivos utilizados para una reacción de PCR de 50 μ l | 27 |
| Tabla 5. Oligos para las secuencias de los genes de las ITS, β -tubulina, lacasas y fenoxazinona sintasa y cantidades sintetizadas | 29 |
| Tabla 6. Oligos para las secuencias de los genes de las ITS, β -tubulina, lacasas y fenoxazinona sintasa y cantidades sintetizadas | 29 |
| Tabla 7. Cuantificación de DNA y valores de pureza en el rango de absorbancia 260/280. | 30 |
| Tabla 8. Resultados del análisis BLAST de la secuencia de la región ITS de la cepa HEMIM-51 | 34 |
| Tabla 9. Resultados del análisis BLAST de la secuencia de la región parcial del gen β -tubulina de la cepa HEMIM-51 con secuencias del GeneBank. | 36 |
| Tabla 10. Cepas re-identificadas usando la secuencia del gen <i>lcc3-1</i> por Lesage-Meessen <i>et al.</i> | 37 |

ABREVIATURAS

ARN – Ácido Ribonucleico

ARNr – Ácido Ribonucleico Ribosómico

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido Etilendiaminotetraacético

HEMIM – Herbario Micológico de Morelos

HIT – Medio Harina integral de trigo

ITS – Región espaciadora transcrita interna

IBT-UNAM – Instituto de Biotecnología–Universidad Autónoma de México

LiP – Lignina peroxidasa

MnP – Ligninia peroxidasa dependiente de manganeso

mM – Milimolar

PHS – Phenoxazinone Synthase – Fenoxazinona Sintasa

PH – Potencial de Hidrógeno

RAPD – DNA polimórfico amplificado aleatoriamente

RFLP – Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

sp. – Especie

spp. – Especies

µm – Micrómetros

µl – Microlitro

cf. – Lat.: “compara”

°C – Grados

ng – Nanogramos

TM – Melting temperature – Temperatura de fusión

pb – Pares de bases

GCK – Gene Construction Kit

SDS – Dodecilsulfato sódico

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucariotas y heterótrofos constituidos por filamentos microscópicos denominados hifas, estas se ramifican y entrecruzan para dar forma al cuerpo fructífero. La mayoría de los hongos se alimentan de materia orgánica muerta, otros son parásitos y algunos depredadores. Una de las características de los hongos es su capacidad para degradar la materia (diferentes compuestos presentes en la naturaleza), dentro de las cuales se pueden mencionar: la lignina, celulosa y hemicelulosa, que constituyen parte de los tejidos de sostén de árboles y plantas. Estos hongos son conocidos como hongos xilófagos (descomponedores de madera) y existen dos grupos principales: los ascomicetos y los basidiomicetos, siendo más comunes estos últimos. Se clasifican en tres tipos principales de pudrición (Figura 1): a) Pudrición blanda, que atacan principalmente la celulosa y hemicelulosa y forma cavidades microscópicas en la pared celular. En una fase avanzada la madera llega a adquirir un color claro que se puede confundir con la pudrición blanca; b) Pudrición marrón, que al igual que la pudrición blanda ataca la celulosa y hemicelulosa, pero en caso contrario, dejando en la madera un color marrón característico; c) En la pudrición blanca se remueve preferentemente la lignina antes o al mismo tiempo que a los componentes celulósicos (celulosa y hemicelulosa) pero deja un color blanco en la madera (Luley, 2006). Dentro de los hongos de podredumbre blanca se encuentran especies como *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Corioloropsis polyzona*, *Trametes versicolor*, *Ganoderma applanatum* y *Pycnoporus* spp., entre otros.



Figura 1. Tipos principales de pudrición en la madera a) Blanda, b) Marrón, c) Blanca.

Dentro de estos hongos destacamos al género *Pycnoporus*, un grupo de hongos xilófagos basidiomicetos, que cuenta con varias aplicaciones en el área biotecnológica, debido a que son productores de lacasas (enzimas fenol oxidasas conocidas también como oxidorreductasas) que tienen la capacidad de degradar la lignina en la madera (Couturier *et al.*, 2015), así como otros compuestos heterogéneos, gracias a que tienen un complejo enzimático inespecífico con actividad oxidativa contra una amplia variedad de sustancias tóxicas como son colorantes,

pesticidas, derivados del petróleo (Rojas, 2013). Dentro de sus usos más destacables es su participación en la conversión del ácido ferúlico en vainillina (Moro *et al.*, 2013); su utilidad en la industria de papel (Virk *et al.*, 2012); en la biorremediación (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010) y su empleo como bioindicadores o biosensores que se pueden clasificar desde el punto de vista de sus aplicaciones; es decir, en inocuidad de los alimentos, monitoreo ambiental, análisis clínicos y diagnóstico médico o sobre la base de su elemento de reconocimiento químico y biológico utilizado para la detección de enzimas, anticuerpo/antígeno, ácidos nucleicos, fragmentos de ADN, células completas, componentes de la membrana y organelos (Perumal y Hashim, 2014). Algunos ejemplos son su uso como bioindicador de la durabilidad de la madera, presencia de compuestos xenobióticos en aire, agua y tierra (Severo *et al.*, 2016; Rodríguez-Delgado, 2015), de oxígeno en alimentos empacados (Virtanen *et al.*, 2014). Además, las lacasas participan en la producción de metabolitos importantes con propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antivirales, antifúngicas, antiinflamatorias y antimicrobianas (Díaz-Godínez *et al.*, 2016; Stangarlin *et al.*, 2012; Border *et al.*, 2011; Mei-Kuang *et al.*, 2010; Correa *et al.*, 2005; Smânia *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2000). También producen pigmentos (Fazio *et al.*, 2017) que se usan como colorantes, insecticidas, antimicrobianos; tal es el caso del ácido cinabarínico, cinabarina y tramesanguina o su precursor el ácido 3-hidroxiantranfílico (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2012; Dias y Urban, 2009).

2. MARCO TEORICO

2.1. *Pycnoporus* spp.

Pycnoporus es un hongo de pudrición blanca que pertenece al *Phylum* Basidiomycota de un característico color rojo-bermellón (Figura 2), en la naturaleza se ha encontrado en troncos de encino, eucalipto, caucho, palma de aceite e incluso sobre troncos quemados. En cultivo sólido puede crecer en una gran variedad de sustratos como paja de avena, aserrín de pino, aserrín de encino, lirio acuático y granos de trigo (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010; Chanona-Gómez *et al.*, 2007; Vikisneswary *et al.*, 2006; Rifat *et al.*, 2003; Machuca y Ferraz, 2001; Esposito *et al.*, 1993; Guzmán, 1979).



Figura 2. Hongo *Pycnoporus* sp. sobre un tronco.

2.1.1 Clasificación taxonómica

A continuación se presenta la clasificación taxonómica de acuerdo a Index Fungorum (Revisado 2017).

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Orden: Polyporales

Familia: Polyporaceae

Género: *Pycnoporus*

Especies: *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill 1904

Pycnoporus cinnabarinus (Jacq.) P. Karst. 1881

Pycnoporus coccineus (Fr.) Bondartsev & Singer 1941

Pycnoporus puniceus (Fr.) Ryvarden 1972

Pycnoporus annosus (Fr.) Karst (1898)
Pycnoporus epilobii (P. Karst) P. Karst (1889)
Pycnoporus mimicus P. Karst (1906)
Pycnoporus palibini P. Karst (1911)
Pycnoporus serialis (Fr.) P. Karst (1889)

Las especies más estudiadas y reportadas en estudios filogenéticos son (Téllez-Téllez *et al.*, 2016; Lesage-Meessen *et al.*, 2011; Lomascolo *et al.*, 2002): *Pycnoporus sanguineus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus coccineus* y *Pycnoporus puniceus*.

2.1.2 Descripción morfológica

Los hongos del género *Pycnoporus* pueden presentar características morfológicas variables incluso dentro de la misma especie, dependiendo del sustrato en el que crecen, las condiciones ambientales y su edad, por lo que la identificación morfológica del basidiocarpo es difícil y a veces poco fiable.

Morfología macroscópica. La característica principal del basidiocarpo es su color rojo-anaranjado o rojo-bermellón que tiene debido a los pigmentos que produce (ácido cinabarínico, cinabarina, tramesanguína, etc.), su tamaño es variable con la edad siendo más brillante cuando es joven y más opaco cuando adulto (Figura 3). El píleo es sésil, liso, semicircular, de dimidado a flabeliforme, con consistencia corchosa; los bordes pueden ser lisos u ondulados; en el himenóforo se pueden observar los poros, son tubos circulares concolor (del mismo color) y es donde se encuentran las esporas; el contexto es del mismo color que el píleo y es delgado a ligeramente grueso (Téllez-Téllez *et al.*, 2016; Pompa, 2011).

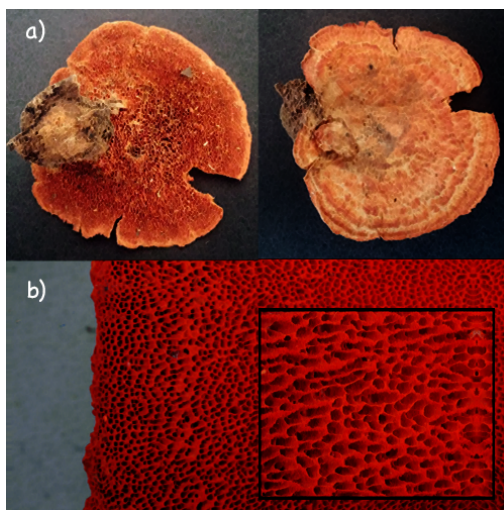


Figura 3. Morfología de *Pycnoporus* sp. a) Cuerpos fructíferos; b) Poros. Fotos sacadas en el laboratorio de Parasitología Vegetal gracias al Doctor Armando Burgos Solorio.

Morfología microscópica. El sistema hifal es dimitríco o trimítico y pueden ser teñido con floxina (Kuhar, 2013, Lomascolo *et al.*, 2011). En cuanto a las esporas, dependiendo de la especie se han reportado diferencias: en el caso de *Pycnopus sanguineus* las esporas son cilíndricas de 5-6 x 2-3 μm , para *P. cinnabarinus* son cilíndricas ligeramente dobladas de 5-6 x 2-3 μm , en cuanto a *P. coccineus* son cilíndricas a ligeramente aplanadas, ligeramente curvadas de 4-5.2 x 2-2.3 μm , mientras que para *P. puniceus* son elipsoidales de 4.5-6 x 2.3 μm ; son lisas, hialinas, no amiloides y de paredes delgadas (Tellez-Tellez *et al.*, 2016).

2.1.3 Distribución geográfica

Originalmente Nobles y Frew (1962) reportaron tres especies: *P. cinnabarinus* y *P. coccineus* presentes en el hemisferio norte y hemisferio sur, respectivamente, mientras que *P. sanguineus* se encontraba en áreas tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. En reportes actuales por Lesage-Meessen *et al.*, (2011) basados en estudios de biogeografía y biología molecular la especie de *P. sanguineus* se presentaba en zonas neotrópicas de Venezuela y La Guayana Francesa, denominada *P. sanguineus sensu stricto*, y paleotrópicas como Vietnam, Nueva Caledonia y Madagascar, llamada *Pycnopus cf. sanguineus*. Entre tanto, *P. coccineus* se reporta en Australia y en las Islas Salomón, o sea en la región Australiana llamado *P. coccineus sensu stricto*, así como en Asia Oriental y regiones tropicales de China y Japón, como *Pycnopus cf. coccineus*. *P. cinnabarinus* se reportó en Europa específicamente en Bélgica, Francia y en Rusia, asimismo, *P. puniceus* en Cuba.

En México (Figura 4) revisando colecciones nacionales se determinó que *P. sanguineus* se encuentra ampliamente distribuido en diferentes estados de México con excepción de Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Zacatecas, Aguascalientes, Tlaxcala y lo que era el Distrito Federal (Díaz, 2013; Pérez-Silva *et al.*, 1988).

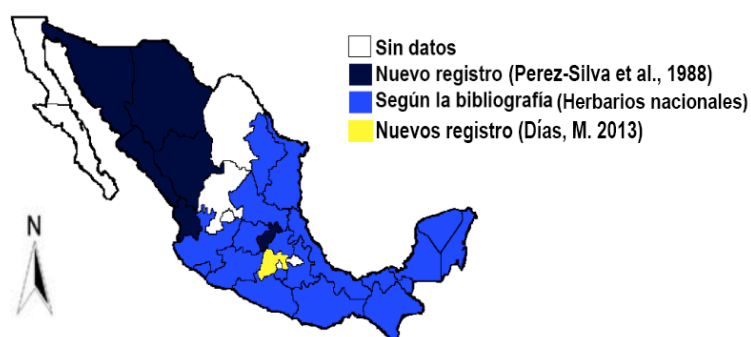
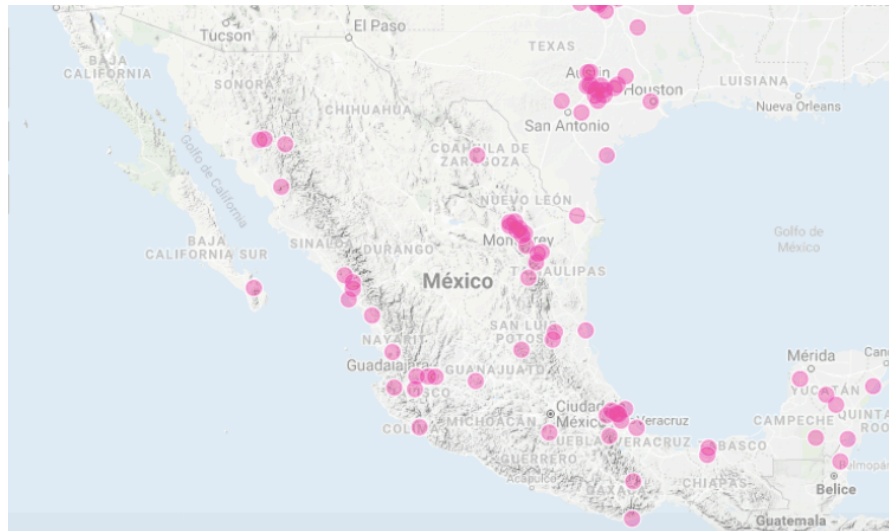
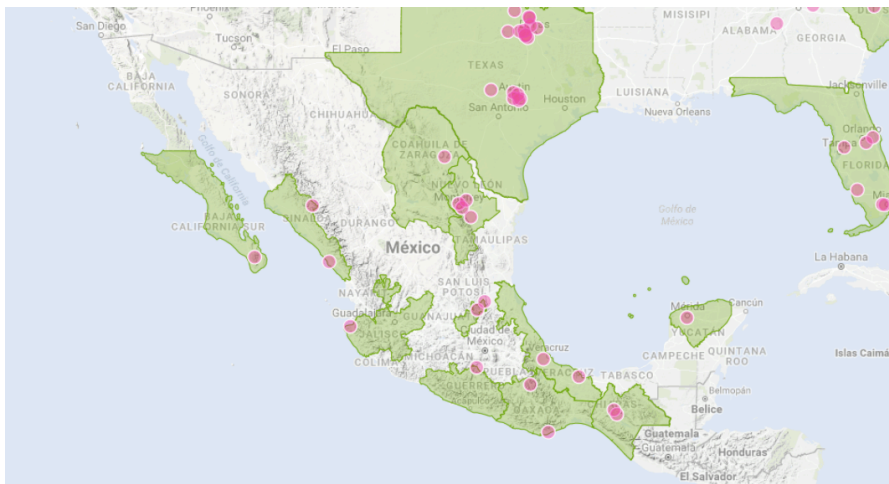


Figura 4. Distribución actualizada de *Pycnopus sanguineus* con base a lo reportado por los herbarios nacionales (Pérez-Silva *et al.*, 1988; Díaz, 2013).

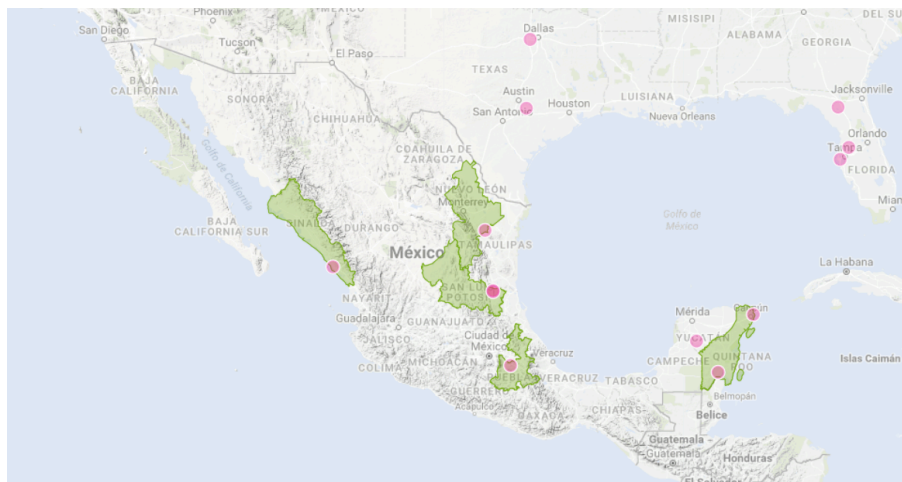
Se han hecho reportes de avistamientos de *P. cinnabarinus* en Baja California Sur y Chiapas, Coahuila, Guerrero, Jalisco, Nuevo León, Oaxaca, Sinaloa, Veracruz y Yucatán con presencia de *P. cinnabarinus* (Figura 5a) y *P. coccineus* en Nuevo León, San Luis Potosí, Quintana Roo, Puebla y Sinaloa (Figura 5b), registrados en el sitio web “Naturalista” (<http://www.naturalista.mx/taxa/83393-Pycnopus-coccineus>), sin embargo no hay ejemplares de estos hongos depositados en las colecciones nacionales, ni estudios moleculares que los identifiquen como la especie que dicen ser.



a)



b)



c)

Figura 5. Mapas con los reportes de los avistamientos a) *P. sanguineus*, b) *P. cinnabarinus*, c) *P. coccineus* en México.

En el estado de Morelos se hicieron muestreos de ejemplares de *Pycnoporus* spp., en los municipios de Tepoztlán, Yautepec, Jojutla, Zacatepec, Cuernavaca, Tlaquiltenango, Temixco, y Tétela del Volcán (Díaz, 2013), se han recolectado alrededor de 32 ejemplares que fueron depositados en el “Herbario Micológico de Morelos” del CIB-UAEM, bajo la clave HEMIM con números que van del 51 al 83.

2.1.4 Metabolitos de *Pycnoporus*

Las especies de *Pycnoporus* producen diversos metabolitos como enzimas y pigmentos, entre los pigmentos más conocidos se encuentran la cinabarina, el ácido cinabarínico, la tramesanguina y la pycnoporina. Estos compuestos tienen una estructura básica de fenoxazina y su formación está mediada por lacasas que oxidan a su precursor el 3-hidroxiantranílico. Estos pigmentos fueron aislados por primera vez por Cavill (1953) y Gripenberg (1963), la cinabarina es uno de los pigmentos más estudiados y en segundo lugar está el ácido cinabarínico. En experimentos “*in-vitro*” se ha obtenido un derivado natural de fenoxazinona, el ácido cinabarínico [2, CA, R = CO₂H] por dimerización oxidativa del ácido 3-hidroxiantranílico [1,3-HAA, R = CO₂H] (Bruyneel *et al.*, 2008). La biosíntesis de 3-HAA es principalmente a través del metabolismo del triptófano en la vía de la quinurenina. Una vía menor para la síntesis de 3-HAA es a través de la hidroxilación de ácido antranílico durante la biosíntesis de triptófano en la vía del ácido shikímico (Li *et al.*, 2001). Recientemente se ha reportado la detección de compuestos con actividad antimicrobiana de los extractos de *Pycnoporus cinnabarinus* mediante el empleo de un ensayo bioreportero acoplado a microfraccionamiento en HPLC para evaluar las propiedades antimicrobianas de dichos hongo (Järvinen *et al.*, 2016), así como también su actividad antimicrobiana hacia bacterias Gram+ y Gram-, actividades antiinflamatorias, antitumorales y capaces de reducir el potencial de los

radicales libres en ensayos *in-vitro* (Järvinen *et al.*, 2016; Cruz Muñoz *et al.*, 2015; Dias y Urban, 2009; Xu *et al.*, 2000).

2.1.5 Enzimas de interés biotecnológico en hongos de pudrición blanca

El sistema de enzimas lignolíticas de los hongos de pudrición blanca incluyen a las fenoloxidasas como: lignina peroxidasa (LiP), ligninia peroxidasa dependiente de manganeso (MnP), fenoxazinona sintasa y las lacasas (Lomascolo *et al.*, 2002), tienen aplicaciones potenciales en un gran número de campos, incluyendo químicos, combustibles, alimentos, agricultura, papel, textiles, cosméticos, entre otros (Telléz-Telléz *et al.*, 2016).

Las lacasas (oxidoreductasas: EC 1.10.3.2) son enzimas que catalizan la oxidación de p-difenoles y la simultánea reducción de dióxígeno a agua. Estas enzimas han sido implicadas en la pigmentación, la formación del cuerpo fructífero, la patogenicidad, así como en la degradación y la biosíntesis de la lignina (Eggert *et al.*, 1998). Göçenoğlu y Pazarlioglu (2014) reportan que las lacasas median la formación de los pigmentos de *Pycnoporus* oxidando a uno de los precursores de estos pigmentos: el ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA), en la vía de la quinurenina (Fazio *et al.*, 2017). Estas enzimas son amigables con el ambiente, oxidan sustratos tóxicos y no tóxicos, y tienen diferentes aplicaciones dentro de las cuales podemos mencionar la biodegradación y decoloración de colorantes en la industria textil. En el cual se descubrió que después de la decoloración, la toxicidad de pocos colorantes permaneció igual mientras que otros, y sus derivados, al ser degradados dejaron de ser tóxicos (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2016; Shraddha *et al.*, 2011); en la biorremediación del suelo por su capacidad para degradar una amplia gama de compuestos xenobióticos en los que se incluyen compuestos clorados fenólicos, plaguicidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Da Silva *et al.*, 2017, Plaza, 2017, Viswanath *et al.*, 2014); en la industria de la pulpa y el papel se emplean productos químicos a base de cloro, para el blanqueamiento, en sus procesos de producción, pero esto da lugar a la formación de compuestos tóxicos, mutagénicos y carcinógenos, por esta razón las lacasas son una opción menos dañina; en el uso de biosensores para la detección de fenoles u otros compuestos en productos como té, vino o incluso aguas residuales; en el caso de la industria de alimentos las lacasas pueden prevenir cambios en la decoloración, la turbidez o el sabor de la cerveza, jugos de frutas y vino mejorando su vida útil, eliminando fenoles como ácido cumárico, flavanos y antocianinas (Viswanath *et al.*, 2014; Shraddha *et al.*, 2011). Ahora se sabe que el género de *Pycnoporus* produce las lacasas como enzima lignolítica predominante (Egger *et al.*, 1996) y el uso de estas en bioprospección y en la industria biotecnológica requiere de grandes cantidades de enzima; por lo que es importante el aislamiento y caracterización de nuevas especies de

Pycnoporus productoras de isoformas de lacasas que sean más estables (Da Silva *et al.*, 2017; Lomascolo *et al.*, 2002).

Los genes de lacasa reportados a la fecha en *Pycnoporus* sp. son *lac3-1*, así como una forma alélica *lac1*, y *lac3-2*. Las lacasas o sus isoformas en los cultivos de *Pycnoporus* se expresan de manera dependientes de las condiciones, el medio y el sistema empleado (Guadarrama, 2017; Cuevas, 2017; Egger *et al.*, 1998). Dos nuevas isoformas de lacasas termoestables de *Pycnoporus sanguineus* fueron reportadas por Dantán-González *et al.*, 2008, estas presentan diferentes masas moleculares así como parámetros cinéticos distintos. En nuestro grupo se investigó la presencia de lacasas y pigmentos en 36 cepas de la colección HEMIM de *Pycnoporus* del CIB-UAEM y todas dieron como resultado que producen lacasas y pigmentos (Romo, 2016). En cultivo en líquido las cepas de *Pycnoporus* HEMIM-51, 53, 74 y 79 producen varias isoformas, destacando la cepa de *Pycnoporus* HEMIM-53 con hasta cinco isoformas en un medio optimizado (Cuevas, 2017; Guadarrama, 2017).

Hay reportes que en *Pycnoporus coccineus* se ha encontrado la presencia de fenoxazinona sintasa, siendo la única especie del género hasta ahora con esta enzima, junto con otros organismos como son: *Bauhinia monandra*, *Tecoma stans* y *Streptomyces* spp. (Le Roes-Hill *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 1965). La fenoxazinona sintasa (PHS, 2-aminophenol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.4) es una enzima miembro de las multi-cobre oxidasas, y al igual que las lacasas, tirosinasas, peroxidadas, el citocromo C oxidasa y ceruplasmina, catalizan la oxidación del 3-hidroxiantranílico (3-HAA) a ácido cinabarínico (Le Roes-Hill *et al.*, 2009). La PHS ha sido aislada de *Streptomyces antibioticus* y comparte varias características bioquímicas y estructurales con las lacasas (Eggert *et al.*, 1997; Freeman *et al.*, 1993). Esta enzima se conoce desde hace décadas y fue identificada por primera vez en la producción de antibióticos ya que utilizan a las lactonas pentapéptidas ácidas y al 4-metil-3-HAA como precursores en la síntesis de actinomicinas (Barry *et al.* 1989; Keller 1984). En *Pycnoporus coccineus* se demostró que es activa en presencia de Mn²⁺ y riboflavina 50-monofosfato (Le Roes-Hill *et al.*, 2009), y la importancia de seguir estudiando a esta enzima y su papel en *Pycnoporus coccineus* es principalmente por su capacidad para generar nuevos antibióticos o derivados de actinomicina-D.

Hay otras enzimas del tipo hidrolasas presentes en estos hongos, entre estas están: invertasas, tirosinasas, α -amilasas, β -glucosidasas, xilanasas, exo-poligalacturonasas y celobiosa deshidrogenasa (Da Silva, *et al.*, 2017; Jalil *et al.*, 2017; Quiroga *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2007; Magalhaes, *et al.*, 2006; Esposito *et al.*, 1993; Nair *et al.*, 1965). Además las cepas de

Pycnoporus HEMIM-51, 53 79, 74 y 79 producen hidrolasas como: xilanasas, celulasas y amilasas, en menor cantidad respecto a cepas de *Pleurotus ostreatus* (Amezcuca, 2017; López, 2017; Guadarrama, 2017; Díaz *et al.*, 2016).

2.2. Métodos de identificación de hongos

2.2.1 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son segmentos de ADN, que se utilizan para localizar y aislar genes de interés, y en combinación con métodos de reconstrucción filogenética, han sido utilizados desde hace décadas para la reconstrucción de las relaciones evolutivas entre especies. Se pueden clasificar en citogenéticos, bioquímicos y los basados en ADN. Estos últimos a su vez se agrupan según el método de identificación (Ríos *et al.*, 2009): a) Los de clonación y secuenciación y b) Los de impresión única o huella digital genética (fingerprinting). Ríos *et al.* (2009) explicó que se espera que un marcador molecular sea capaz de discriminar diversos alelos (diferentes versiones de un mismo gen) de un mismo *locus*, y sea útil para detectar polimorfismos en el mayor número posible de *locus* al mismo tiempo en una única reacción.

Se han usado como marcadores moleculares la región espaciadora transcrita interna o ITS del ADN ribosómico nuclear y las secuencias de genes que codifican a la ARN polimerasa, β -tubulina, celobiohidrolasa-C, topoisomerasa II y manganeso peroxidasa (Hilden *et al.*, 2008; Tomšovský *et al.*, 2006; Froslev *et al.*, 2005; Hatsch *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Además de otras técnicas como el RFLP o polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción y RAPD, DNA polimórfico amplificado aleatoriamente.

En hongos se han usado diferentes marcadores moleculares para evaluar la biodiversidad de especies tal como:

Las **Regiones ITS** o Espacio transcrito interno (Figura 6), son regiones hipervariables del rDNA. Se han escogido ya que tienen muchas ventajas, dentro de las que se pueden mencionar (Débaud *et al.*, 1999; Ven Tuinen *et al.*, 1999; Gardes y Bruns, 1993):

- Tienen una organización conservada en el genoma de todos los eucariontes y su presencia está en unidades repetidas una junto a la otra.
- Tienen un gran número de copias que facilita la amplificación.
- Contiene regiones muy conservadas: 18S, 5.8S y 26S.
- Las secuencias conservadas están separadas por secuencias variables, polimórficas en longitud y en secuencias. Son muy informativas y representan una huella genómica para cada hongo.

Especialmente se ha visto que existe variabilidad en las 2 regiones ITS de los genes ribosomales que separan la subunidad ribosomal pequeña 5.8 de la subunidad ribosomal grande 26S, y que ha sido determinante para distinguir un hongo de otro. En los hongos esta región es de un tamaño de 650 a 900 pb. En la figura 6, se observan las dos subunidades grandes 18 y 26S, la subunidad pequeña 5.8S y ambas regiones ITS1 e ITS2 de 269 y 218 pb, aproximadamente.

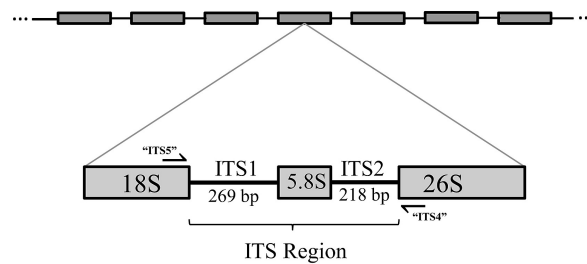


Figura 6. Representación gráfica de las dos regiones de ITS.

Gen β -tubulina, este es un gen que codifica para una de las dos familias de proteínas conservadas de células eucariotas, estas proteínas son esenciales en los microtúbulos que a su vez participan en procesos como la mitosis. Y hasta la fecha han sido usados para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas que hay entre hongos basidiomicetos (Thon y Royse, 1999). Además, este gen se encuentra más conservado y la alineación de sus secuencias en menos ambigua a comparación de ADN ribosomal (Bruns *et al.*, 1991).

Ríos *et al.*, (2011) explican que los fragmentos N-terminales de las tubulinas alfa y beta son altamente conservados con variaciones mínimas y que la alta tasa de conservación implica que las propiedades fundamentales de estas proteínas imponen unas limitaciones enormes a cualquier diversificación de la secuencia.

Gen *lcc3-1*, también llamado *lac1* es uno de al menos 5 genes identificados que codifican para lacasas en *Pycnoporus* y del cual se tiene disponible su secuencia completa. Estos genes tienen un tamaño aproximado de 2.1 a 2.3 kb y de 10 a 12 intrones.

Fenoxazinona sintasa, es una enzima involucrada en la síntesis de antibióticos derivados de la actinomicina D, es una (EC 1.10.3.4, PHS, 2-aminofenol: oxígeno oxidoreductasa), *Pycnoporus coccineus* es la única especie en la que se ha reportado la presencia de la fenoxazinona sintasa (Nair *et al.*, 1965; Le Roes-Hill *et al.*, 2009; Telléz-Telléz *et al.*, 2016), por ello se ha pensado que sería una buena forma de discriminar esta especie de las demás. Originalmente esta enzima fue aislada de *Streptomyces antibioticus*, donde participaba

activamente en la formación de la actinomicina-D. Sin embargo, en *Pycnoporus*, no ha sido usada como un marcador molecular.

3. ANTECEDENTES

3.1 Identificación morfológica de las especies del género *Pycnoporus*

Pycnoporus sp. es un hongo que se encuentra estrechamente relacionado con *Trametes* sp., siendo morfológicamente similar. Pero contrario a este, las especies de *Pycnoporus* tienen un intenso color rojo-anaranjado (Ryvarden, 1991; Ryvarden y Gilbertson, 1994). Habitualmente la identificación de las especies se hacía con base a sus características morfológicas macroscópicas y microscópicas, así como por las áreas en las que estaban distribuidas (Nobles y Frew, 1962), sin embargo, la identificación entre especies de este género sigue siendo difícil por las características que son en gran medida similares. Especialmente las especies que crecen en las áreas tropicales, como también, cuando son cultivadas en sustratos similares (Lesage-Meessen *et al.*, 2011).

Díaz en el 2013 se propuso determinar la distribución de *Pycnoporus* spp. en México mediante la revisión de los especímenes que mantienen algunos herbarios nacionales, así como hacer una recolección de especímenes del estado de Morelos y hacer una descripción morfológica de las mismas. También propuso la identificación de cepas de *Pycnoporus* spp. provenientes del estado de Morelos mediante la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 por PCR y purificación por medio de electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo, no se pudo encontrar coincidencias para su identificación. Así mismo, se realizó la identificación morfológica de 26 cepas empleando características tanto macroscópica como microscópica, observando las hifas y el tipo de esporas, encontrándose con tres tipos de esporas con tamaños variables de 8-18 x 5-12 μm (Tabla 1).

Tabla 1. Características de las esporas del estudio realizado por Díaz en el 2013

| No. de cepas | Forma | No. de cepas | Color en KOH |
|--------------|--------------------|--------------|------------------|
| 3 | Cilíndrica | 10 | Hialinas |
| 10 | Oblonga | 4 | Oscuras |
| 7 | Cilíndrica-Oblonga | 6 | Hialinas-Oscuras |

3.2 Uso de Marcadores moleculares para la identificación de *Pycnoporus* sp.

Lomascolo *et al.* (2002) realizaron la identificación de cepas procedentes de zonas tropicales de China comparándolas con cepas presentes en colecciones internacionales, basándose en el

análisis de las secuencias ITS, obteniendo un agrupamiento de las cepas según sus orígenes geográficos. El análisis filogenético arrojó dos grupos; las cepas que procedían de zonas frías y templadas, y las cepas provenientes de áreas tropicales y subtropicales donde se agruparon las cepas chinas de *Pycnoporus*.

En México muy pocas cepas del género *Pycnoporus* han sido identificadas mediante técnicas moleculares. No obstante existen dos trabajos donde tres cepas distintas fueron identificadas como *Pycnoporus sanguineus* mediante la técnica de PCR y amplificando la región ITS del ADN ribosomal con oligonucleótidos específicos.

En el primer reporte se aisló una cepa de *Pycnoporus* sp., de un sitio contaminado con petróleo en una área tropical del estado de Veracruz, esta cepa mostró un 99% de identidad con la secuencia con número de acceso en el GeneBank AY705970, que corresponde a una cepa caracterizada de *P. sanguineus* y se le denominó *P. sanguineus* CeIBMD001 (GenBank No. acceso: EU000253) (Dantán-González *et al*, 2008). En el otro reporte dos cepas de *Pycnoporus* fueron identificadas de la misma manera, la primera HI fue aislada de árboles de casuarina (*Casuarina equisetifolia* L.) en Ejido de la Finca, VillaVilla Guerrero, Estado de México y la segunda obtenida de árboles de mango (*Mangifera indica* L.) de Parácuaro, Michoacán. Estas tres cepas fueron clasificadas como *Pycnoporus sanguineus* mediante el uso de las secuencias ITS. Los resultados de ambas cepas de *Pycnoporus* H1 y H2 fueron comparados con el aislamiento 7IV2/2 de *P. sanguineus* con número de acceso GQ982886. El aislamiento H1 mostró 98% de identidad con un índice de similaridad de 787, el aislamiento H2 presentó 97% de identidad y un índice de similaridad de 822 con el control.

Lesage-Meessen *et al.*, (2011) realizaron la identificación de 36 cepas de *Pycnoporus* (Figura 10) procedentes de diferentes áreas geográficas y construyeron árboles filogenéticos con base a sus secuencias ITS (Figura 7), regiones parciales del gen de β -tubulina (Figura 8) y el gen *lcc3-1* (Figura 9) que codifica para lacasas. El árbol filogenético que mostró una mejor organización de las especies fue el de las secuencias de los fragmentos del gen *lcc3-1*, ya que obtuvieron un grupo de cepas de *P. cinnabarinus* claramente diferenciado de *P. puniceus*, mientras que las cepas de *P. coccineus* y *P. sanguineus* formaron cuatro clados y subclados; *P. sanguineus* está agrupado en dos subclados: el neotropical con cepas pertenecientes a la Guinea Francesa y Venezuela, y el paleotropical con cepas de Vietnam, Nueva Caledonia y Madagascar. *P. coccineus* formó dos clados independientes con cepas provenientes Oceanía y Asia Oriental. Con esto se pudo destacar la diversidad funcional de la enzima, asociada con el origen biogeográfico; especialmente a *P. sanguineus* y *P. coccineus* que presentan una gran

similitud morfológica pero que están en distintas áreas geográficas, esto indicó que la biogeografía juega un rol en la evolución del género.

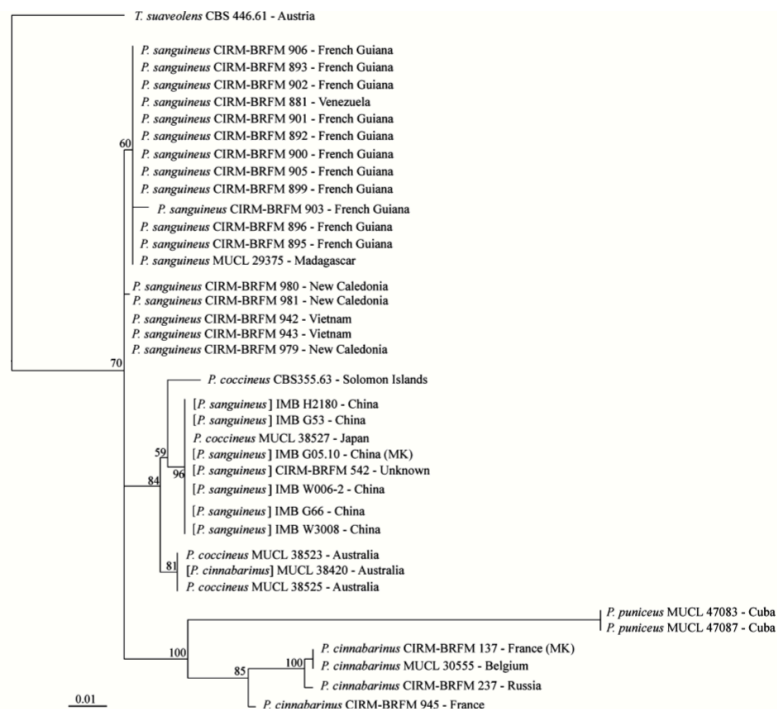


Figura 7. Arbol filogenético de Maximum likelihood basado en las secuencias de la región ITS de las 36 cepas de *Pycnoporus*, Lesage-Meessen *et al.*, 2011.

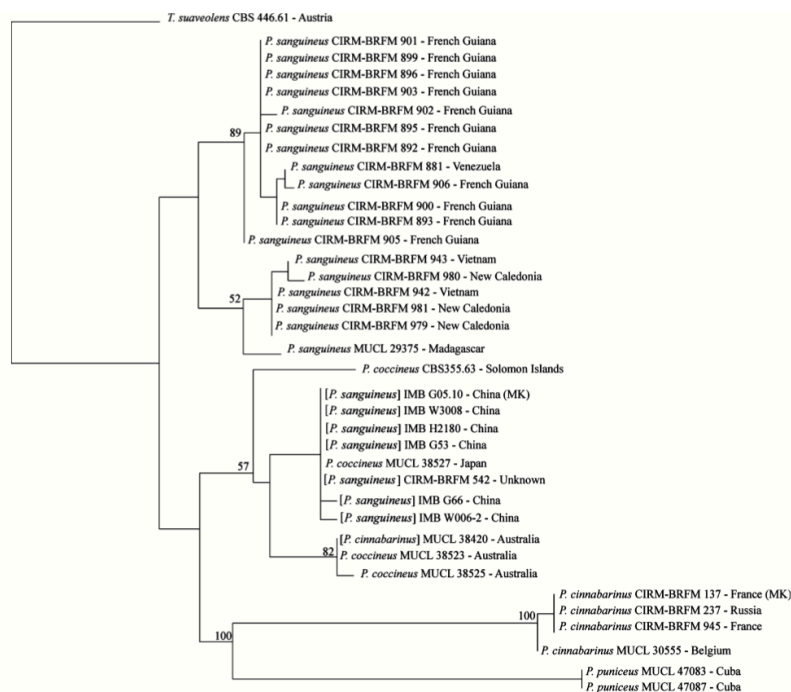


Figura 8. Arbol filogenético de Maximum likelihood basado en secuencias parciales del gen de la β -tubulina de las 36 cepas de *Pycnoporus*, Lesage-Meessen *et al.*, 2011.

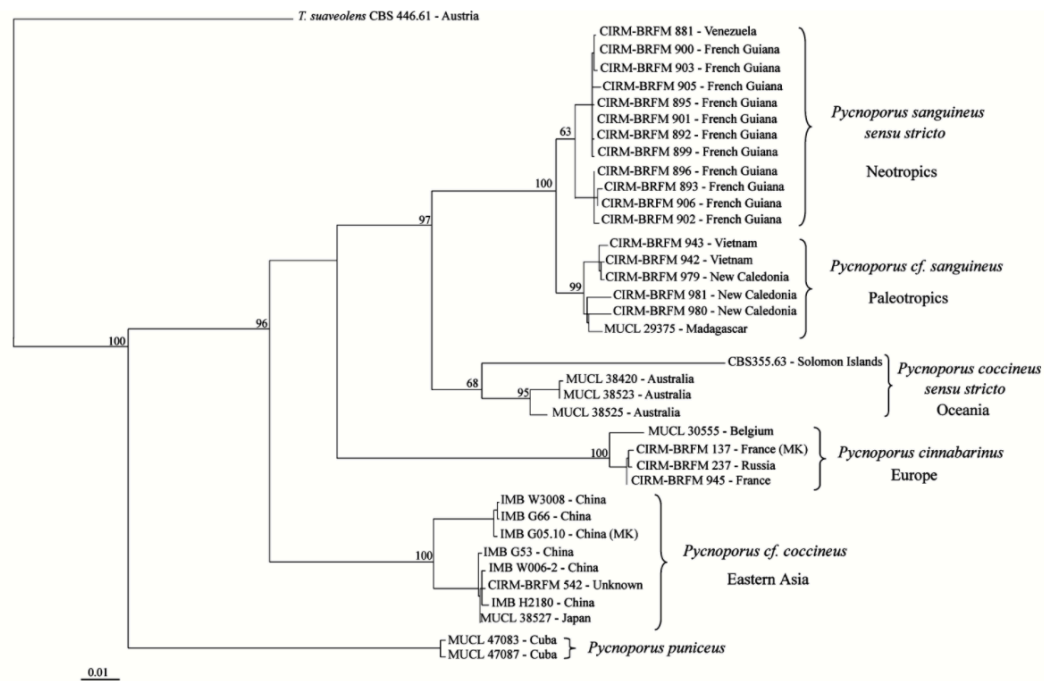


Figura 9. Árbol filogenético de Maximum likelihood basado en secuencias parciales del gen de la lacasa (F2-R8) de las 36 cepas de *Pycnoporus*, Lesage-Meessen *et al.*, 2011.

| Original identification | Collection number* | Final identification | Geographic origin/host | NCBI accession numbers | | |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------|--|------------------------|-----------|-----------|
| | | | | ITS1-5.8S-ITS2 | β-Tubulin | Lac F2-R8 |
| <i>P. cinnabarinus</i> | MUCL 30555 ¹ | <i>P. cinnabarinus</i> | Bois de Lauzelle, Louvain-la-Neuve, Belgium/rotten wood | AF363764 ¹ | FJ410367 | EU683258 |
| <i>P. cinnabarinus</i> | CIRM-BRFM 137 ⁸ | <i>P. cinnabarinus</i> | Monokaryon from fruit-body of wild strain I-937 | AF363757 ² | FJ410369 | AF170093 |
| <i>P. cinnabarinus</i> | CIRM-BRFM 237 | <i>P. cinnabarinus</i> | Russia/deadwood | FJ234205 | FJ410370 | EU684159 |
| <i>P. cinnabarinus</i> | CIRM-BRFM 945 | <i>P. cinnabarinus</i> | Castelnau-Durban, France/deadwood | FJ234206 | FJ410371 | EU714500 |
| <i>P. cinnabarinus</i> | MUCL 38420 | <i>P. coccineus</i> | Alice Springs, Australia/deadwood | AF363768 ² | FJ410368 | EU684160 |
| <i>P. puniceus</i> | MUCL 47083 | <i>P. puniceus</i> | Pinal del Rio, Cuba/dead fallen trunk, <i>Quercus cubana</i> | FJ234198 | FJ410376 | FJ425895 |
| <i>P. puniceus</i> | MUCL 47087 | <i>P. puniceus</i> | Pinal del Rio, Cuba/dead fallen trunk, <i>Quercus cubana</i> | FJ234199 | FJ410377 | FJ425896 |
| <i>P. sanguineus</i> | MUCL 29375 | <i>P. cf. sanguineus</i> | Tamatave Madagascar, Indian Ocean/deadwood | AF363769 ² | FJ410366 | EU684158 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 942 | <i>P. cf. sanguineus</i> | Danang beach, Vietnam/deadwood | FJ234201 | FJ410354 | FJ232700 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 943 | <i>P. cf. sanguineus</i> | Mekong delta, Vietnam/wood log | FJ234202 | FJ410355 | FJ232701 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 979 | <i>P. cf. sanguineus</i> | Owentoro, New Caledonia/ <i>Acacia spirobis</i> | FJ234184 | FJ410363 | EU714502 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 980 | <i>P. cf. sanguineus</i> | French New Caledonia/ <i>Nothofagus codonandra</i> | FJ234203 | FJ410364 | EU684161 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 981 | <i>P. cf. sanguineus</i> | French New Caledonia/deadwood | FJ234204 | FJ410365 | EU714503 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 892 | <i>P. sanguineus</i> | Kow Marsh, French Guiana/trunk of dead palm tree | FJ234185 | FJ410341 | EU678766 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 893 | <i>P. sanguineus</i> | Kowou, French Guiana/edge of sea | FJ234186 | FJ410342 | EU678767 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 895 | <i>P. sanguineus</i> | Paracou, French Guiana/rotten wood | FJ234187 | FJ410343 | EU678768 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 896 | <i>P. sanguineus</i> | Paracou, French Guiana/burnt wood | FJ234188 | FJ410344 | EU678769 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 899 | <i>P. sanguineus</i> | Laussat, French Guiana/rotten wood | FJ234190 | FJ410346 | EU678770 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 900 | <i>P. sanguineus</i> | Laussat, French Guiana/rotten wood | FJ234191 | FJ410347 | EU678771 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 901 | <i>P. sanguineus</i> | Sainte Elie, French Guiana/rotten wood | FJ234192 | FJ410348 | EU678772 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 902 ¹ | <i>P. sanguineus</i> | Macouria, French Guiana/burnt wood | FJ234193 | FJ410349 | EU678773 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 903 | <i>P. sanguineus</i> | Royale Island, French Guiana/rotten wood | FJ234194 | FJ410350 | EU678774 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 905 | <i>P. sanguineus</i> | Royale Island, French Guiana/rotten wood | FJ234195 | FJ410351 | EU678775 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 906 | <i>P. sanguineus</i> | Royale Island, French Guiana/rotten wood | FJ234196 | FJ410352 | EU678776 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 881 | <i>P. sanguineus</i> | Venezuela/rotten wood | FJ234197 | FJ410362 | EU684155 |
| <i>P. sanguineus</i> | CIRM-BRFM 542 | <i>P. cf. coccineus</i> | Unknown | FJ234200 | FJ410353 | EU678786 |
| <i>P. sanguineus</i> | IMB W3008 | <i>P. cf. coccineus</i> | Guangxi, Mt Daming, China/rotten wood of broad-leaves tree | AF363753 ² | FJ410356 | EU714499 |
| <i>P. sanguineus</i> | IMB G53 | <i>P. cf. coccineus</i> | Hainan, Bawangling, China/rotten wood of <i>Pinus</i> sp. | AF363763 ² | FJ410357 | EU683255 |
| <i>P. sanguineus</i> | IMB H2180 | <i>P. cf. coccineus</i> | Hainan, Qiongzong, China/rotten hardwood | AF363770 ² | FJ410358 | EU683256 |
| <i>P. sanguineus</i> | IMB G66 | <i>P. cf. coccineus</i> | Hainan, Tunchang, China/rotten hardwood | AF363762 ¹ | FJ410359 | EU683257 |
| <i>P. sanguineus</i> | IMB W006-2 | <i>P. cf. coccineus</i> | Guangxi, Mt Daming, China/rotten wood of broad-leaves tree | AF363754 ² | FJ410360 | EU678784 |
| <i>P. sanguineus</i> | IMB G05.10 ¹ | <i>P. cf. coccineus</i> | Monokaryon from fruit-body of wild strain IMB G05 | FJ750267 | FJ410361 | EU678783 |
| <i>P. coccineus</i> | MUCL 38527 | <i>P. cf. coccineus</i> | Shizuoka, Izu, Japan/decaying wood <i>Castanea crenata</i> | FJ750266 | FJ410372 | EU683253 |

Figura 10. Tabla con los organismos utilizados en la identificación de Lesage-Meessen *et al.*, 2011.

4. JUSTIFICACIÓN

La caracterización morfológica es una de las herramientas más utilizadas para la identificación y clasificación de especies fúngicas. Sin embargo, las especies del género *Pycnoporus* son difíciles de identificar a través de su morfología debido a que son muy parecidas. Los marcadores moleculares ITS y β -tubulina se han utilizado para la construcción de las relaciones biogeográficas y evolutivas, así como, la identificación interespecífica de especies del género *Pycnoporus*. Sin embargo, en la creación de árboles filogenéticos usando estas secuencias no se logra una buena agrupación. Otra estrategia emplea la secuencia del gen *lcc3-1* para la determinación de la diversidad geográfica y filogenia de las especies de *Pycnoporus*. En México existen pocos trabajos de identificación molecular de las especies de *P. sanguineus*, *P. cinnabarinus* y *P. coccineus*, empleando marcadores ITS y β -tubulina. Por lo tanto, en este trabajo se propone identificar las cepas de *Pycnoporus* de la colección HEMIM y confirmar la identidad de *P. coccineus* en la colección usando oligonucleótidos degenerados para identificar el gen *lcc3-1* y el gen de la fenoxazinona sintasa presente solo en esta especie.

5. HIPÓTESIS

Se podrán diferenciar las especies de *Pycnoporus* spp. con el uso de las regiones ITS y los genes para β -tubulina, lacasas y fenoxazinona sintasa como marcadores moleculares. Y se determinará la presencia de la especie *P. coccineus* en la colección HEMIM.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- Identificar cepas de *Pycnoporus* mediante métodos moleculares a partir de las regiones ITS y los genes para β -tubulina, lacasas y fenoxazinona sintasa.

6.2 Objetivos específicos

- Obtener los productos de PCR de las regiones ITS y de las secuencias parciales de β -tubulina, del gen de las lacasas y fenoxazinona sintasa.
- Conocer las secuencias de los productos de PCR de las regiones ITS y los genes para β -tubulina, lacasas y de la fenoxazinona sintasa.
- Construir los árboles filogenéticos con base a las secuencias obtenidas de las cepas de *Pycnoporus* spp. para definir a que especie pertenecen.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Organismos

Las cepas de *Pycnoporus* spp. son de la colección HEMIM del CIB-UAEM, fueron donadas por la M. en C. Ma de Lourdes Acosta Urdapilleta y fueron recolectadas en el estado de Morelos.

7.2 Medio de cultivo

Para el cultivo y mantenimiento de las cepas se utilizó un medio a base de harina de trigo, agar y azúcar (HIT).

7.3 Reactivos

Para la extracción de DNA se utilizaron los siguiente reactivos: Buffer de extracción [mM Tris-HCl pH 8.5 (J.T.Baker; 4103-02), 250 mM NaCl (Fermont; PQ24902), 25 mM EDTA (Merck; 1084541000), 0.5% SDS-dodecilsulfato sódico (SIGMA; L3771)], fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (SIGMA; P3803), RNAsa A (Thermo Fisher; EN0531), alcohol isopropílico (J.T.Baker; 9037-03), etanol (J.T.Baker; 15578454); los reactivos para PCR: dNTPs (Thermo Fisher; R0181), Polimerasa taq, PCR Buffer X10 y MgCl₂ 50 mM (Thermo Fisher; F530S).

7.4 Siembra de las cepas

Nueve cepas fueron sembradas en medio agar HIT en cajas de 20 mm (HEMIM-51, HEMIM-53, HEMIM-59, HEMIM-61, HEMIM-63, HEMIM-67, HEMIM-70, HEMIM-72 y HEMIM-74), incubadas a 28°C por 7 días a partir de un inóculo de 1 x 1 cm, los cultivos se estuvieron observando durante su crecimiento para asegurar la pureza de los mismos.

7.5 Extracción del DNA

El método para la extracción de DNA se modificó con base a lo reportado por Lomascolo *et al.*, (2002), que a su vez es un método adaptado de Raeder y Broda (1985). Las cajas recién sembradas se incubaron a 28°C por 7 días. Posteriormente, se realizó un raspado de caja con una espátula esterilizada retirando el micelio cuidando de no llevarse medio de cultivo para evitar la contaminación y obtener DNA sin contaminaciones. Se pesaron de 200 a 300 mg de micelio que se maceró en un mortero con 1000 µl de buffer de extracción. Se colectó todo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se agitó en un Vortex por 1 minuto. Tras 15 min de incubación a temperatura ambiente, se añadieron un 500 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) mezclando suavemente y se centrifugó a 13 000 rpm por 1 h a 4°C. La fase acuosa se pasó a un tubo con 3 µl de RNAsa A (10 mg/ml) y se incubó por 30 min a 37°C,

posteriormente se agregaron 500 µl de cloroformo, para centrifugar por 10 min, a 13 000 rpm. Se separó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo, posteriormente el DNA se precipitó añadiendo 500 µl de alcohol isopropil frío y acetato de sodio 3 M en una proporción 1:10. Se incubó en hielo por 1 hora. Para recuperar el pellet se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min y posteriormente se realizaron dos lavados con etanol al 100%. Finalmente se dejó evaporar el etanol y el pellet se resuspendió en 50 µl de agua grado molecular.

7.6 Amplificación por PCR

7.6.1 Diseño de los oligonucleótidos

Para la amplificación de los fragmentos de la región ITS y los genes que codifican para β -tubulina y lacasas se utilizaron los oligos reportados por White *et al.* (1990) y Lesage-Meessen *et al.* (2011).

Además, para el gen que codifica para lacasas se diseñaron oligos internos con el interés de poder secuenciar la región completa del gen *lcc3-1* de 1640 pb , se diseñaron oligos para amplificar fragmentos más pequeños del gen que se sobrelapen (Figura 11), se enviaron a sintetizar los oligonucleótidos con base a las regiones conservadas de las secuencias de *Pycnoporus* con los números de acceso: EU683258, AF170093, EU684159, EU714500, EU684160, FJ425895, FJ425896, EU684158, FJ232700, FJ23270, EU714502, EU684161, EU714503, EU678766, EU678779, EU678767, EU678768 EU678770, EU67877, EU678772, EU678773, EU678774, EU678782, EU678776, EU68415, EU678786, EU71449, EU683255, EU683256, EU683257, EU678784, EU678783, EU683253, EU678785, EU683254, EU714501. Los oligos internos diseñados nos permitirían amplificar regiones de 566, 611 y 507 pb, aproximadamente (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos degenerados diseñados para el gen *lcc3-1*

| Secuencia | TM | Tamaño de fragmento |
|--|----|---------------------|
| F2 - 5'-CA(C/T)TGGCA(C/T)GG(A/G)TTCTTCC-3' | 56 | 566 |
| RL3- 5'-GTCAC(A/G/C)CAGGG(C/A)AAGCGGT-3' | 61 | |
| FL3- 5'-GTCAC(A/G/C)CAGGG(C/A)AAGCGGT-3' | 61 | 611 |
| RL4- 5'- (G/C)AA C(T/C/A)T GGT (C/T)TT CAA CTT (C/T)GT (G/A) -3' | 61 | |
| FL4- 5'- (G/C)AA C(T/C/A)T GGT (C/T)TT CAA CTT (C/T)GT (G/A) -3' | 61 | 507 |
| R8- 5'-GAG(A/G)TGGAAGTC(A/G)ATGTG(G/A)C-3' | 56 | |

Con los oligonucleótidos F2 y RL3 se pueden amplificar un fragmento de 566 pb, con los oligos FL3 y RL4 se amplificaría un fragmento de 611 pb, y con los oligos FL4 y R8 se podría amplificar un fragmento de 507 pb.

>EU683258.1 *Pycnoporus* |accase gene, partial cds ¶
CATTGGCATGGGTCTTCCAGAAAGGCACGAACTGGGCCGATGGTCCCGGTTCTGTGAACAGTGTCCCATCGCTTCGGCCACTCGTTCCTGTATGACTTTCAAG
 TTCCCGACCAAGCAGGTACGAATCCGTACACGTTTCATTGGCTCGCAACTAAACCTCCTTACTAGGGACTTCTGGTACCATAGCCATCTCCACGCAATAC
 TGGATGGTTGAGGGGGCCTTTCGTCTACGACCCCAACGATCCTCAGCTAGCCTGTATGACATTGATAACGGTGAGCAGATCATGGTATCGCAATATTGC
 GTCCACTTATGCTTCCGGCATCCAGACGACACTGTATGACGCTGGCTGATTGGTATCACGTTGCTGCCAAGCTCGGACCTCGCTTCCCGTACGTGTCAAATGTC
 TACAAGATCTACATATACGATTTGACTCACTTCGCTGATTACAGATTTGGGTCCGACTCAACCCTTATCAATGGGCTTGGTGAACCACTGGCATAGCACCGTC
 TGAATGGCAGTTATCAAG**GTACCGCAGGAAAGCGGT**CAGTATGGATGGTATCACTCCAACACTGGCTCTGATACATGGCCTTGTTCACAGCTACCGCTTC
 CGCTTGGTGTGCTTCTTGGGATCCGAACCATACATTACGATTGATAATCACAGTACTATAATTGAGGCGGACTCAATCAACACTCAACCCCTAGAGGTT
 GATTCATCCAGATTTTGGCCGCGAGCGCTACTCCTCGTGGTAGGTGCTAGGCTCCTGTATCAAGTTTGAGACATCTTAAATACACCTTTTCAATGCAGC
 TGGATGTAGCCAGCCGGTGGATAACTACTGGATCCGCGCAACCCCTGCCTTCGGAAACACAGGTTTGTCTGGTGAATCAATCCGCCATCCTGCGTATGATG
 GCGACCCGAGATCGAGCTACGTCTGTCCAGACTACTCCTACGAAGCCTCTGAACGAGGTCGACTTGCATCCTCTCGCCTATGCTGTGGTACGTGTCTCAA
 GAACCTCGATTACTAAGTGCATGTCAACTACATGGTGCATGACAGCCTGGCAGCCCGAGCCGGGAGGTGTCGACAAGCCTCT**GAACTTGGTCTTCAACTTC**GT
 GAGTACTGGCCGCTTCCGTAGCGCAGTTTCGAACAAAGCCTGATACCCATGCAGAACGGAACCAACTTTTCATCAACGACCACACCTTCGTCCACCGTCTGTC
 CCAGTCTTGCTACAAATCTCAGTGGGGCGCAGGCGCTCAGGACTGGTCCCGGAGGTTAGTGTGTTGTTTCCAGAACTCGTCCATGGAGATATCCTTCC
 CTGCCACTGCCAATGCCCTGGATTCCCCATCCTTTCCACTTGCAGGGTGTAGCTGTGCTTCTCGTCTAAAGGCGGAATTGATATCTGACTCCCATCACAG
 CACGCTTCGCTGTGCTGCGGAGCGCGGAAGCAGCGTCTACAACACTACGACAACCCGATCTTCGCGAGCGTGTGAGCAGCCGCCAGCCCGCGACAACGTACGA
 TCCGCTTCGAGACCAATAACCCCGCCGTTCTCCTCACT**GCCACATCGACTTCCACCTC** ¶

Figura 11. Secuencia de *Pycnoporus* ejemplificando donde pegarían los oligos diseñados para amplificar el fragmento del gen *lcc3-1* en 3 fragmentos más pequeños de 566 pb, 611 pb y 507. En amarillo los oligos pre-diseñados por Lesage-Meessen *et al.* (2011), en verde los oligos RL3 (Reverse) y FL3 (Forward), y en azul los oligos RL4 (Reverse) y FL4 (Forward).

Para la amplificación del fragmento del gen de la fenoxazinona sintasa se diseñaron los oligos como se detalla a continuación: A partir de las secuencias de aminoácidos reportadas en *Streptomyces* spp. con número de acceso: AAA86668.1, ADX97492.1, ALV32683.1, AGF66571.1, AKJ09968.1, AJP05890.1 obtenidas del NCBI [http://www.ncbi.nlm.nih.gov] y apoyándonos en el programa Gen Construction Kit (GCK) para su traducción a nucleótidos se diseñaron los oligos para un fragmento de 830 pb.

Las características que se tomaron en cuenta para el diseño de oligos, fueron:

- Longitud de 18 a 25 bases
- Base en el extremo 3': G o una C
- La temperatura de fusión (TM) será de 50-65°C.
- El contenido de C/G deberá ser de 40 y 60 %, respectivamente.

7.6.2 Estandarización de las condiciones para PCR

Se estandarizaron las condiciones para PCR, usando un termociclador MultiGene™ de Labnet como la indica la tabla siguiente (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones de tiempo y temperatura para las reacciones de PCR para la amplificación de las regiones genómicas

| Números de ciclos | Etapas de la amplificación | Tiempo | Temperatura °C |
|-------------------|----------------------------|--------|----------------|
| 30 Ciclos | Desnaturalización | 5 min | 94 |
| | Desnaturalización | 30 s | 94 |
| | Alineación | 1 min | 53 |
| | Elongación | 2 min | 72 |
| | Extensión | 7 min | 72 |

Cada 50 μ l de reacción de PCR contiene los reactivos mostrados en la tabla 4.

Tabla 4. Cantidades de reactivos utilizados para una reacción de PCR de 50 μ l.

| Reactivos | Cantidad |
|-------------------------|-----------------|
| Buffer A | 5 μ l |
| MgCl ₂ | 5 μ l |
| dNTP's | 5 μ l |
| Oligo forward | 1 μ l |
| Oligo reverse | 1 μ l |
| Taq polimerasa | 0.2 μ l |
| DNA | 50 ng |
| Agua libre de nucleasas | -- |

- Los tiempos y temperaturas usadas fueron: Para la desnaturalización inicial 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de: 30s de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineación con la temperatura que se destinó para cada par de oligos y 2 min de elongación a 72°C. Un paso de extensión final por 7 min a 72°C.
- Los productos de PCR se purificaron a partir de un gel de agarosa al 0.8% utilizando el GeneJET Gel Extraction Kit y fueron entregados a la Unidad de Síntesis y Secuenciación, IBT-UNAM como está indicado en el reglamento para la preparación de la muestra.

7.7 Secuenciación y análisis bioinformático

7.7.1 Secuencias de las bases de datos

Se utilizaron las siguientes secuencias de referencia para la creación de los árboles filogenéticos:

ITS: AF363764, AF363757, FJ234205, FJ234206, AF363768, FJ234198, FJ234199, AF363769, FJ234201, FJ234202, FJ234202, FJ234203, FJ234204, FJ234185, FJ234186, FJ234187, FJ234188, FJ234188, FJ234188, FJ234200, AF363753, AF363753, AF363763, AF363770, AF363762, AF363754, FJ750267, FJ750266, AF363760, FJ873395, FJ234207, FJ750268.

β -tubulina: FJ410369, FJ410370, FJ410371, FJ410368, FJ410376, FJ410377, FJ410366, FJ410354, FJ410355, FJ410363, FJ410364, FJ410365, FJ410341, FJ410342, FJ410343, FJ410344, FJ410346, FJ410347, FJ410348, FJ410349, FJ410350, FJ410351, FJ410352, FJ410362, FJ410353, FJ410356, FJ410357, FJ410358, FJ410359, FJ410360, FJ410361, FJ410372, FJ410373, FJ410374, FJ410378, FJ410375.

Lcc3-1: EU683258, AF170093, EU684159, EU714500, EU684160, FJ425895, FJ425896, EU684158, FJ232700, FJ23270, EU714502, EU684161, EU714503, EU678766, EU678779, EU678767, EU678768, EU678770, EU67877, EU678772, EU678773, EU678774, EU678782, EU678776, EU68415, EU678786, EU71449, EU683255, EU683256, EU683257, EU678784, EU678783, EU683253, EU678785, EU683254, EU714501.

7.7.2 Programas utilizados para los análisis bioinformáticos

Se utilizó el programa 4PEAKS para la revisión de las secuencias en crudo. Y la herramienta BLAST de la plataforma del NCBI para los análisis de alineamiento básico local.

7.7.3 Programas utilizados para la construcción de árboles filogenéticos

El programa utilizado para las alineaciones y la construcción de los árboles filogenéticos fue MEGA versión 7.0.26.

8. RESULTADOS

8.1 Diseño de oligos

Se mandaron a sintetizar los oligos para el fragmento del gen de ITS, β -tubulina y lacasas reportados por White *et al.*, 1990 y Lesage-Meessen *et al.*, 2011, para los oligos del gen de la β -tubulina y lacasas se utilizó la nomenclatura para las bases degeneradas como se muestra en la tabla 4. Para el fragmento del gen de la fenoxazinona sintasa se diseñó el oligo degenerado a partir de la secuencia reportada en *Streptomyces*. La temperatura de alineación será con base a la temperatura de fusión.

Tabla 5. Oligos para las secuencias de los genes de las ITS, β -tubulina, lacasas y fenoxazinona sintasa y cantidades sintetizadas

| Oligos | Secuencia | pb | %GC | TM | Tamaño de fragmento (pb) | Conc ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) |
|----------------------|--|----|-----|----|--------------------------|------------------------------------|
| ITS | Fw: 5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3' | 19 | 63 | 62 | 600-800 | 0.88 |
| | Rv: 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3' | 20 | 45 | 58 | | 1.62 |
| β -TUBULINA | Fw: 5'ATC ACW CAC TCD CTD GGT GGT GG3' | 23 | 52 | 68 | 400-660 | 1.02 |
| | Rv: 5'CAT GAA GAA RTG DAG ACG DGG G3' | 22 | 45 | 64 | | 1.04 |
| LACASAS | Fw: 5'CAY TGG CAY GGR TTC TTC C3' | 19 | 47 | 56 | 1640 | 1.40 |
| | Rv: 5'GAG RTG GAA GTC RAT GTG RC3' | 20 | 45 | 58 | | 1.17 |
| FENOXAZINONA SINTASA | Fw: 5'TGG GTG CGC CTG CAC CCG3' | 18 | 77 | 64 | 830 | 0.89 |
| | Rv: 5'GAC SGG SAC SGG RCG SGG C3' | 19 | 63 | 62 | | 1.22 |

En rojo: Bases sustituidas en base al código de una letra para oligos degenerados.

Para los oligos internos de gen *lcc3-1* se enviaron a sintetizar los oligos diseñados anteriormente:

Tabla 6. Oligos intermedios para la secuencia del gen de las lacasas reportada por Lesage-Meessen *et al.*

| Oligos | Secuencia | pb | %GC | TM | Tamaño de fragmento (pb) | Conc ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) |
|--------|-------------------------------------|----|-----|----|--------------------------|------------------------------------|
| LAC_1 | Fw: 5'CAY TGG CAY GGR TTC TTC C3' | 19 | 47 | 56 | 566 | 1.40 |
| | Rv: 5'A CCG CTT KCC CTG BGT GAC3' | 19 | 64 | 68 | | 1.36 |
| LAC_2 | Fw: 5'GTC ACV CAG GGM AAG CGG T3' | 19 | 64 | 68 | 584 | 1.29 |
| | Rv: 5'GTC VAC RCC WCC DGS CTC GGG3' | 21 | 73 | 73 | | 0.87 |
| LAC_3 | Fw: 5'CCC GAG SCH GGW GGY GTB GAC3' | 19 | 69 | 64 | 536 | 1.75 |
| | Rv: 5'GAG RTG GAA GTC RAT GTG RC3' | 20 | 45 | 58 | | 1.17 |

8.2 Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA por el método de fenol-cloroformo de las cepas HEMIM de *Pycnoporus*. El DNA se resuspendió en un volumen final de 50 μl de agua libre de nucleasas. Inicialmente se había hecho la extracción macerando el micelio con nitrógeno líquido y también usando hielo seco como método para romper la membrana de las células con posterior agitación en un vortex por un minuto, como se indica en la técnica original, sin embargo no se obtuvieron buenos resultados siguiendo esta técnica.

Se midió la concentración de las muestras obtenidas para verificar la presencia de DNA en un Nanodrop 1000 UV Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific™) (Tabla 7).

Tabla 7. Cuantificación de DNA y valores de pureza en el rango de absorbancia 260/280.

| Cepa | Concentración (ng/ μ l) | 260/280 |
|----------|-----------------------------|---------|
| HEMIM-51 | 1260 | 1.84 |
| HEMIM-53 | 343 | 1.80 |
| HEMIM-59 | 1999 | 1.87 |
| HEMIM-61 | 3738 | 1.99 |
| HEMIM-63 | 1353 | 1.78 |
| HEMIM-67 | 1277 | 1.81 |
| HEMIM-74 | 1594 | 1.79 |

Los resultados muestran que el total de DNA extraído de las muestras es suficiente para realizar iniciar los ensayos de PCR en el termociclador empleando los diferentes oligonucleótidos para evaluar la presencia de los genes para ITS, β -tubulina, lacasas y fenoxazinona sintasa. Se obtuvo una mayor cantidad de DNA de la cepa HEMIM-61 y una menor cantidad de la cepa HEMIM-53. En cuanto a los valores de pureza con base al rango de absorbancia 260/280 nm nos dice que nuestras muestras se encuentran lo suficientemente puras y libres de contaminación por sales y otros compuestos para realizar los siguientes experimentos.

8.3 Amplificación de las regiones genómicas por PCR

Se amplificaron las regiones ITS, β -tubulina y el gen *lcc3-1* modificando las temperaturas de alineación; 53°C para los oligos que amplifican la región ITS, 67°C para los oligos que amplifican la región parcial de β -tubulina y 62.5°C para los oligos que amplifican el gen *lcc3-1*, posteriormente se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 0.8% (Figuras 12, 13 y 14).

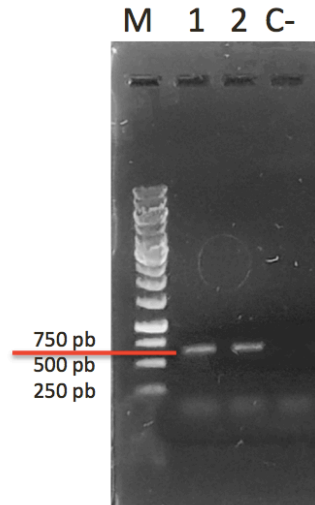


Figura 12. Gel de electroforesis al 0.8% con la amplificación de la región ITS; Carril 1) : marcador molecular, Carriles 2 y 3) Bandas de la amplificación de la región ITS de la cepa HEMIM-51 donde se muestra una banda aproximadamente de 700 pb Carril 4) Control negativo.

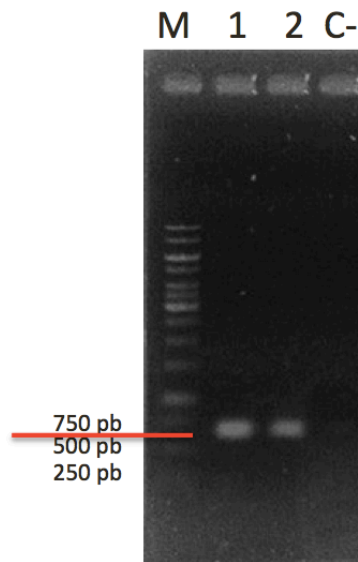


Figura 13. Gel de electroforesis al 0.8%; con la amplificación de la región parcial de gen de β -tubulina Carril 1) : marcador molecular, Carril 2 y 3) Bandas de la amplificación de la región parcial del gen de β -tubulina de la cepa HEMIM-51 donde se muestra una banda aproximadamente de 600 pb, 4) Control negativo.

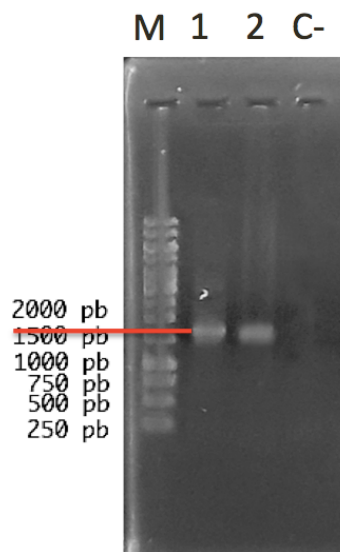


Figura 14. Gel de electroforesis al 0.8% con la amplificación del gen *lcc3-1*; Carril 1) Marcador molecular, Carriles 2 y 3) Bandas de la amplificación por duplicado del gen *lcc3-1* de la cepa HEMIM-51 donde se pueden ver una banda de 1640 pb, lo reportado para el gen *lcc3-1*, Carril 3) Control negativo.

Usando los oligos diseñados por White *et al.*, 1990 para la región ITS se obtuvo una banda aproximada de 600-700 pb (Figura 12), con los oligos diseñados para una región parcial del gen β -tubulina (Figura 13) (Lesage-Meessen *et al.*, 2011) se obtuvo una banda de aproximadamente 600 pb, mientras que para los oligos diseñados para el gen *lcc3-1* (Figura 14) (Lesage-Meessen *et al.*, 2011) se obtuvo un fragmento de 1600 pb. Los tamaños obtenidos coinciden con los tamaños que están reportados para estos oligos.

8.3.1 Amplificación del gen *lcc3-1* usando los oligos internos

Para la amplificación de secuencias más cortas del gen *lcc3-1* se usaron oligos intermedios (Tabla 6), además de los oligos ya reportados por Lesage-Meessen *et al.* (2011). Se pudieron amplificar dos regiones; la primera de 566 pb (Figura 15) y la segunda de 584 pb (Figura 16) a una TM de 65 y 69, respectivamente.

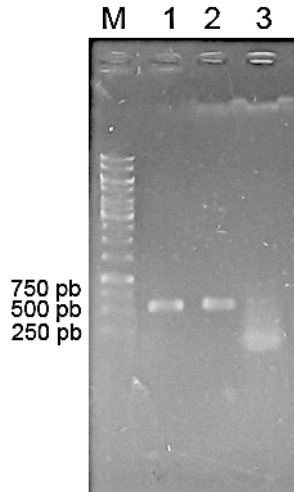


Figura 15. Gel de electroforesis al 0.8% con la amplificación del gen *lcc3-1* usando los oligos F2 (Lesage-Meeseen) y RL3; Carril 1) Marcador molecular, Carriles 2 y 3) Amplificación por duplicado del gen *lcc3-1* de la cepa HEMIM-51 donde se pueden ver una banda de peso aproximado que corresponde con los 566 pb esperados con estos oligos, Carril 4) Control negativo.

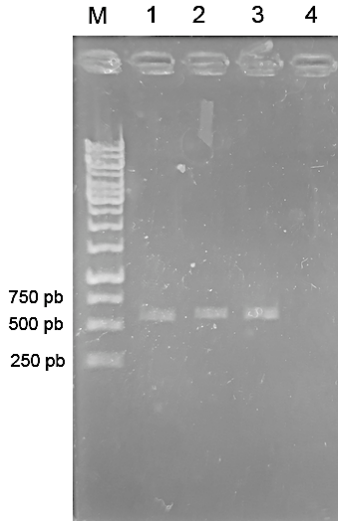


Figura 16. Gel de electroforesis al 0.8% con la amplificación del gen *lcc3-1* usando los oligos FL3 y RL4; Carril 1) Marcador molecular, Carriles 2 y 3) Amplificación por duplicado del gen *lcc3-1* de la cepa HEMIM-51 donde se pueden ver una banda de peso aproximado que corresponde con los 584 pb esperados con estos oligos, Carril 4) Control negativo.

Se cortaron las bandas, se purificaron con el kit GeneJET Gel Extraction Kit (THERMO SCIENTIFIC FISHER) resuspendiéndose en 50 μ l de buffer de elución. Se midió la concentración de DNA en Nanodrop para posteriormente enviar a secuenciar.

8.4 Análisis bioinformáticos

Los resultados de la secuenciación de las regiones ITS, de la región parcial de β -tubulina y el gen *lcc3-1* fueron analizados mediante 4PEAKS y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del portal NCBI (National Center for Biotechnology Information).

8.4.1 Análisis BLAST

Para el caso de la cepa HEMIM-51 se obtuvieron las secuencias de las regiones ITS y β -tubulina, mientras que de la secuencia del gen *lcc3-1* no se obtuvieron los suficiente nucleótidos para poder hacer una comparación, se esperan nuevos resultados de una segunda secuenciación.

En la tabla siguiente se indican los resultados obtenidos del análisis BLAST realizado a las cepa HEMIM-51.

Tabla 8. Resultados del análisis BLAST de la secuencia de la región ITS de la cepa HEMIM-51

| ITS | E value | % Similitud | Número de acceso |
|---|---------|-------------|------------------|
| <i>Trametes sanguinea</i> strain CBS 376.52 | 1e-118 | 94 | MH857087.1 |
| <i>Trametes cinnabarina</i> strain CBS 311.33 | 1e-118 | 94 | MH855446.1 |
| <i>Trametes coccinea</i> strain SC46 | 1e-118 | 94 | MH359097.1 |
| <i>Trametes sanguinea</i> strain 6107273MF0078 | 1e-118 | 94 | KY950508.1 |
| <i>Trametes coccinea</i> strain 610723MF0077 | 1e-118 | 94 | KY950507.1 |
| <i>Trametes sanguinea</i> strain 610723MF0005 | 1e-118 | 94 | KY950441.1 |
| <i>Trametes sanguinea</i> voucher Cui6980 | 1e-118 | 94 | KX880627.1 |
| <i>Pycnoporus coccineus</i> voucher ZJ1009DKJ03 | 1e-118 | 94 | KU863058.1 |
| <i>Pycnoporus coccineus</i> voucher ZJ1009DKJ02 | 1e-118 | 94 | KU863057.1 |
| <i>Pycnoporus coccineus</i> voucher ZJ1009DKJ01 | 1e-118 | 94 | KU863056.1 |
| <i>Trametes sanguinea</i> | 1e-118 | 94 | KX677793.1 |
| <i>Pycnoporus</i> sp. SYBC-L10 | 1e-118 | 94 | KU510236.1 |
| <i>Pycnoporus coccineus</i> isolate KKUPN2 | 1e-118 | 94 | KU202742.1 |
| <i>Pycnoporus coccineus</i> isolate KKUPN1 | 1e-118 | 94 | KU202741.1 |
| <i>Pycnoporus coccineus</i> voucher KA12-1267 | 1e-118 | 94 | KR673511.1 |

Los análisis BLAST de la secuencia ITS de la cepa HEMIM-51 arrojó un porcentaje de 94% de similitud con un E-value de 1e-118 con las especies *Trametes sanguineus* (No. acceso: MH857087.1, KY950508.1 y KY950441.1), *Trametes cinnabarina* (No. acceso: MH855446.1), *Trametes coccineus* (No. acceso: MH359097.1 y KY950507.1) y cepas de *Pycnoporus coccineus* (No. acceso: KU863058.1, KU863057.1, KU863056.1, KU202742.1, KU202741.1 y KR673511.1), cabe destacar que las especies *Trametes sanguinea*, *Trametes coccinea* y *Trametes cinnabarina* son nombres con los cuales se designaba antiguamente a las especies del género *Pycnoporus*. Los resultados muestran que la secuencia obtenida tiene

similaridad con *P. sanguineus*, *P. cinnabarinus* y *P. coccineus*, quizá debido a que las secuencias del Genebank no todas han sido curadas (revisadas y anotadas). En la siguiente figura se hizo un alineamiento de la secuencia de la cepa HEMIM-51 con tres especies de *Pycnoporus* con números de acceso: FJ234205.1, GQ982886.1, FJ234207.1, donde se puede ver mayor coincidencia entre sus bases con la cepa *P. sanguineus* (GQ982886.1) y *P. coccineus* (FJ234207.1). Por lo que el resultado es inconcluso, a pesar que existen reportes que con ITS es posible identificar cepas de *Pycnoporus sanguineus* con un porcentaje del 97 al 100% de identidad (Dantán-González *et al.*, 2008; Muñoz Cruz *et al.*, 2009)

```

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

Cepa_HEMIM-51      TAGCTGGCCTTCCGGGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGGAATAC
FJ234205.1         TAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACCTTAC
GQ982886.1         TAGCTGGCCTTCCGGGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACCTTAC
FJ234207.1         TAGCTGGCCTTCCGGGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACCTTAC
*****

Cepa_HEMIM-51      TGTAGGTTTGGCGTGGGCCTCTCGAGGCCCTCCTCCGGGTC--TTGAGGCATTCTGCCGGCCT
FJ234205.1         TGTAGGTTTGGTGTGGGCTTC---GGGGCCTCCGGGCTTTCGAGGCACCTCTGCCGGCCT
GQ982886.1         TGTAGGTTTGGCGTGGGCCTCTCGAGGCCCTCCTCCGGGTC--TTGAGGCATTCTGCCGGCCT
FJ234207.1         TGTAGGTTTGGCGTGGGCTTC---GGGGCCTCCGGGCTTTCGAGGCATTCTGCCGGCCT
*****

Cepa_HEMIM-51      ATGTATCACTACAAACACTTAAAGTAAAGAATGTATTGCGCTCTAACGCTCTCAAATAC
FJ234205.1         ATGTAACTACTACAAACACTTAAAGTAAAGAATGTATTGCGCTCTAACGACATAAATAC
GQ982886.1         ATGTATCACTACAAACACTTAAAGTAAAGAATGTATTGCGCTCTAACGCATCTAAATAC
FJ234207.1         ATGTATCACTACAAACACTTAAAGTAAAGAATGTATTGCGCTCTAACGCATCTAAATAC
*****

Cepa_HEMIM-51      AACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGACAGAACGACGAAATCGGAT
FJ234205.1         AACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA--AGAACGACGGAATCGGAT
GQ982886.1         AACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA--AGAACGACGGAATCGGAT
FJ234207.1         AACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA--AGAACGACGGAATCGGAT
*****

Cepa_HEMIM-51      AAGTAATGTGAATTGCAGACTTCAAGTGAATCATCAAACCTTTGAACGCACCTTGCCTCC
FJ234205.1         AAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCC
GQ982886.1         AAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCC
FJ234207.1         AAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCC
*****

Cepa_HEMIM-51      TTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTCAAGTGTGATGGAATTCACAACCCACAATAAAA
FJ234205.1         TTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTGATGGAATTCACAACCCACACGT----
GQ982886.1         TTGGTATTCGAGNAGCATGCCTGTTTGAAGTGTGATGGAATTCACAACCCACACAT----
FJ234207.1         TTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTGATGGAATTCACAACCCACACAT----
*****

Cepa_HEMIM-51      GCCC----ACCCTGCAGCCCTTAAA-----
FJ234205.1         -CCTTGATGATGCGGGCTTGATTGGA
GQ982886.1         -CCTTGATGATGCGGNCTTGATT----
FJ234207.1         -CCTTGATGATGCGGGCTTGATT----
** * * * * *

```

Figura 17. Alineación de las secuencias ITS de la cepa HEMIM-51 con secuencias ITS del banco de datos.

Posteriormente, se procedió a hacer el análisis de la secuencia obtenida del fragmento amplificado del gen de β -tubulina, tabla 8.

Tabla 9. Resultados del análisis BLAST de la secuencia de la región parcial del gen β -tubulina de la cepa HEMIM-51 con secuencias del GeneBank.

| β-tubulina | E value | % Similitud | Número de acceso |
|---|----------------|--------------------|-------------------------|
| <i>Pycnopus coccineus</i> strains MUCL 38523 | 6e-28 | 85 | FJ410373.1 |
| <i>Pycnopus cinnabarinus</i> strain MUCL 38420 | 6e-28 | 85 | FJ410368.1 |
| <i>Pycnopus coccineus</i> strains MUCL 38525 | 3e-26 | 85 | FJ410374.1 |
| <i>Pycnopus coccineus</i> strains MUCL 38527 | 3e-26 | 85 | FJ410372.1 |
| <i>Pycnopus sanguineus</i> strain IMB G05.10 | 3e-26 | 85 | FJ410361.1 |
| <i>Pycnopus sanguineus</i> strain IMB G66 | 3e-26 | 85 | FJ410359.1 |
| <i>Pycnopus sanguineus</i> strain H2180 | 3e-26 | 85 | FJ410358.1 |
| <i>Pycnopus sanguineus</i> strain IMB G53 | 3e-26 | 85 | FJ410357.1 |
| <i>Pycnopus sanguineus</i> strain IMB W3008 | 3e-26 | 85 | FJ410356.1 |
| <i>Pycnopus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 542 | 3e-26 | 85 | FJ410353.1 |
| <i>Pycnopus sanguineus</i> strain IMBW006-2 | 1e-24 | 85 | FJ410360.1 |

Los resultados del análisis BLAST para la secuencia parcial del gen β -tubulina (Tabla 8), indican un porcentaje de similitud del 85% con las cepas *Pycnopus coccineus* (No. acceso: FJ410373.1, FJ410374.1 y FJ410372.1), *Pycnopus cinnabarinus* (No. acceso: FJ410368.1) y *Pycnopus sanguineus* (No. de acceso: FJ410361.1, FJ410359.1, FJ410358.1, FJ410357.1, FJ410356.1, FJ410353.1 y FJ410360.1). De nuevo parecería un resultado inconcluso porque no se puede confirmar a que especie de *Pycnopus* pertenece la cepa HEMIM-51.

Se revisó cada número de acceso de cada una de las cepas para verificar la confiabilidad del origen de la secuencia, es decir si esta fue curada en la identificación. Todas las secuencias de la tabla 8 fueron anotadas y revisadas, son parte de las secuencias amplificadas con oligos dirigidos al gen de β -tubulina que utilizó Lesage-Meessen *et al.*, 2011. por lo que la secuencia obtenida para β -tubulina de la cepa *Pycnopus* HEMIM-51, tiene un 85 % de similitud con estas secuencias.

Estas secuencias además fueron re-identificadas usando oligos para amplificar el gen *lcc3-1*, los resultaron (Tabla 10) sugieren que la cepa *Pycnopus* HEMIM-51 posiblemente es *Pycnopus coccineus* o *Pycnopus cf. coccineus*. Sin embargo, en este trabajo se esperan los resultados de secuenciación para proceder con la identificación de esta cepa HEMIM-51 con el marcador del gen *lcc3-1*.

Tabla 10. Cepas re-identificadas usando la secuencia del gen *lcc3-1* por Lesage- Meessen *et al.*, 2011

| Cepa | Re-identificación usando el gen <i>lcc3-1</i> | Número de acceso |
|--|--|-------------------------|
| <i>Pycnopus coccineus</i> strains MUCL 38523 | <i>Pycnopus coccineus</i> | FJ410373.1 |
| <i>Pycnopus cinnabarinus</i> strain MUCL 38420 | <i>Pycnopus coccineus</i> | FJ410368.1 |

| | | |
|---|---------------------------------|------------|
| <i>Pycnoporus coccineus</i> strains MUCL 38525 | <i>Pycnoporus coccineus</i> | FJ410374.1 |
| <i>Pycnoporus coccineus</i> strains MUCL 38527 | <i>Pycnoporus cf. coccineus</i> | FJ410372.1 |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain IMB G05.10 | <i>Pycnoporus cf. coccineus</i> | FJ410361.1 |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain IMB G66 | <i>Pycnoporus cf. coccineus</i> | FJ410359.1 |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain H2180 | <i>Pycnoporus cf. coccineus</i> | FJ410358.1 |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain IMB G53 | <i>Pycnoporus cf. coccineus</i> | FJ410357.1 |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain IMB W3008 | <i>Pycnoporus cf. coccineus</i> | FJ410356.1 |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 542 | <i>Pycnoporus cf. coccineus</i> | FJ410353.1 |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain IMBW006-2 | <i>Pycnoporus cf. coccineus</i> | FJ410360.1 |

A continuación se presentan los resultados del análisis BLAST realizado a la secuencia del primer fragmento amplificado del gen *lcc3-1* (Figura 18), un fragmento de 566 pb.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Perc. ident | Accession |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------------|----------------------------|
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain BRFM 898 laccase gene, partial cds | 250 | 250 | 98% | 4e-62 | 75.47% | EU678781.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain BRFM 902 laccase gene, complete cds | 248 | 248 | 98% | 1e-61 | 75.51% | FJ858751.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 906 laccase gene, partial cds | 248 | 248 | 98% | 1e-61 | 75.51% | EU678776.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 902 laccase gene, partial cds | 248 | 248 | 98% | 1e-61 | 75.51% | EU678773.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 896 laccase gene, partial cds | 248 | 248 | 98% | 1e-61 | 75.51% | EU678768.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 942 laccase gene, partial cds | 246 | 246 | 98% | 5e-61 | 75.47% | FJ232700.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 979 laccase gene, partial cds | 246 | 246 | 98% | 5e-61 | 75.47% | EU714502.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 905 laccase gene, partial cds | 244 | 244 | 98% | 2e-60 | 75.28% | EU678782.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 897 laccase gene, partial cds | 244 | 244 | 98% | 2e-60 | 75.28% | EU678780.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 900 laccase gene, partial cds | 244 | 244 | 98% | 2e-60 | 75.28% | EU678771.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 899 laccase gene, partial cds | 244 | 244 | 98% | 2e-60 | 75.28% | EU678770.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain BRFM 894 laccase gene, partial cds | 244 | 244 | 98% | 2e-60 | 75.28% | EU678769.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 895 laccase gene, partial cds | 244 | 244 | 98% | 2e-60 | 75.28% | EU678767.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 892 laccase gene, partial cds | 244 | 244 | 98% | 2e-60 | 75.28% | EU678766.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 980 laccase gene, partial cds | 239 | 239 | 91% | 9e-59 | 75.90% | EU684161.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 893 laccase gene, partial cds | 239 | 239 | 98% | 9e-59 | 75.23% | EU678779.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 903 laccase gene, partial cds | 239 | 239 | 98% | 9e-59 | 75.09% | EU678774.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain MUCL 29375 laccase gene, partial cds | 237 | 237 | 91% | 3e-58 | 75.75% | EU684158.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 943 laccase gene, partial cds | 231 | 231 | 98% | 2e-56 | 74.91% | FJ232701.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 981 laccase gene, partial cds | 215 | 215 | 90% | 2e-51 | 75.20% | EU714503.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus coccineus</i> strain MUCL 38525 laccase gene, partial cds | 187 | 187 | 98% | 3e-43 | 73.46% | EU714501.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> strain MUCL 38420 laccase gene, partial cds | 150 | 150 | 49% | 4e-32 | 77.41% | EU684160.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <i>Pycnoporus coccineus</i> strain BRFM 938 laccase gene, complete cds | 147 | 147 | 47% | 6e-31 | 77.48% | FJ858750.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus coccineus</i> strain MUCL 38523 laccase gene, partial cds | 147 | 147 | 47% | 6e-31 | 77.48% | EU683254.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> laccase (<i>Lcc1</i>) gene, complete cds | 147 | 147 | 47% | 6e-31 | 77.48% | AY147188.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> laccase (<i>lcc3-1</i>) gene, complete cds | 147 | 147 | 47% | 6e-31 | 77.48% | AF025481.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> copper binding domains I and II | 130 | 130 | 16% | 6e-26 | 93.26% | AJ620582.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus coccineus</i> isolate Lcc3 laccase gene, partial cds | 130 | 130 | 16% | 6e-26 | 93.26% | AY243854.1 |
| <input type="checkbox"/> Uncultured basidiomycete partial lac gene for laccase, exon 1, clone S7-H1-Seq13 | 126 | 126 | 15% | 7e-25 | 93.10% | AJ540236.1 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> partial mRNA for laccase (<i>lac3</i> gene) | 126 | 126 | 15% | 7e-25 | 93.10% | AJ420334.1 |

Figura 18. Resultados del análisis BLAST del primer fragmento del gen *lcc3-1*.

Con una cobertura (**Query cover**) del 90 al 98% se encontró identidad con *Pycnoporus sanguineus* con un porcentaje de 73 al 75% con los siguientes números de acceso: EU678781.1, FJ858751.1, EU678776.1, EU678773.1, EU678768.1, FJ232700.1, EU714502.1, EU678782.1, EU678780.1, EU678771.1, EU678770.1, EU678769.1,

EU678767.1, EU678766.1, EU684161.1, EU678779.1, EU678774.1, EU684158.1, FJ232701.1, EU714503.1 con la excepción de la cepa con número de acceso EU714501.1 registrada como *Pycnoporus coccineus*. Así mismo se encontró un porcentaje de identidad del 77% con cepas de *Pycnoporus coccineus* y *Pycnoporus cinnabarinus* pero con un porcentaje de cobertura menor, osea del 47%.

Para el segundo fragmento del gen *lcc3-1* se obtuvo un porcentaje de identidad del 86-88% con una cobertura de 81-85% con cepas de *Pycnoporus sanguineus* con números de acceso: EU684158.1, EU678780.1, EU678781.1, EU678771.1, EU678769.1, EU678767.1, FJ232700.1, EU678782.1, EU678774.1, EU67876.1, EU678774.1, EU678770.1, EU678766.1, FJ232701.1, EU714502.1 y EU714503.1; y con un porcentaje de identidad del 79% y una cobertura del 79% cepas re-identificadas como *Pycnoporus coccineus* (Lesage-Meesseen *et al.*, 2011) con número de acceso: EU683256.1, EU683255.1, EU683253.1, EU678786.1, EU678784.1, AB072704.1, KP718631.1 (Figura 19).

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Perc. ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------------|----------------------------|
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain MUCL 29375 laccase gene, partial cds | 536 | 536 | 81% | 3e-148 | 88.91% | EU684158.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 897 laccase gene, partial cds | 531 | 531 | 85% | 1e-146 | 87.85% | EU678780.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain BRFM 898 laccase gene, partial cds | 525 | 525 | 85% | 6e-145 | 87.64% | EU678781.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 900 laccase gene, partial cds | 525 | 525 | 85% | 6e-145 | 87.64% | EU678771.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain BRFM 894 laccase gene, partial cds | 525 | 525 | 85% | 6e-145 | 87.64% | EU678769.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 895 laccase gene, partial cds | 525 | 525 | 85% | 6e-145 | 87.64% | EU678767.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 942 laccase gene, partial cds | 520 | 520 | 81% | 3e-143 | 88.21% | FJ232700.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 905 laccase gene, partial cds | 520 | 520 | 85% | 3e-143 | 87.42% | EU678782.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 903 laccase gene, partial cds | 520 | 520 | 85% | 3e-143 | 87.42% | EU678774.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 895 laccase gene, partial cds | 525 | 525 | 85% | 6e-145 | 87.64% | EU678767.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 942 laccase gene, partial cds | 520 | 520 | 81% | 3e-143 | 88.21% | FJ232700.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 905 laccase gene, partial cds | 520 | 520 | 85% | 3e-143 | 87.42% | EU678782.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 903 laccase gene, partial cds | 520 | 520 | 85% | 3e-143 | 87.42% | EU678774.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 899 laccase gene, partial cds | 520 | 520 | 85% | 3e-143 | 87.42% | EU678770.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 892 laccase gene, partial cds | 520 | 520 | 85% | 3e-143 | 87.42% | EU678766.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 943 laccase gene, partial cds | 514 | 514 | 81% | 1e-141 | 87.98% | FJ232701.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 979 laccase gene, partial cds | 508 | 508 | 81% | 6e-140 | 87.76% | EU714502.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 981 laccase gene, partial cds | 501 | 501 | 84% | 1e-137 | 86.84% | EU714503.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain IMB H2180 laccase gene, partial cds | 298 | 298 | 79% | 1e-76 | 79.49% | EU683256.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain IMB G53 laccase gene, partial cds | 294 | 294 | 79% | 2e-75 | 79.30% | EU683255.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus coccineus strain MUCL 38527 laccase gene, partial cds | 294 | 294 | 79% | 2e-75 | 79.30% | EU683253.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRIM-BRFM 542 laccase gene, partial cds | 294 | 294 | 79% | 2e-75 | 79.30% | EU678786.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain IMB W006-2 laccase gene, partial cds | 294 | 294 | 79% | 2e-75 | 79.30% | EU678784.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus coccineus lcc1 gene for laccase, complete cds | 294 | 294 | 79% | 2e-75 | 79.35% | AB072704.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus coccineus strain IUM 0450 laccase gene, partial cds | 289 | 289 | 79% | 9e-74 | 79.07% | KP718631.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus coccineus lcc1 mRNA for laccase, complete cds | 193 | 193 | 29% | 7e-45 | 88.61% | AB072703.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus cinnabarinus laccase (lcc3-2) gene, complete cds | 137 | 137 | 26% | 3e-28 | 84.14% | AF123571.1 |

Figura 19. Resultado del análisis BLAST para el segundo fragmento del gen *lcc3-1*.

Una vez secuenciados ambos fragmentos se unieron dando un total de 1070 pb y se realizó otro análisis BLAST (Figura 20) para confirmar los resultados ya obtenidos donde se pueden destacar las cepas de *Pycnoporus sanguineus* con un porcentaje de identidad del 79-80% con

una cobertura del 92%, donde se destaca un e-value de 0.0 donde anteriormente se obtenían e-values altos.

| Alignments | | | | | | |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------------|----------------------------|
| Download GenBank Graphics Distance tree of results | | | | | | |
| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Perc. ident | Accession |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain BRFM 898 laccase gene, partial cds | 730 | 730 | 92% | 0.0 | 80.16% | EU678781.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 897 laccase gene, partial cds | 730 | 730 | 92% | 0.0 | 80.16% | EU678780.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 900 laccase gene, partial cds | 725 | 725 | 92% | 0.0 | 80.06% | EU678771.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain BRFM 894 laccase gene, partial cds | 725 | 725 | 92% | 0.0 | 80.06% | EU678769.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 895 laccase gene, partial cds | 725 | 725 | 92% | 0.0 | 80.06% | EU678767.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain MUCL 29375 laccase gene, partial cds | 723 | 723 | 92% | 0.0 | 80.16% | EU684158.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 905 laccase gene, partial cds | 719 | 719 | 92% | 0.0 | 79.96% | EU678782.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 899 laccase gene, partial cds | 719 | 719 | 92% | 0.0 | 79.96% | EU678770.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 892 laccase gene, partial cds | 719 | 719 | 92% | 0.0 | 79.96% | EU678766.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 942 laccase gene, partial cds | 717 | 717 | 92% | 0.0 | 80.04% | FJ232700.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain BRFM 902 laccase gene, complete cds | 713 | 713 | 92% | 0.0 | 79.84% | FJ858751.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 906 laccase gene, partial cds | 713 | 713 | 92% | 0.0 | 79.84% | EU678776.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 903 laccase gene, partial cds | 713 | 713 | 92% | 0.0 | 79.86% | EU678774.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 902 laccase gene, partial cds | 713 | 713 | 92% | 0.0 | 79.84% | EU678773.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 896 laccase gene, partial cds | 713 | 713 | 92% | 0.0 | 79.84% | EU678768.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 893 laccase gene, partial cds | 708 | 708 | 92% | 0.0 | 79.71% | EU678779.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 979 laccase gene, partial cds | 706 | 706 | 92% | 0.0 | 79.84% | EU714502.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 943 laccase gene, partial cds | 697 | 697 | 92% | 0.0 | 79.65% | FJ232701.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 980 laccase gene, partial cds | 697 | 697 | 92% | 0.0 | 79.69% | EU684161.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 981 laccase gene, partial cds | 662 | 662 | 92% | 0.0 | 79.15% | EU714503.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus coccineus strain MUCL 38525 laccase gene, partial cds | 556 | 556 | 92% | 5e-154 | 77.11% | EU714501.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus cinnabarinus strain MUCL 38420 laccase gene, partial cds | 505 | 505 | 92% | 2e-138 | 76.27% | EU684160.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus coccineus strain MUCL 38523 laccase gene, partial cds | 499 | 499 | 92% | 8e-137 | 76.17% | EU683254.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus cinnabarinus laccase (Loc1) gene, complete cds | 494 | 494 | 92% | 4e-135 | 76.07% | AY147188.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus coccineus strain BRFM 938 laccase gene, complete cds | 488 | 488 | 92% | 2e-133 | 75.98% | FJ858750.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus cinnabarinus laccase (lcc3-1) gene, complete cds | 488 | 488 | 92% | 2e-133 | 75.98% | AF025481.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain IMB H2180 laccase gene, partial cds | 298 | 298 | 40% | 3e-76 | 79.49% | EU683256.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Pycnoporus sanguineus strain IMB G53 laccase gene, partial cds | 294 | 294 | 40% | 4e-75 | 79.30% | EU683255.1 |
| <input type="checkbox"/> Pycnoporus coccineus strain MUCL 38527 laccase gene, partial cds | 294 | 294 | 40% | 4e-75 | 79.30% | EU683253.1 |

Figura 20. Resultados del BLAST de los dos fragmentos unidos del gen *lcc3-1*.

8.4.2 Construcción de árboles filogenéticos

Establecer las relaciones evolutivas usando los árboles filogenéticos permite conocer que tan cercana evolutivamente están las especies de *Pycnoporus*. Se construyeron dos árboles, uno basado en las secuencias ITS (Figura 21) y el otro basado en las secuencias del gen de β -tubulina (Figura 22).

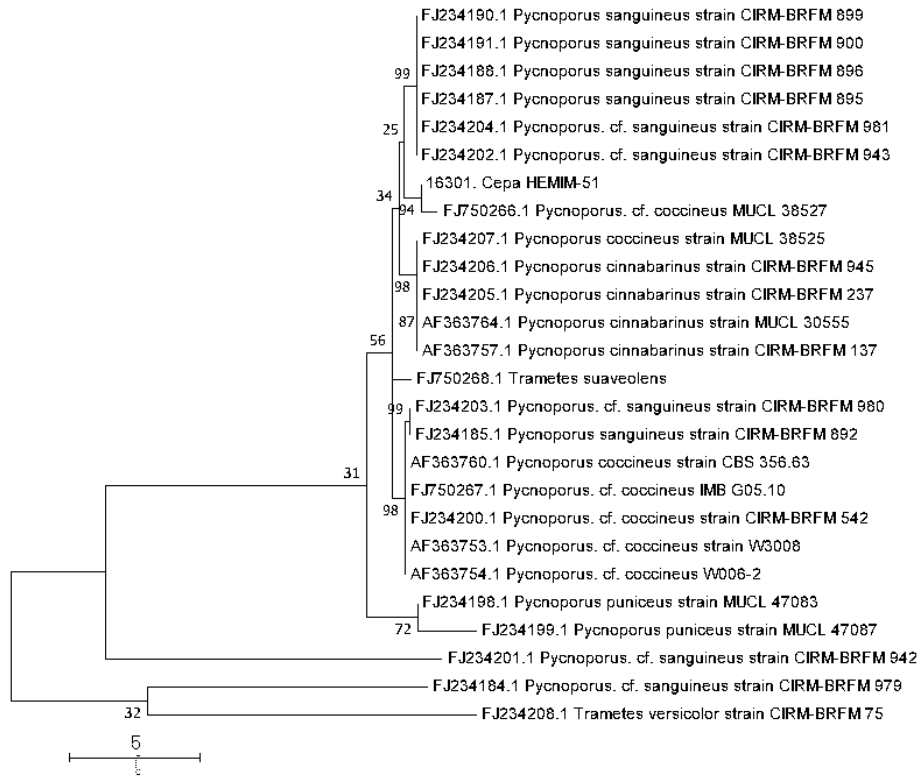


Figura 21. Árbol filogenético de Máxima verosimilitud, con un bootstrap de 1000 interacciones, usando el método de Hasegawa-Kishino-Yano con base a las secuencias ITS de la cepa HEMIM-51.

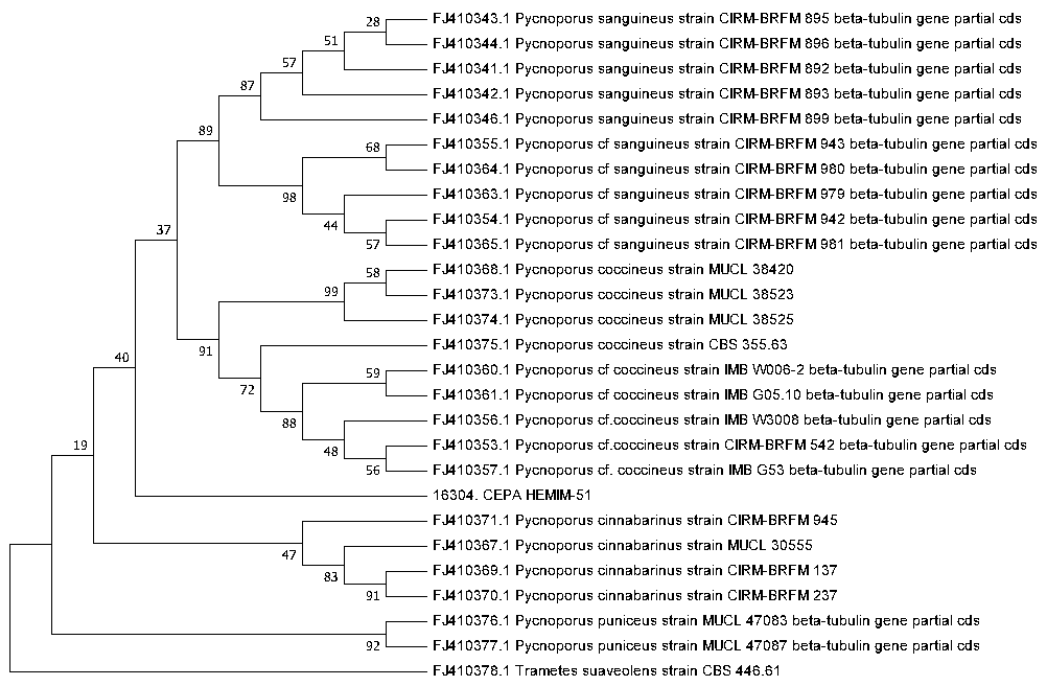


Figura 22. Árbol filogenético de Máxima verosimilitud, con un bootstrap de 1000 interacciones, usando el método de Hasegawa-Kishino-Yano con base a las secuencias β -tubulina de la cepa HEMIM-51.

En las figuras 21 y 22 se presentan los árboles construidos mediante Máxima verosimilitud, con un bootstrap de 1000 interacciones, usando el método de Hasegawa-Kishino-Yano, usando las secuencias ITS y β -tubulina de la cepa HEMIM-51 y comparándolas con cepas curadas que han sido identificadas con el gen *lcc3-1* por Lesage-Meessen *et al.*, 2011.

La cepa de *Pycnoporus* HEMIM-51 se agrupó en un clado con la secuencia de ITS de la cepa de *Pycnoporus cf. coccineus* MUCL 38527 una secuencia curada, que tuvo un 94 de bootstrap (Figura 21). Mientras que en el árbol que se construyó con base a las secuencias de β -tubulina (Figura 22) se puede ver una mayor organización entre las especies, aunque con un valor bajo de 40 bootstrap se observa que la cepa HEMIM-51 se encuentra en un clado cercano a *P. coccineus* pero diferente a *Pycnoporus sanguineus*. Lo cual sugiere que posiblemente se trata de una nueva cepa variante de *Pycnoporus coccineus*. Sin embargo, se requiere hacer los análisis bioinformáticos con las secuencias gen *lcc3-1* y fenoxazinona sintasa.

Se pueden crear metagenotecas para el análisis de cada especie, existen reportes de la genoteca de *P. cinnabarinus* (Levasseur *et al.*, 2014) y *P. sanguineus* BRFM 1264 que fue secuenciado por investigadores de Biotechnologie des Champignons Filamenteux, INRA - Aix Marseille Université utilizando la plataforma 454, se anotaron las secuencias utilizando el canal de JGI y los análisis personalizados.

8.5 Análisis de resultados

La región espaciadora transcrita interna, ITS de la unidad ribosomal nuclear es el marcador más popular para la identificación de especies y la filogenética en la investigación micológica basada en secuencias (Balajee *et al.*, 2009). Se sabe que la región ITS muestra variabilidad dentro de una especie, aunque su variabilidad intraespecífica (variaciones observadas en dentro de una misma especie en comparación con las diferencias entre especies coexistentes), se considera limitada (Nilsson *et al.*, 2009). La existencia de estas diferencias (variación intraespecífica) se asume únicamente por los enfoques que existen para la identificación de especies y lo que se discute es si la variabilidad intraespecífica es realmente insignificante en del reino fúngico. Parece ser que esto está en función del tipo de organismo, en este caso el hongo que se estudie ya sea ascomiceto o basidiomiceto, y de la variabilidad intraespecífica de ITS en todos los hongos actualmente disponibles para la comunidad micológica a través de las bases de datos de secuencias internacionales. Dentro de estas se han encontraron diferencias dentro del reino de los hongos, y los resultados no se correlacionan fácilmente con la afiliación taxonómica o el modo nutricional de los taxones considerados (Nilsson, *et al.*, 2008).

Por otro lado en la literatura, Hirata y Takamatsu, 1996; Hwang y Kim, 1999, mencionan que la secuencia de genes de la región ITS sirve para identificar géneros es útil en relaciones intraespecíficas y no es útil para estudiar las relaciones filogenéticas de especies dentro de un mismo género, una de las razones es que no hay suficiente información genética.

Sin embargo otros autores mencionan que la identificación de hongos usando regiones específicas ribosómicas, especialmente la subunidad grande del ARN (región D1-D2) y los espaciadores transcritos internos 1 y 2 (regiones ITS1 e ITS2) son más confiables y se han usado la identificación molecular de algunos hongos (Balajee et al, 2009), en comparación con los métodos fenotípicos tradicionales. En este trabajo ambos métodos permitieron identificar fácilmente *P. cinnabarinus* de *P. coccineus* y *P. sanguineus* y quizá con un porcentaje de identidad mayor mediante oligonucleótidos dirigidos a la región ITS que con β -tubulina.

En la literatura se ha reportado que el gen de β -tubulina es más confiable porque está más conservado en los organismos, sin embargo varía de acuerdo a la especie que se requiera identificar (Burns et al., 2006). Además el gen de β -tubulina es uno de los pocos genes que son interrumpidos por uno o varios intrones y la posición de estos se mantiene en todas las especies investigadas hasta ahora (Caccio et al., 2000). No es lo mismo usarlo con especies de *Aspergillus niger* con resultados más variables (Balajee et al., 2009) que con *Pleurotus sajor-caju* (Kim et al., 2001), solo existe un reporte para identificación de especies de *Pycnoporus* usando este gen y es el de Lessage-Meessen et al., 2011. Se ha mencionado que la evolución y los mecanismos moleculares que impulsan la diversificación funcional en tubulinas fúngicas no están claros (Balajee et al, 2009, Kim et al, 2001).

En este trabajo los resultados con β -tubulina posicionaron a las cepas HEMIM-51 como *P. cinnabarinus* que queda en un clado completamente diferente en comparación con *P. sanguineus* y *P. coccineus* cepas que sigue siendo difícil diferenciarlos con este marcador, por lo que se ha decidido emplear el gen de la lacasa para terminar de identificar la cepa HEMIM-51 y las otras cepas que están en este caso.

En cuanto al gen *lcc3-1*, se obtuvo aproximadamente el 65-70% del fragmento de la secuencia del gen *lcc3-1* de la cepa HEMIM-51 donde se pudo observar que guarda una gran similitud con las secuencias reportadas de *Pycnoporus sanguineus* y *Pycnoporus coccineus*, esto debido a que evolutivamente son especies muy cercanas, incluso más que las especies de *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pycnoporus coccineus*.

Al hacer un análisis BLAST se debe tener en cuenta todos los parámetros obtenidos como son el porcentaje de identidad y la cobertura de los alineamientos y el e-value. En el caso de nuestro primer fragmento (Figura 19) se obtiene un porcentaje de identidad del 77% con la cepa *P. coccineus*, sin embargo debemos tomar en cuenta que la cobertura que presentan es del 49-47%, mientras que con *P. sanguineus* se obtiene un porcentaje de identidad más bajo pero la cobertura es mayor (98%), así como el e-value más cercano a 0. Para el segundo fragmento tanto el porcentaje de identidad como la cobertura son altos para ambas especies, *P. sanguineus* y *P. coccineus*, mayores al 50% que se considera como un resultado significativo, lo cual nos indica que la parte interna de esta secuencia está mucho más conservada que los extremos. No obstante, los porcentajes mayores son para la especie de *P. sanguineus*. Para el análisis BLAST realizado a los dos fragmentos unidos (1070 pb) tenemos un porcentaje de identidad de 76-80% y el porcentaje de cobertura es de 92% para ambas especies, *P. sanguineus* y *P. coccineus*, a pesar de ello obtenemos un e-value de 0.0 con las cepas de *Pycnoporus sanguineus*, recordemos que el valor recomendado para que un resultado sea significativo es que sea lo más cercano a 0.

9. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los productos de PCR de las regiones ITS y de las secuencias parciales de β -tubulina. En cuanto al fragmento del gen *lcc3-1* se pudieron amplificar dos de los tres fragmentos con los oligos diseñados. Para el gen de la fenoxazinona sintasa no pudimos amplificar el fragmento ya que no se contaba con la cepa de *P. coccineus* como se había pensado en un inicio.
- En cuanto a las secuencias obtenidas, los resultados con los dos primeros marcadores arrojaban que posiblemente se contaba con una nueva variedad de la especie de *P. coccineus*, sin embargo, los resultados obtenidos del fragmento del gen *lcc3-1* nos indica que la cepa HEMIM-51 tiene mayor similaridad con la especie *P. sanguineus*.
- Es importante hacer la identificación de especímenes fúngicos con dos o más marcadores moleculares pues hasta ahora se ha demostrado que usando únicamente secuencias ITS o β -tubulina nos arrojan falsos positivos.

10. PERSPECTIVAS

- Hacer la identificación de las otras 8 cepas de la colección HEMIM usando los oligos para el fragmento del gen *lcc3-1*, el arroja resultados más concluyentes que los otros dos marcadores moleculares.

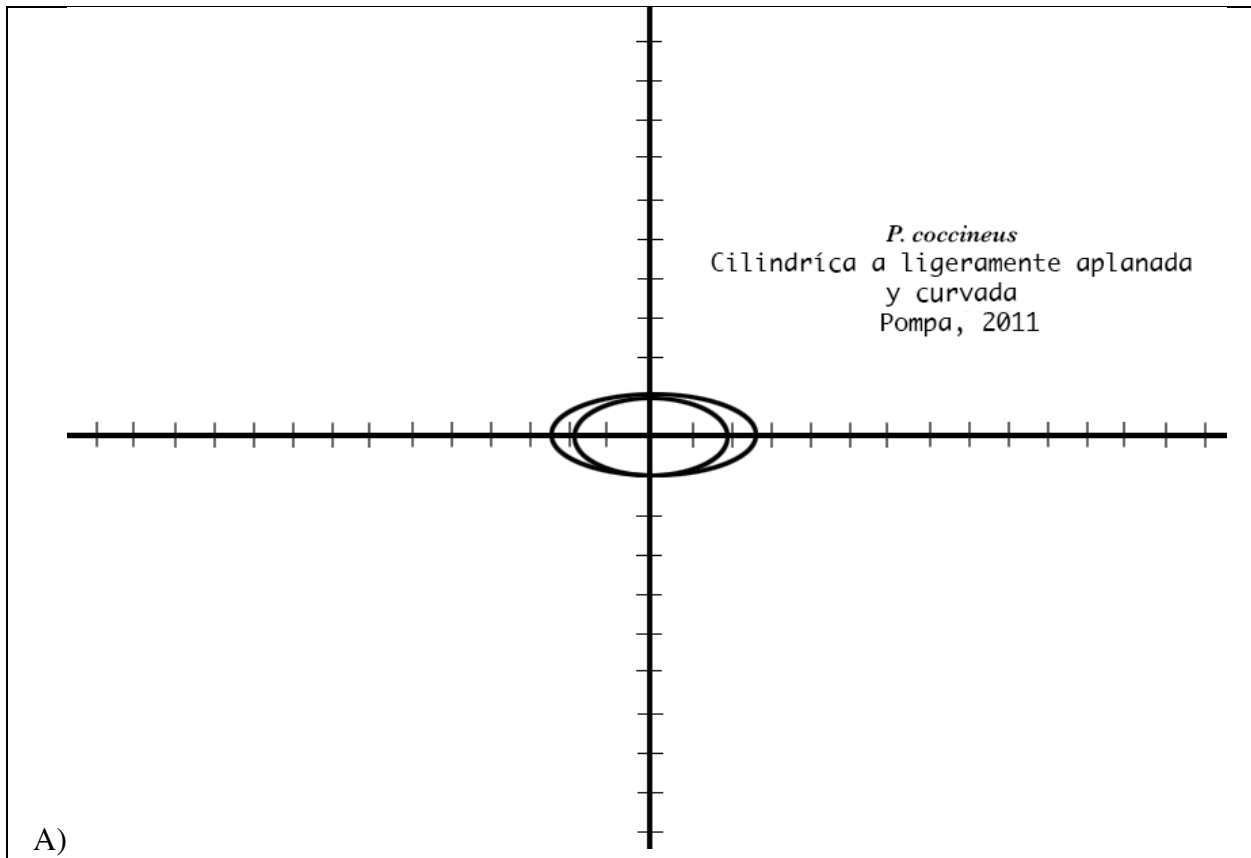
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

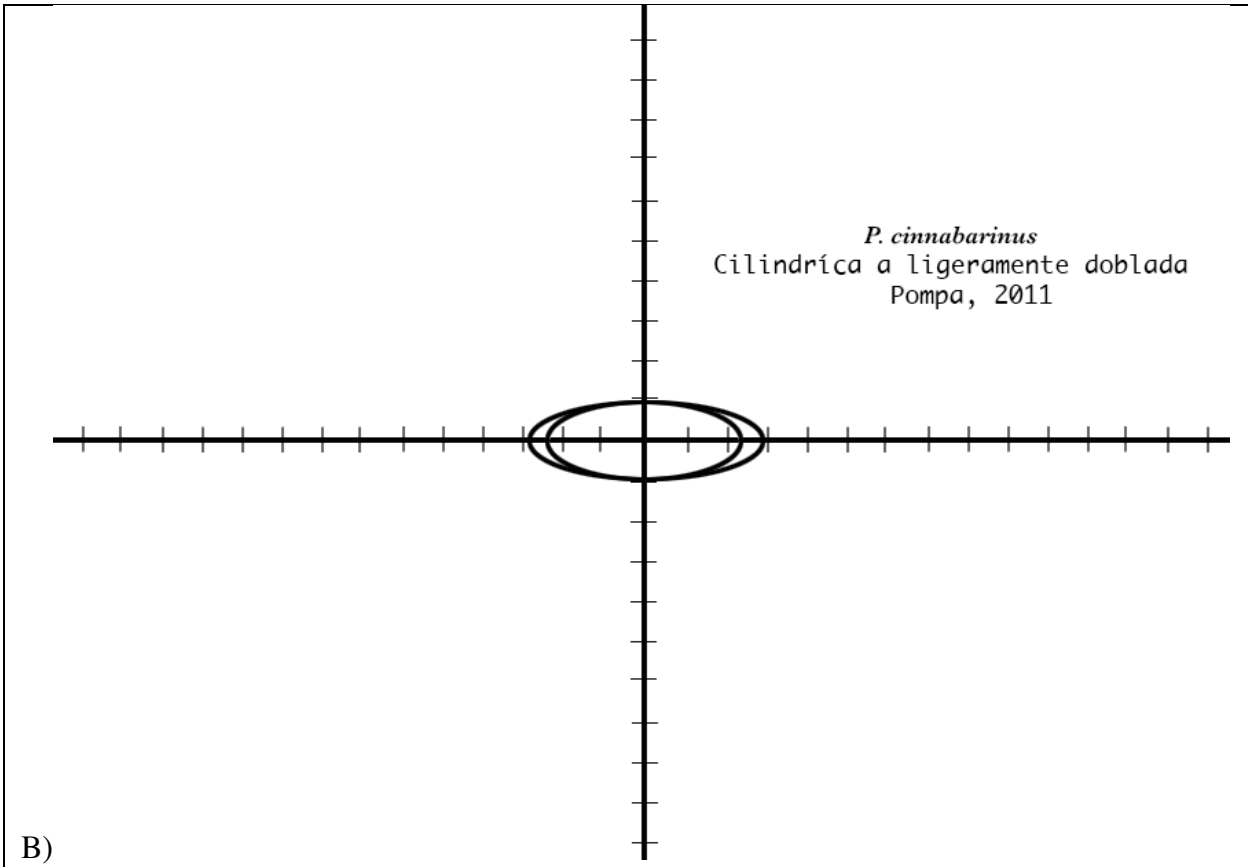
- Acosta-Urdapilleta, L., Alonso Paz, G. A., Rodríguez, A., Adame, M., Salgado, J., Montiel-Peña, M., Medrano-Vega y Villegas Villarreal, E. C. (2010). *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico. Eds. Martínez-Carrera, D., Curvetto, N., Sobal, M., Morales, P., y Mora, V.M. "Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el Siglo XXI." Capítulo 28, pp. 531-562. México.
- Balajee, S. A., Kano, R., Baddley, J. W., Moser, S. A., Marr, K. A., Alexander, B. D., ... & Brandt, M. E. (2009). Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *Journal of clinical microbiology*, 47(10), 3138-3141.
- Barry, C., Nayar, E y Begley, T. P. (1989). Phenoxazinone synthase: mechanism for the formation of the phenoxazinone chromophore of actinomycin. *Biochemistry*, 28 (15), pp. 6323-6333.
- Borderes, J., Costa, A., Guedes, A., y Tavares, L. B. B. (2011). Antioxidant activity of the extracts from *Pycnoporus sanguineus* mycelium. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54 (6), pp. 1167-1174.
- Bruyneel, F., Enaud, E., Billottet, L., Vanhulle, S., y Marchand-Brynaert, J. (2008). Regioselective synthesis of 3-hydroxyorthanilic acid and its biotransformation into a novel phenoxazinone dye by use of laccase. *European Journal of Organic Chemistry* (1), pp. 72-79.
- Caccio S, Camma C, Onuma M y Severini C. (2000) The beta-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *Int J Parasitol*, 30 (11), pp. 1181-5.
- Chanona-Gómez, F., Andrade Gallegos, H., Castellanos-Albores, J y Sánchez, J. E. (2007). Macromicetos del parque educativo Laguna Bélgica, Municipio de Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78, p. 369-381.
- Correa, E., Quiñones, W., Torres, D.C., Franco, A.E., Robledo, S., Vélez, F., Echeverry. (2005). Actividad leishmanicida de *Pycnoporus sanguineus*. *Actual. Biol.* 27: 39-42.
- Couturier, M., Navarro, D., Chevret, D., Henrissat, B., Piumi, F., Ruiz-Dueñas, F. J y Berrin, J. G. (2015). Enhanced degradation of softwood versus hardwood by the white-rot fungus *Pycnoporus coccineus*. *Biotechnology for biofuels*, 8: p. 216.
- Cruz Muñoz, R., Piña-Guzmán, A. B., Yáñez-Fernández, J., Toro, V. D., Bautista-Baños, S., y Villanueva Arce, R. (2015). Producción de pigmentos de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo sólido. *Agrociencia*, 49 (4), pp. 347-359.
- Da Silva, R. R., Pedezzi, R y Souto, T. B. (2017). Exploring the bioprospecting and biotechnological potential of white-rot and anaerobic Neocallimastigomycota fungi: peptidases, esterases, and lignocellulolytic enzymes. *Applied microbiology and biotechnology*, 101 (8), pp. 3089-3101.
- Dias, D. A. y Urban, S. (2009). HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Natural Product Communications*, Vol. 4 (4), pp. 489-498.32.
- Díaz, M. A. (2013). Caracterización molecular de cepas de *Pycnoporus sanguineus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Díaz-Godínez, G., Téllez-Téllez, M., Rodríguez, A., Obregón-Barbosa, V., Acosta-Urdapilleta, M., y Villegas, E. (2016). Enzymatic, antioxidant, antimicrobial, and insecticidal activities of *Pleurotus pulmonarius* and *Pycnoporus cinnabarinus* grown separately in an airlift reactor. *BioResources*, 11 (2), pp. 4186-4200.
- Esposito, E., Innocentini-Mei, L., Ferraz, A., Canhos, P y Duran, N. (1993). Phenoloxidases and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (UEC-2050 strain): applications. *Journal of Biotechnology* 29: pp. 219-228.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J y Eriksson, K-L. (1996). A fungal metabolite mediates oxidation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* 391: pp. 144-148.
- Eggert, C., Temp, U., y Eriksson, K-L. (1996). The lignolytic system of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 62: pp. 1151-1158.
- Fazio, F., Lionetto, L., Curto, M., Iacovelli, L., Copeland, C. S., Neale, S. A y Nicoletti, F. (2017). Cinnabarinic acid and xanthurenic acid: Two kynurenine metabolites that interact with metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 112, pp. 365-372.
- Froslev, T., Matheny, P y Hibbett, D. (2005). Lower level relationships in the mushroom genus *Cortinarius* (Basidiomycota, Agaricales): a comparison of RPB1, RPB2, and ITS phylogenies. *Mol Phylogenet Evol* 37: pp. 602-618.
- Guzmán, G. (1979). Identificación de los Hongos Comestibles, Venenosos y Alucinantes y Destruidores de la Madera. Limusa, México, D.F., p. 452

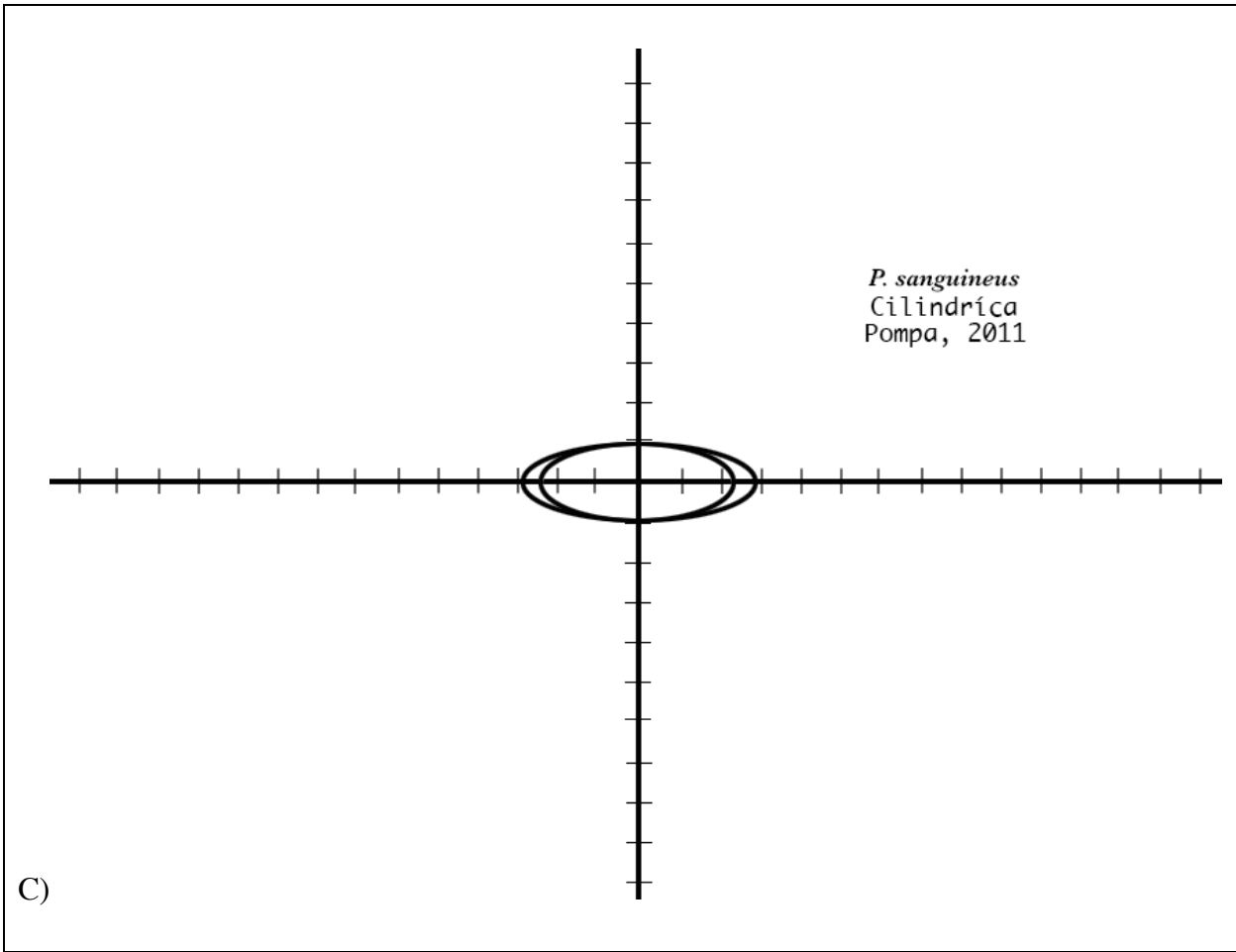
- Hatsch, D., Phalip, V y Jeltsch, JM. (2004). Use of genes encoding cellobiohydrolase-C and topoisomerase II as targets for phylogenetic analysis and identification of *Fusarium*. *Res Microbiol* 155: pp. 290–296.
- Hilden, K., Bortfeldt, R., Hofrichter, M., Hatakka, A y Lundell, T. (2008). Molecular characterization of the basidiomycete isolate *Nematoloma frowardii* b19 and its manganese peroxidase places the fungus in the corticioid genus *Phlebia*. *Microbiology* 154: pp. 2371–2379.
- Hwang, U. y Kim, W. (1999). General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology* 37(4): 215-228.
- Iracheta-Cárdenas, M., Rocha-Peña, M. A., Galán-Wong, L. J., Arévalo-Niño, K y Tovar-Herrera, O. E. (2016). A *Pycnoporus sanguineus* laccase for denim bleaching and its comparison with an enzymatic commercial formulation. *Journal of environmental management*, 177, pp. 93-100.
- INDEX FUNGORUM. [Revisado 15 de Julio del 2017] Recuperado de: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>
- Jalil, R., Kalil, M. S., Rahman, N. A., Hamid, A. A., y Ahmad, M. F. (2017). Seed culture conditions for high yield of cellulolytic enzymes production from *Pycnoporus sanguineus*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 21 (1), pp. 231-239.
- Järvinen, P., Nybond, S., Marcourt, L., Ferreira Queiroz, E., Wolfender, J. L., Mettälä, A y Tammela, P. (2016). Cell-based bioreporter assay coupled to HPLC micro-fractionation in the evaluation of antimicrobial properties of the basidiomycete fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Pharmaceutical biology*, 54 (6), pp. 1108-1115.
- Keller, U., Kleinkauf, H., y Zocher, R. (1984). 4-Methyl-3-hydroxyanthranilic acid-activating enzyme from actinomycin-producing *Streptomyces chrysomallus*. *Biochemistry*, 23(7), pp. 1479-1484.
- Kim, B. G., Yoo, Y. B., Kwon, S. T., & Magae, Y. (2001). Molecular Characterization of β -tubulin gene from *Pleurotus sajor-caju*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(10), 2280-2283.
- Kuhar, F., Castiglia, V., y Papinutti, L. (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos. *Revista Boletín Biológica*, 28 (7), pp. 11-18.
- Le Roes-Hill, M., Goodwin, C., y Burton, S. (2009). Phenoxazinone synthase: what's in a name?. *Trends in biotechnology*, 27(4), pp. 248-258.
- Lesage-Meessen, L., Haon, M., Uzan, E., Levasseur, A., Piumi, F., Navarro, D., Taussac, S., Favel, A y Lomascolo, A. (2011). Phylogeographic relationships in the polypore fungus *Pycnoporus* inferred from molecular data. *FEMS Microbiol Lett* 325, pp. 37-48.
- Li, K., Horanyi, P. S., Collins, R., Phillips, R. S., y Eriksson, K. E. L. (2001). Investigation of the role of 3-hydroxyanthranilic acid in the degradation of lignin by white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme and microbial technology*, 28(4), pp. 301-307.
- Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Herpoël-Gimbert, I., Sigoillot, J., Lessage-Meessen, L. (2011). Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 92, pp. 1129-1149.
- Lomascolo, A., Cayol, J., Roche, M., Guo, L., Robert, J., Record, E., Lesage-Meessen, L., Ollivier, B., Sigoillot, J y Asther, M. (2002). Molecular clustering of *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monokaryotic strains for laccase hyperproduction. *Mycol. Res.* 106 (10): pp. 1193–1203.
- Luley, C. (2006). Identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos en árboles urbanos. [Fecha de consulta: 19 de Marzo 2015] Recuperado de: <http://www.isahispana.com/treecare/articles/decay-fungi.aspx>.
- Levasseur A, Lomascolo A, Chabrol O, et al. The genome of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: a basidiomycete model with a versatile arsenal for lignocellulosic biomass breakdown. *BMC Genomics*. 2014;15:486. Published 2014 Jun 18. doi:10.1186/1471-2164-15-486
- Machuca, A y Ferraz, A. (2001). Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. *Enzyme and Microbial Technology* 29: pp. 386-391.
- Mei-Kuang Lu, Hsueh-O Lin, Feng-Lin Hsu y Yun-Lian Lin. (2010). Anti- Inflammatory principles of cultivated *Pycnoporus sanguineus*. *J Chin Med*, 21 (3,4), pp. 75-83.
- Nair, P. M y Vining, L. C. (1965). Isophenoxazine synthase apoenzyme from *Pycnoporus coccineus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, 96(2), pp. 318-327.
- Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., & Larsson, K. H. (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary bioinformatics*, 4, EBO-S653.

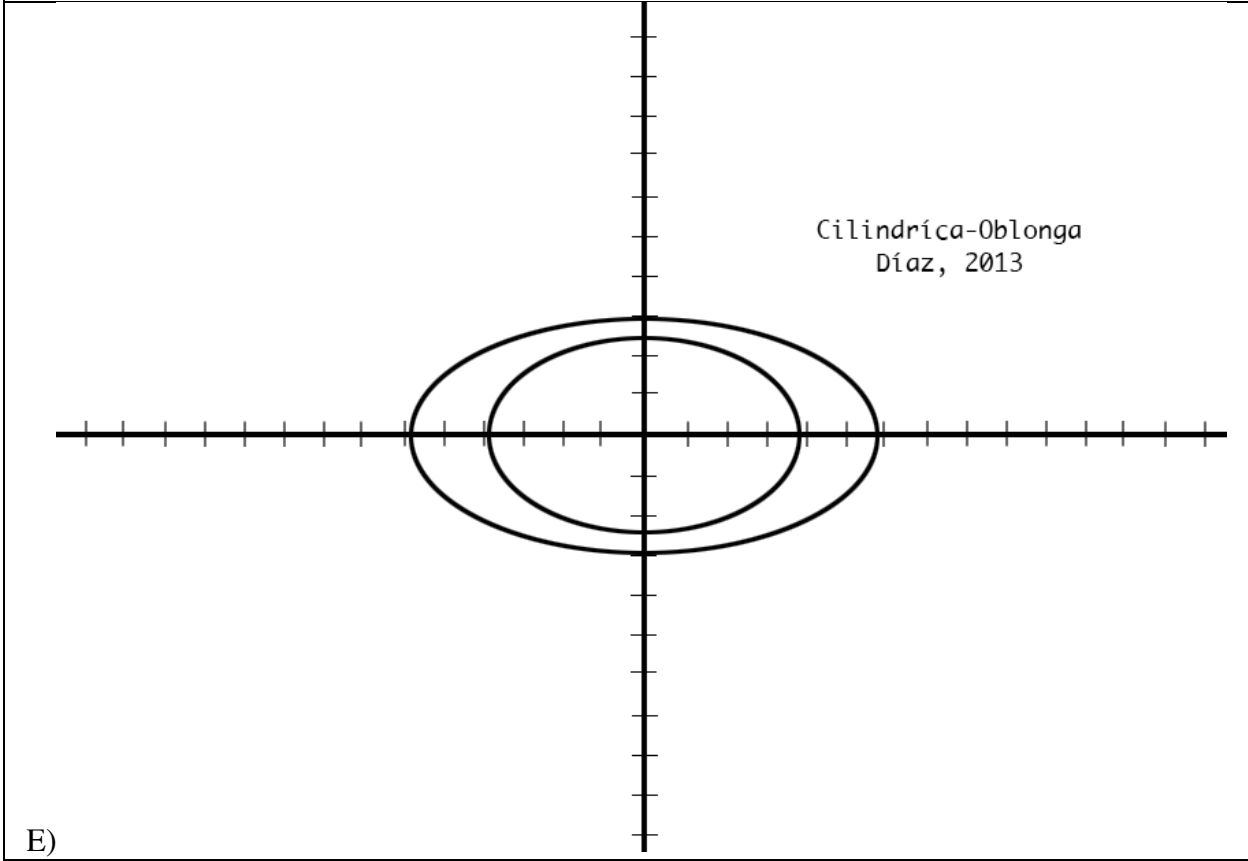
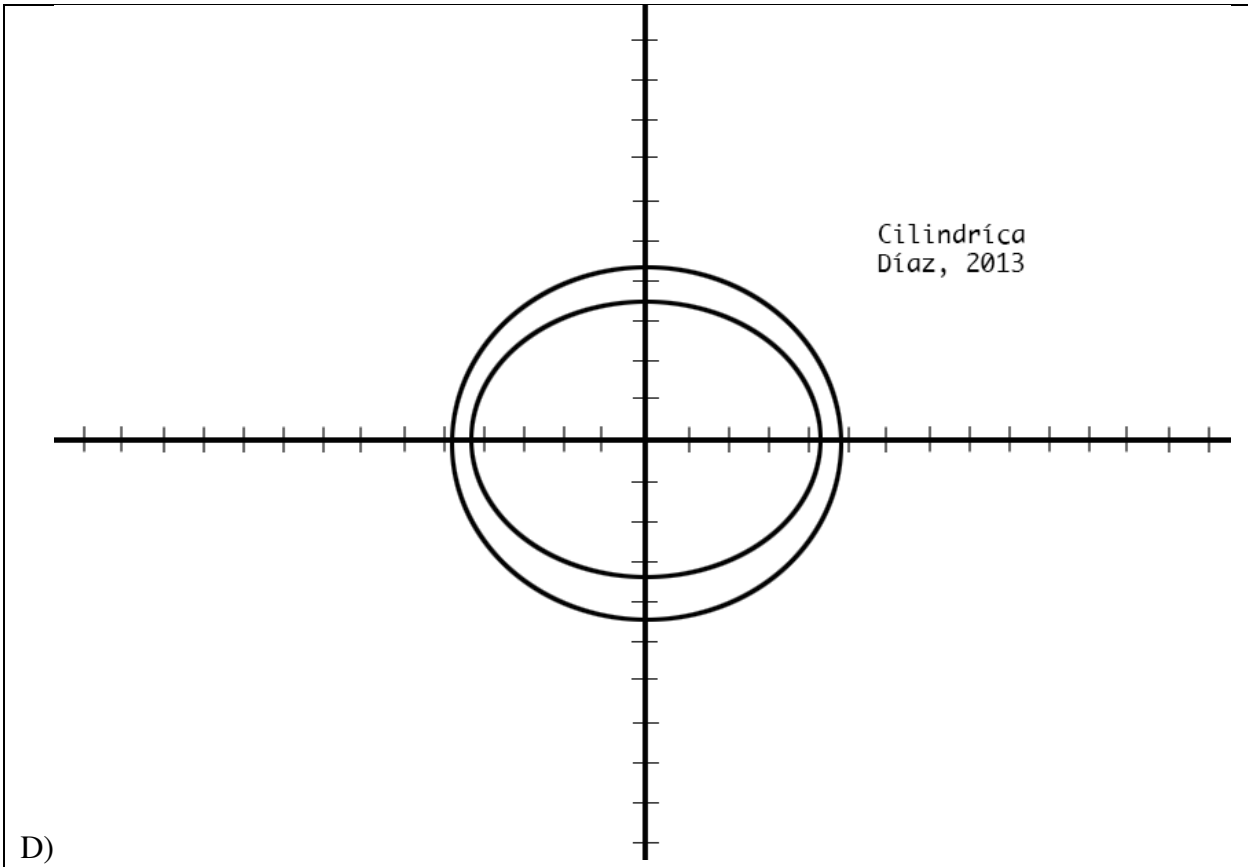
- Nobles, MK y Frew, BP. (1962). Studies in wood-inhabiting hymenomycetes. V. The genus *Pycnoporus* Karst. *Can J Bot* 40, pp. 987–1016.
- Plaza Lázaro, P. E. (2017). Valorización de bagazo de la industria cervecera mediante su transformación en biocombustibles avanzados: biobutanol. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/2461>
- Pérez-Silva, E., Aguirre-Acosta, E y Pérez-Amador, C. (1988). Aspectos sobre el uso y distribución de *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae) en México. *Rev. Mex. Mic.* 4: pp. 137-144.
- Perumal, V y Hashim, U. (2014). Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, 12(1): pp. 1-15.
- Pompa, A., Aguirre, E., Encalada, V., Jáuregui, A., Cifuentes, J y Valenzuela, R. (2011). Los Macromicetos del Jardín Botánico de ECOSUR “Dr. Alfredo Barrera Marín” Puerto Morelos, Quintana Roo. *Corredor Biológico Mesoamericano México*. Número 6, p. 93.
- Rodríguez-Delgado, M. M., Alemán-Nava, G. S., Rodríguez-Delgado, J. M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S. O., Barceló, D., Parra, R. (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 74, 21-45,
- Rojas, L. (2013). Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisorio con impacto en la agricultura. *Fitosanidad*, vol.17 (1), pp. 49-55.
- Rifat, A., Paramaswari, S., Noorlidah, A., Sekaran, M y Vikineswary, S. (2003). Optimization of laccase productivity during solid substrate fermentation of sago hampas by *Pycnoporus sanguineus*. *Malaysian Journal of Science*. 22: 35-42.
- Ryvarden, L. (1991). Genera of Polypores, nomenclature and taxonomy. *Synopsis Fungorum* 5. Fungiflora, Oslo.
- Ryvarden, L y Gilbertson, R. L. (1994). *Meripilus – Tyromyces*. *European Polypores*, Part 2. Fungiflora, Oslo.
- Stangarlin, J. R., Viecelli, C. A., Kuhn, O. J., Schwan-Estrada, K. R. F., Assi, L., Portz, R. L., y Meinerz, C. C. (2012). Plant Defense Enzymes Activated in Bean Plants by Aqueous Extract from *Pycnoporus sanguineus* Fruiting Body. In *Plant Science*. InTech.
- Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., y Kumar, A. (2011). Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme research*, 2011.
- Smânia, A., Marques, C. J. S., Smânia, E. F. A., Zanetti, C. R., Carobrez, S. G., Tramonte, R., y Loguercio-Leite, C. (2003). Toxicity and Antiviral Activity of Cinnabarin Obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytother. Res.* Vol 17, pp. 1069-1072.
- Télliz-Télliz, M., Villegas, E., Rodríguez, A., Acosta-Urdapilleta, M. L., O'Donovan, A y Díaz-Godínez, G. (2016). Mycosphere Essay 11: Fungi of *Pycnoporus*: morphological and molecular identification, worldwide distribution and biotechnological potential. *Mycosphere (special issue)*. Doi 10.5943/mycosphere/si/3b/3.
- Tomšovský, M., Kolari, M., Pazoutova, S y Homolka, L. (2006). Molecular phylogeny of European *Trametes* (Basidiomycetes, Polyporales) species based on LSU and ITS (nrDNA) sequences. *Nova Hedwigia* 82: pp. 269–280.
- Virtanen, H., Vehmas, K., Erho, T., y Smolander, M. (2014). Flexographic printing of *Trametes versicolor* laccase for indicator applications. *Packaging Technology and Science*, 27(10), 819-830.
- Vikineswary, S., Abdullah, N., Renuvathani, M., Sekaran, M., Pandey, A y Jones, E. B. G. (2006). Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agroresidues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology* 97: pp, 171-177.
- Viswanath, B. Rajesh, B. Janardhan, A. Praveen Kumar, A y Narasimha, G. (2014). Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation. *Hindawi Publishing Corporation Enzyme Research*. Volume 2014.
- Wang, Z., Binder, M., Dai, Y. C y Hibbett, D. S. (2004). Phylogenetic relationships of *Sparassis* inferred from nuclear and mitochondrial DNA and RNA polymerase sequences. *Mycologia* 96: pp. 1015–1029.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ, eds), pp. 315–322.
- Xu, F., Kulys, J. J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H. J. W., Abbate, E., Galinyte, V y Schneider, P. (2000). Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 66: pp. 2052-2056.

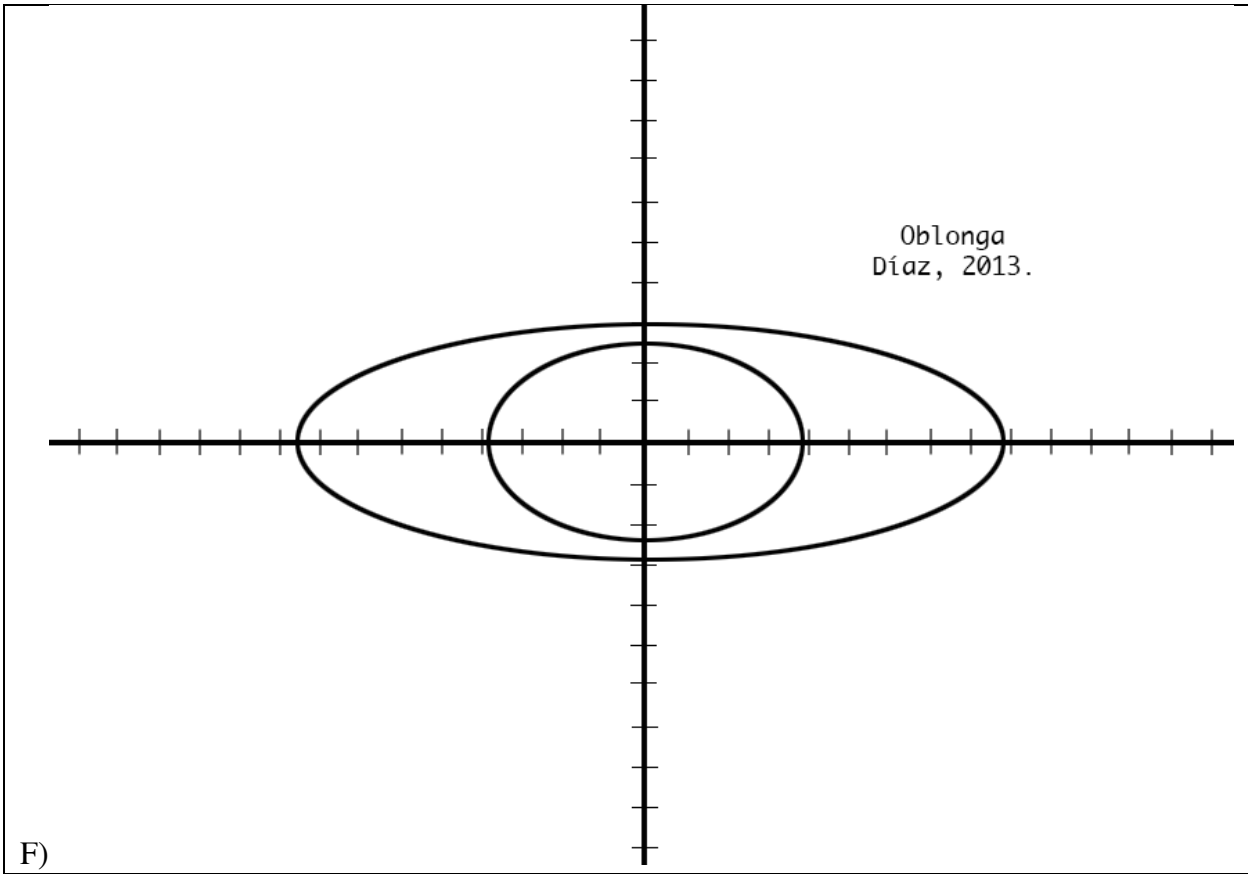
ANEXO
Anexo 1.













Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 2 de abril del 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor principal)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dra. Maura Téllez Téllez
M en C Ma. de Lourdes Acosta Urdapilleta

Tesis: "Identificación Molecular de cepas de *Pycnoporus* spp."

Alumno que la presenta a revisión: **LIZBETH CORONEL PASTOR**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 2 de abril del 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor principal)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dra. Maura Téllez Téllez
M en C Ma. de Lourdes Acosta Urdapilleta

Tesis: "Identificación Molecular de cepas de *Pycnoporus* spp."


Alumno que la presenta a revisión: **LIZBETH CORONEL PASTOR**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 2 de abril del 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor principal)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dra. Maura Téllez Téllez
M en C Ma. de Lourdes Acosta Urdapilleta

Tesis: "Identificación Molecular de cepas de *Pycnoporus* spp."

Alumno que la presenta a revisión: **LIZBETH CORONEL PASTOR**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 3 de abril del 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor principal)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dra. Maura Téllez Téllez
M en C Ma. de Lourdes Acosta Urdapilleta

Tesis: "Identificación Molecular de cepas de *Pycnoporus* spp."

Alumno que la presenta a revisión: **LIZBETH CORONEL PASTOR**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MAURA TELLEZ TELLEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 2 de Abril del 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor principal)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dra. Maura Téllez Téllez
M en C Ma. de Lourdes Acosta Urdapilleta

Tesis: "Identificación Molecular de cepas de *Pycnoporus* spp."

Alumno que la presenta a revisión: **LIZBETH CORONEL PASTOR**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

M en C MA. DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA