

VCH-FC
MAG-B
077
C.1

ESTUDIO GENETICO DE PYCNOPORUS SANGUINEUS VAR. OSORNINUS, UN
BASIDIOMICETE LIGNINOLITICO

Tesis

entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar
al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

por

SYLVIA ELOISA ORTIZ ZUÑIGA



Director de Tesis: Dr. Guido Pincheira V.

1991

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

SYLVIA ELOISA ORTIZ ZUÑIGA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética.

Director de Tesis
Dr. Guido Pincheira V.



Comisión informante de Tesis
Dra. Alicia Carrasco A.
Dra. Margarita Carú M.
Dra. Rosa Alba Lagos M.
Prof. Waldo Lazo A.



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

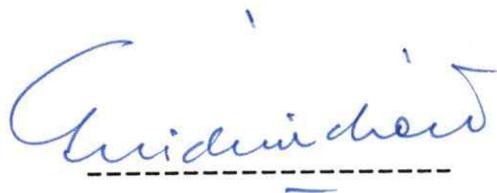
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

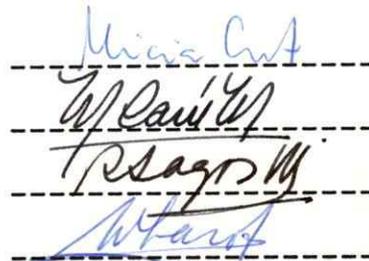
SYLVIA ELOISA ORTIZ ZUÑIGA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética.

Director de Tesis
Dr. Guido Pincheira V.



Comisión informante de Tesis
Dra. Alicia Carrasco A.
Dra. Margarita Carú M.
Dra. Rosa Alba Lagos M.
Prof. Waldo Lazo A.



A mis padres

AGRADECIMIENTOS

En el desarrollo de esta tesis he recibido el apoyo de gran cantidad de personas, las cuales han permitido que llegara al término de ella salvando diversos obstáculos.

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos al Dr. Guido Pincheira V., por dirigir esta tesis, por las facilidades otorgadas al buen desarrollo de mi actividad, por sus valiosos consejos.

A la Prof. Madeleine Lamborot Ch., por su constante preocupación en el buen logro de mi trabajo.

A la Dra. Alicia Carrasco, por sus valiosos consejos y constante estímulo.

A la Dra. Margarita Carú por darme a conocer sus experiencias en el trabajo con hongos.

Al Dr. Víctor Cifuentes G., por las facilidades otorgadas en el uso del material de laboratorio.

A la Dra. María Antonieta Valenzuela y a la Sra. Lucía Collados, por su valiosa ayuda en la realización de la electroforesis.

A mis compañeros de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

A Gittith Sánchez y Juan Venegas por su amistad.

A la Sra. Titina Cerda por su asistencia en la edición de este escrito.

Al Sr. Rafael Negrete por su excelente asistencia técnica.

En especial agradezco a mi esposo e hijos, por su paciencia, comprensión y cariño; a mis padres y hermanos, por su constante preocupación y contribución irrestricta al logro de mis propósitos.

Finalmente, doy gracias a todas las personas de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que me ayudaron y contribuyeron en mi formación.

INDICE DE MATERIAS

	página
AGRADECIMIENTOS	
INDICE DE MATERIAS	
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
ABREVIATURAS	
RESUMEN	
SUMMARY	
INTRODUCCION	1
PROPOSITOS DE LA TESIS	12
MATERIALES Y METODOS	13
I. Materiales	13
1.1 Material biológico	13
1.2 Reactivos químicos	14
II. Métodos	15
2.1 Medios de cultivo líquidos	15
2.2 Medios sólidos	15
2.3 Inoculación	16
2.4 Mantención de cepas	17
2.5 Crecimiento	17
2.6 Cruzamiento	18
2.7 Mutagénesis	18
2.8 Determinación de proteínas	19

	página
2.9 Preparación de extractos crudos	20
2.10 Purificación de lacasa	20
2.11 Determinación de actividad lacasa	21
2.12 Cinética de actividad lacasa	21
2.13 Electroforesis de proteínas	22
2.14 Pruebas para fenoloxidasas	23
 RESULTADOS	 25
3.1 Características morfológicas de <u>Pycnopus sanguineus</u> var. <u>osorninus</u>	 25
3.1 Ciclo de vida de <u>Pycnopus sanguineus</u> var. <u>osorninus</u>	 29
3.3 Fenotipo de <u>P. sanguineus</u> en diferentes condiciones de cultivo	 33
3.4 Obtención y cruzamientos de cepas monospóricas de <u>Pycnopus</u>	 44
3.5 Mutagénesis de <u>Pycnopus sanguineus</u> var. <u>osorninus</u> con luz ultravioleta.....	 50
3.6 Test de placa para fenoloxidasas	56
3.7 Caracterización molecular de la actividad fenoloxidásica	 58
 DISCUSION	 64

página

PROYECCIONES	73
REFERENCIAS	76
APENDICE 1	84
APENDICE 2	85
APENDICE 3	86
APENDICE 4	87

LISTA DE TABLAS

	página
TABLA 1. Cruzamiento de las cepas monospóricas de <u>Pycnopus sanguineus</u> var. <u>osorninus</u>	48
TABLA 2. Cruzamientos de cultivos monospóricos de dos especies de <u>Pycnopus</u>	49
TABLA 3. Sobrevida relativa de conidios de <u>Pycnopus</u> a la radiación UV	52
TABLA 4. Cepas mutantes obtenidas	53
TABLA 5. Descendencia de cruzamientos entre mutantes y la cepa silvestre 470	57
TALBA 6. Test de placa para fenoloxidasas	58

LISTA DE FIGURAS

	página
FIGURA 1. Basidiocarpos de especies del género <u>Pycnopus</u>	26
FIGURA 2. Basidiocarpo de <u>Pycnopus sanguineus</u> var. <u>osorninus</u>	27
FIGURA 3. Detalle de la cara inferior del basidiocarpo de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u>	28
FIGURA 4. Preparación microscópica del himenóforo de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u>	30
FIGURA 5. Hifas generativas del micelio de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u> con fíbulas ..	31
FIGURA 6. Trozo de tronco de <u>Notophaqus dombeyi</u> invadido por hifas de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u>	32
FIGURA 7. Ciclo de vida de <u>Pycnopus sanguineus</u> var. <u>osorninus</u>	34
FIGURA 8. Efecto de diferentes temperaturas en el crecimiento lineal de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u>	35

FIGURA 9. Efecto de las diferentes temperaturas en el crecimiento lineal de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u> (c. 470) y de <u>P. cinnabarinus</u> (c. 450)	36
FIGURA 10. Efecto del pH del medio de cultivo en el crecimiento lineal de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u>	37
FIGURA 11. Micelio de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u> con clamidosporas	39
FIGURA 12. Cultivos de <u>P. sanguineus</u> y de <u>P. cinnabarinus</u>	40
FIGURA 13. Micelio de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u> con conidios	42
FIGURA 14. Basidiocarpo de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u> obtenido en cultivo de laboratorio	43
FIGURA 15. Efecto del ácido tánico y sorbosa del medio de cultivo en el crecimiento lineal de la cepa 470	45
FIGURA 16. Efecto de D-L-p fluorofenilalanina en el crecimiento lineal de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u>	46

FIGURA 17. Crecimiento en peso seco de la cepa silvestre y la mutante auxotrófica para adenina de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u> .	54
FIGURA 18. Colonias de basidiosporas de la cepa 470 fenotipo silvestre y del fenotipo fenoloxidasasa negativa	55
FIGURA 19. Actividad enzimática de lacasa extracelular detectada durante el cultivo de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u>	60
FIGURA 20. Proteínas extracelulares totales detectadas durante el cultivo de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u> y de dos mutantes fenoloxidasasa negativas (pox_1^- y pox_4^-)	61
FIGURA 21. Electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas extracelulares de <u>P. sanguineus</u> var. <u>osorninus</u> y de la mutante fenoloxidasasa negativa pox_1^-	63

ABREVIATURAS

BSA	:	Seroalbúmina de bovino
DEAE	:	Dietilaminoetil
Da	:	Dalton
EDTA	:	Acido etilendiaminotetracético
HPLC	:	Cromatografía líquida de alta eficiencia
Kb	:	Kilobase
Mb	:	Megabase
SDS	:	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	:	N,N, N', N'-tetrametil etilendiamina

RESUMEN

Pycnoporus sanguineus var. osorninus, hongo filamentoso que habita en los bosques nativos del sur de Chile, es un Hymenomycete de la familia Polyporaceae que produce pudrición blanca en la madera.

El estudio de su ciclo de vida revela abundante producción de artroconidios uninucleados y binucleados a partir de hifas fértiles. Su cultivo en medios líquidos con sulfato de amonio, como fuente de nitrógeno, incrementa notoriamente la producción de clamidosporas. Los basidiocarpos obtenidos en cultivos de laboratorio producen basidiosporas en abundancia.

A partir de estas fructificaciones es posible obtener micelios monospóricos, los cuales, cruzados entre sí, permitieron la identificación de los polos sexuales de esta cepa. Su forma heterotálica tetrapolar depende de dos loci determinantes del tipo de apareamiento.

Mediante el tratamiento de conidios con luz ultravioleta se obtuvieron diferentes mutantes, tres auxotróficos, uno de crecimiento colonial y cinco con diferencias en su actividad de fenoloxidasas.

Después de reiterados cruzamientos de estas mutantes con la cepa silvestre, se seleccionaron colonias que presentaban el fenotipo mutante, el cual es estable genotípica y fenotípicamente.

La mutación que afecta la producción de fenoloxidasas extracelulares presenta efectos pleiotrópicos que afectan la cinética de excreción de proteínas.

Ensayos de actividad de lacasa in situ, así como también la cinética de actividad de lacasa intracelular y extracelular en la cepa silvestre y en una de las cepas mutantes para fenoloxidasa, sugieren que la mutación estaría afectando a esta enzima.

SUMMARY

Pycnoporus sanguineus var. osorninus, a filamentous fungus inhabiting native forests in southern Chile, is a Hymenomycete of the Polyporaceae family that participates in the process of formation of white rot wood.

The study of its life cycle shows an intense production of uninucleate and binucleate arthroconidia from fertile hyphae. The production of chlamydospores increase notoriously in liquid media with ammonium sulphate as a nitrogen source. Fructification of cultures held in laboratory produced abundant basidiospores.

Monosporic mycelia were obtained from these fruitbodies. The mating of them, allowed the determination of the sexual poles of this strain.

The heterothallic and tetrapolar characters depend of two loci controlling the mating-type of this organism.

Irradiation of conidia with ultraviolet light allowed the obtention of different mutants: auxotrophic, colonial growth and deficient in phenoloxidase activities.

The mutant phenotypes, were selected after consecutive matings of the mutants with the wild type strain. The mutant strains exhibit genotypic and phenotypic stability.

The mutation affecting the production of extracellular phenoloxidases has pleiotropic effects, which is made evident in a different kinetic for protein excretion.

Tests of enzymatic activity of laccase in situ as well as the kinetic of intracellular and extracellular laccase activity in the wild type strain and in one of these mutant strains suggest that the mutation would affect this enzyme.

INTRODUCCION

La pared secundaria de las células vegetales de las plantas superiores está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. La lignificación protege a la célula vegetal de la penetración de microorganismos patógenos, constituyendo así un mecanismo de resistencia a enfermedades (Bell, 1981).

La lignina constituye entre el 22% y el 34% del material sólido de la madera (Walker, 1975). Es indudablemente uno de los polímeros más resistentes a la descomposición microbiana y uno de los más complejos estructuralmente. En efecto, la lignina es un polímero aromático, formado por tres compuestos fenil propano. Estos son los alcoholes coumarilo, coniferilo y sinapilo (Kirk, 1971).

En la naturaleza, la degradación de la lignina es un proceso altamente oxidativo y lento, en el que participan diversas especies de hongos (Kirk, 1984). Estos hongos excretan diferentes enzimas al medio extracelular, no habiéndose aclarado aún el rol que cumple cada una de ellas en el proceso de despolimerización de la lignina.

Entre las enzimas que juegan un rol en la biodegradación de lignina se mencionan: ligninasas, peroxidasas dependientes de Mn, enzimas que oxidan fenol y enzimas que producen H_2O_2 .

Diversos autores consideran que las fenoloxidasas: lacasa, catecoloxidasa y peroxidasas, excretadas por los basidiomicetes de pudrición blanca son enzimas involucradas en la ligninólisis (Arora et al., 1985; Hudson, 1986; Sannia et al., 1986; Kirk et al., 1986; Tien et al., 1980; Otjen et al., 1986). No obstante la participación específica de estas enzimas en la degradación de la lignina es, aún, poco clara.

Distintos hongos difieren en los tipos de enzimas que producen. Así por ejemplo Phanerochaete chrysosporium, un basidiomicete usado en numerosos estudios relacionados con degradación de lignina, degradación de celulosa y aplicaciones de bioprocésamiento de lignocelulosa (Kirk et al., 1986; Tien et al., 1987), produce peroxidasas y glioxal-oxidasa, pero no produce lacasa.

Ander et al. (1977), clasifican 25 diferentes especies de hongos de pudrición blanca en dos grupos. En el primer grupo incluyen, entre otros, a Sporotricum pulverulentum y Phanerochaete sp., los cuales se caracterizan por producir altos niveles de endo-1,4 B glucanasa y celobiosa oxidoreductasa cultivados en celulosa, y por producir un bajo nivel de fenoloxidasa cultivados en madera de pino.

En otro grupo se incluyen Pleurotus ostreatus y Pycnoporus cinnabarinus, los cuales producen bajos niveles de endo 1,4 B glucanasa y celobiosa quinona oxidoreductasa cultivados en celulosa y altos niveles de fenoloxidasa cultivados en madera de pino.

Por otro lado, en presencia de extracto de malta P. cinnabarinus puede degradar un 12,5% de lignina de madera de pino sin pérdida de celulosa o manano.

ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA DEGRADACION DE LIGNINA

La degradación de lignina es un proceso multienzimático y su control genético permanece aún poco conocido.

La ligninasa de Phanerochaete chrysosporium fue descubierta usando compuestos modelos diméricos para probar actividad enzimática (Tien y Kirk, 1983). Inicialmente, fue aislada por electroforesis en gel nativo de poliacrilamida. En presencia de H_2O_2 la enzima despolimeriza parcialmente lignina metilada, liberando aldehídos aromáticos. Esta enzima purificada contiene un grupo prostético protoheme y tiene un peso molecular de 42.000 Da. Es una glicoproteína, con alrededor de 15% de carbohidratos (xilosa, manosa y galactosa). Kirk et al. (1986) purificaron seis ligninasas a partir del líquido extracelular de P. chrysosporium usando HPLC de intercambio aniónico. Aún no está claro si estas enzimas representan productos génicos separados o son modificaciones post-transcripcionales o traduccionales de uno o varios genes.

Kersten et al. (1985) y Hammel et al. (1986) han establecido la simplicidad de la oxidación de sustratos

aromáticos por ligninasa mediante la producción de radicales catiónicos inestables, los cuales posteriormente participarían en una variedad de reacciones no enzimáticas.

Algunas peroxidadasas son dependientes de manganeso y parecen funcionar como enzimas que oxidan fenol y producen H_2O_2 .

La mayoría de los hongos de pudrición blanca producen lacasa (p-difenol oxígeno oxidoreductasa) extracelular. Esta enzima cataliza la oxidación de fenoles a radicales fenoxi utilizando oxígeno molecular; oxida monofenoles, (en algunos casos p-difenoles) ortodifenoles, trifenoles y ácido ascórbico. Lacasa, aparentemente aparte de participar en la degradación de lignina, tiene un rol en la fructificación sexual.

Lacasa es una glicoproteína inestable a pH alcalino, contiene apreciables cantidades de aminoácidos sulfurados, como cisteína y átomos de cobre en su molécula. Como tal es inhibida por quelantes de cobre y también por cianida, azida y EDTA.

El peso molecular de lacasas fúngicas varía entre 56.000 para Botrytis; 67.000 para Lactarius; 63-65.000 para Russula; 60-65.000 para la principal lacasa de Polyporus; 107-117.000 para Aspergillus (Mayer, 1978). Estos datos sugieren que las lacasas son un grupo heterogéneo de glicoproteínas, que tienen una unidad estructural básica, con un peso molecular de 50.000-70.000 Da, lo cual puede sufrir agregaciones para formar moléculas más grandes. La diferencia en el peso molecular preciso reportado

para una lacasa dada puede ser atribuida a diferencias específicas y a diferencias en el largo de la cadena de carbohidrato que forma parte de ella.

Catecoloxidasa (o-difenol oxígeno oxidoreductasa monofenol monooxigenasa), es otra fenoloxidasa de basidiomicetes de pudrición blanca. También es una enzima cóprica con actividad cresolasa y catecolasa.

Catecoloxidasa y lacasa pueden ser distinguidas en base a varios criterios, entre ellos la oxidación de p-difenoles o p-diaminas, respuesta a CO y respuesta a fenilhidrazina (Mayer et al., 1978).

En cuanto al H_2O_2 requerido para la actividad de la ligninasa puede ser suministrada por varias diferentes oxidasas, tales como: glucosa-1-oxidasa, peroxidasa Mn, glioxal oxidasa, etc.

ASPECTOS GENETICOS EN BASIDIOMICETES DEL PROCESO DE DEGRADACION DE LIGNINA

Los hongos que tienen poder degradador de lignina son, en su mayoría, basidiomicetes.

La mayoría de los basidiomicetes son genéticamente haploides. Esta característica les confiere ciertas ventajas para estudios genéticos sobre otros organismos diploides, pues cada gen es potencialmente capaz de expresarse en el fenotipo. En

algunos basidiomicetes se forman grandes cantidades de esporas asexuadas, las cuales pueden ser usadas para seleccionar mutaciones espontáneas o inducidas.

Reproducción asexuada en basidiomicetes

Las hifas pueden fusionarse entre sí, facilitando el intercambio de núcleos para formar heterocariones. Estos pueden ser usados para realizar pruebas de complementación genética. Las fusiones de las hifas también llevan a un intercambio de citoplasmas produciendo heteroplasmones que hacen posible estudiar interacciones entre determinantes genéticos extranucleares.

Fusiones nucleares somáticas ocurren con baja frecuencia en los heterocariones. Micelios diploides de Schizophyllum commune (Mills et al., 1969; Parag et al., 1966) y Coprinus spp (Casselton, 1965; Day et al., 1969) han sido recuperados de heterocariones formados por núcleos haploides, usando técnicas selectivas en el laboratorio.

Los núcleos diploides resultantes desarrollan, ocasionalmente, recombinaciones mitóticas, pudiendo revertir a la condición haploide a través de formas de mitosis alternadas. Estos núcleos haploides resultan ser recombinantes genéticos.

Reproducción sexuada en basidiomicetes

Muchos hongos con sus micelios difusos y multitudes de órganos sexuales microscópicos tienen la capacidad de mantener su sexualidad en ellos mismos. De este modo, un solo micelio produce órganos sexuales que se fertilizan unos con otros. Esta condición se describe como homotalismo.

Los basidiomicetes han evolucionado un control genético de la reproducción sexual a través del desarrollo de tipos de apareamiento que incorporan genes de incompatibilidad sexual. Solamente micelios de diferentes tipos de apareamiento son sexualmente compatibles. Este fenómeno se conoce como heterotalismo.

En Rhodosporidium toruloides la conjugación entre células haploides de dos tipos compatibles, a y A, es inducida por feromonas difusibles secretadas por las células de tipo A, entre ellas la rhodotorucina A (Miyakawa et al., 1986).

En Tremella mesenterica, la inducción de formación de tubos de conjugación en células compatibles es inducida por los péptidos Tremerogen A-10 y a-13 (Sakagami et al., 1981).

Estudios en otras especies de basidiomicetes parecen también indicar la mediación de sustancias químicas en la inducción de la conjugación. Estudios de fusión y de incompatibilidad somática en Phanerochaete velutina llevan a pensar en tal posibilidad. En esta especie, la incompatibilidad en los sitios de fusión entre las hifas se expresa en la muerte de las células involucradas en

la fusión y la de células contiguas. Si existe compatibilidad, se produce el intercambio nuclear, agregación y división nuclear en la región del poro antes de formarse un nuevo septo (Ainsworth et al., 1986; Aylmore et al., 1986).

El estado vegetativo natural en los basidiomicetes es el dicarion, una asociación estable de dos núcleos haploides en cada célula, con una posterior cariogamia en el basidio, seguida rápidamente por la meiosis.

El criterio usual para distinguir compatibilidad en basidiomicetes al cruzar cepas monocarióticas es la presencia o ausencia de células dicarióticas y de fíbulas (Fincham et al., 1971; Coates et al., 1985).

En los basidiomicetes tetrapolares el factor A regula la formación de fíbulas. El control de la migración nuclear se asigna al locus B, lo cual ocurre cuando los alelos son diferentes.

Los factores A y B poseen distintas funciones reguladoras en la secuencia de eventos que conducen a la morfogénesis sexual. Schizophyllum, Coprinus y otros basidiomicetes han sido sometidos a mutagénesis, obteniéndose mutantes que impiden la migración nuclear, o el cruzamiento de núcleos, o inducen la formación de fíbulas. En Schizophyllum commune se reconoce un alelo dik que en estado silvestre (dominante) retarda la fusión nuclear hasta que los basidios están formados.

El alelo recesivo dik⁻ permite la fusión nuclear inmediatamente después de la fusión hifal (Fincham et al., 1971; Burnett, 1975).

Mutantes A mut y B mut aislados en S. commune llevan a la conversión de cepas autoincompatibles a autocompatibles. Estas cepas mutantes A mut B mut no solamente se parecían a los dicariones en varias características morfológicas sino eran también sexualmente fértiles (Swamy et al., 1984).

Con el fin de identificar los productos de A y B se han realizado estudios serológicos y electroforéticos. Los resultados muestran un cambio profundo en el contenido de proteínas de las células homocariones compatibles y el dicarión que forman al cruzarse (Swamy et al., 1985).

En Schizophyllum commune se han descrito 288 clases de factores sexuales A y 81 clases de factores sexuales B (Burnett, 1975). En Uredinales la reacción sexual tiene lugar entre órganos sexuales bien diferenciados. En los Holobasidiomicetes y Ustilaginales hay solamente hifas indiferenciadas o células únicas involucradas en la reacción sexual.

En S. commune los monocariones coisogénicos que generan un dicarión no producen lacasa. En cambio, sí lo hacen estos últimos (De Vries et al., 1986). Por otro lado, el proceso morfogenético que ocurre en el paso desde monocarión a dicarión, está acompañado por la aparición de un limitado número de mRNA específicos del dicarión (Wessels et al., 1987).

Varios mutantes auxotróficos de P. chrysosporium, de los cuales la mayoría son auxotróficos para aminoácidos y cofactores, han sido aislados y usados en estudios de complementación. Se ha logrado la fusión de protoplastos y la regeneración de micelios en varias cepas (Gold et al., 1983). También se han recuperado cepas marcadoras que llevan múltiples mutaciones de heterocariones que fructifican.

Comparaciones de mRNAs traducidos in vitro de micelios ligninolíticos y no ligninolíticos muestran diferencias en 40-50 especies de polipéptidos, resueltos en geles unidimensionales (Haylock et al., 1985).

El análisis de DNA cromosómico de P. cinnabarinus mediante electroforesis de campo pulsado, revela la presencia de cuatro bandas densitométricamente diferentes. Según esto, el tamaño del genoma de Pycnoporus oscilaría entre 16-20 Mb (Cifuentes et al., 1990).

ASPECTOS TAXONOMICOS DE PYCNOPORUS

En una prospección realizada en una zona de clima oceánico temperado en el sur de Chile, en un área de bosque nativo en la provincia de Osorno, se encontraron carpóforos de Pycnoporus. Estos estaban adheridos a troncos de Nothophagus dombeyi (coigüe). Posteriormente, se encontraron carpóforos similares en un bosque nativo de Temuco, 272 km al norte de Osorno (Burgos y Ortíz, 1988).

Pycnoporus es un basidiomicete de la familia Polyporaceae (Stalpers, 1978), caracterizado como Aphylophoral de himenóforo tubular, sistema hifal trimítico, esporas lisas, generalmente no amiloides.

Los estudios morfológicos y los de interfertilidad de Nobles y Frew (1962) aportaron evidencias para distinguir tres especies de poliporáceas rojas, dando a la vez su distribución geográfica: Pycnoporus cinnabarinus (Jac. ex Fr.) Karst, en zonas templadas del hemisferio norte; Pycnoporus coccineus (Fr.) Bond. & Sing., en zonas templadas del hemisferio sur y países que bordean los océanos Indico y Pacífico y Pycnoporus sanguineus (L. ex Fr.) Murr. en regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. Para Sudamérica se señala la presencia exclusiva de P. sanguineus, con registros en Brasil, Uruguay y Argentina. Sin embargo, en 1917 C.G. Lloyd había determinado la presencia de Polystictus cinnabarinus, sinónimo de Pycnoporus cinnabarinus en Chile.

PROPOSITOS DE LA TESIS

El objetivo general de este trabajo es identificar algunos de los genes involucrados en el proceso de degradación de lignina realizada por una variedad de Pycnoporus sanguineus colectado en el bosque nativo de la zona de Osorno (Chile).

Los objetivos específicos son:

1. Determinar las condiciones de cultivo en laboratorio para la obtención de una tasa de crecimiento miceliar óptima de Pycnoporus sanguineus var. osorninus.
2. Estudiar la biología de la variedad chilena Pycnoporus mencionada, en especial la identificación de sus polos sexuales, sus mecanismos de reproducción y sus características favorables para el análisis genético.
3. Obtención de marcadores genéticos mediante la inducción de diferentes tipos de mutantes, en especial variantes con actividad fenoloxidasa modificada con respecto a la existente en cepas silvestres o estándar.
4. Estudio genético de algunos de estos mutantes, en especial los aspectos moleculares que afectan la actividad de fenoloxidasas.

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES

1.1 Material biológico

Pycnoporus sanguineus var. osorninus. Las cepas heterocarióticas 470, 472 y 473 derivan de carpóforos colectados en Osorno, Chile; la cepa heterocariótica 479 deriva de un carpóforo colectado en Temuco, Chile. Los cultivos monospóricos derivados se designan por 470-x, 472-x, 473-x y 479-x, siendo x: 1, 2, ..., n.

Pycnoporus cinnabarinus (Cepa 450, heterocariótica). Cultivo puro obtenido del laboratorio del Dr. Angel Martínez, Centro de Biología Celular, Madrid, España. Los cultivos monospóricos derivados se designan 450-x, con x: 1,2,..., n.

Pycnoporus sanguineus (Cepa 940, procedente de Uruguay; Cepa 950 procedente de Argentina, ambas heterocarióticas). Cultivos obtenidos del laboratorio del Dr. Jorge Wrigth, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Los cultivos monospóricos derivados se designan 940-x y 950-x, siendo la representación de x: 1, 2, ..., n.

Todas las cepas monospóricas provienen de basidiosporas producidas en cultivos en el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

1.2 Reactivos químicos

De Sigma Chemical Co., St. Louis, USA, se obtuvo: acrilamida, adenosina, arginina, ácido aspártico, ácido diamino pimélico, asparagina, alanina, fenilalanina, D-L-p fluorofenilalanina, glutamina, guanosina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, tirosina, treonina, triptofano, N-N-metilen bis-acrilamida, Temed, Tris, valina, uracilo.

Albúmina de suero de bovino, estándar de peso molecular MW-SDS Blue Kit.

De Merck, Darmstadt, Alemania, se obtuvo: ácido acético, ácido clorhídrico, ácido ortofosfórico, ácido tánico, acetato de sodio, metanol, sulfato de amonio, peroxodisulfato de amonio, azul brillante de Coomassie, azul de bromofenol, azul de lactofenol en solución, cloruro de calcio granulado, sulfato de sodio, peróxido de hidrógeno, sulfato ferroso heptahidrato, glicina, glicerol, D-glucosa, guayacol, sulfato de magnesio heptahidrato, sulfato de manganeso monohidrato, 2-mercaptoetanol, fosfato ácido de potasio, fosfato diácido de potasio, pirogalol, 1-naftol, sacarosa, L-sorbose, carbonato de sodio, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, fosfato ácido de sodio, nitrato de sodio, clorhidrato de tiamina, agar-agar, arena de mar purificada, caseína hidrolizada, extracto de malta, DEAE-Sepharose, reactivo Folin.

Productos alimentarios comerciales: harina de maíz, almidón de maíz. Aserrín de pino.

II. METODOS

Medios de Cultivo

2.1 Medios líquidos

1. Extracto de malta 1,5%, pHs 4,7; 4,2; 3,4.
2. Medio mineral basal consistente en (g/l): KH_2PO_4 - 2,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,4, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3, CaCl_2 - 0,3, en (mg/l) $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 5,0, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ - 1,6, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,5, CoCl_2 - 3,6; adicionado con 30 ml de una solución de caseína hidrolizada (10 g/l), clorhidrato de tiamina (100 mg/l) y glucosa o sacarosa (20 g/l).
3. Medio mineral basal modificado lleva NaNO_3 - 2 g/l a pH 4,1, adicionado con sacarosa 20 g/l en reemplazo de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

2.2 Medios sólidos

- a. Extracto de malta 1,5%, agar 1,5% a los siguientes pH ajustados con H_3PO_4 : 3,2, 3,7, 4,2, 5,2, 5,7.
- b. Extracto de malta 1,5%, agar 1,5% a los siguientes pH ajustados en buffer fosfato de sodio: 5,7, 6,2, 6,7, 7,2.
- c. Extracto de malta 3,0%, harina de maíz 48,0%, almidón de maíz 16%, aserrín de pino 8,0%.
- d. Aserrín de pino pH 4,8 al 30%.
- e. Extracto de malta 1,5%, agar 1,5%, ácido tánico 0,05%.
- f. Extracto de malta 1,5%, agar 1,5%, sorbosa a las concentraciones 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%.

g. Medio mineral basal, glucosa 4%, vit. B y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, D-L-p fluorofenilalanina a las concentraciones de ($\mu\text{g/ml}$): 5,0, 10, 15.

En algunos casos, según el propósito del experimento, el micelio de P. sanguineus var. osorninus fue cultivado en un medio mínimo consistente en medio mineral basal suplementado con glucosa 20 g/l y con los requerimientos metabólicos de las mutantes (Apéndice 1).

2.3 Inoculación

Bloques de agar-malta, de 5 mm de diámetro por 3 mm de profundidad, con micelio en crecimiento obtenido desde la periferia de un cultivo de 4 días de incubación a 30°C, se colocaron en el centro de cada placa de cultivo preincubada a una determinada temperatura, haciendo tres a cinco réplicas para cada condición experimental en estudio.

El micelio cultivado en medio líquido se maceró en licuadora estéril por tres minutos. 20 μl fueron inoculados en las placas de cultivo o en matraces de 250 ml, con 50 ml de medio de cultivo.

Dos muestras de 20 μl cada una se observaron al microscopio, estimando el número de unidades miceliales (incluyendo conidios) presentes en los 20 μl , así como sus dimensiones.

Los medios líquidos inoculados se incubaron a diferentes temperaturas para determinar su crecimiento óptimo. La cepa 470 fue incubada a 10°C, 15°C, 25°C, 35°C, 40°C, 45°C y 48°C. La cepa

450 fue incubada a 15°C, 30°C y 36°C. Los medios líquidos fueron agitados constantemente a 130 rpm. Una vez determinada la temperatura óptima, los cultivos se incubaron a 30°C.

2.4 Mantención de las cepas

Las cepas silvestres y mutantes obtenidas se crecieron en tubos de 10 ml con 5 ml de medio agar-extracto de malta 1,5% p/v, durante 7 días a 30°C y posteriormente se guardaron a 4°C. En estas condiciones, la viabilidad de los cultivos se mantuvo por 4-5 meses aproximadamente.

2.5 Crecimiento

El crecimiento fúngico se evaluó de la siguiente manera:

a) El crecimiento lineal se determinó midiendo diariamente el diámetro alcanzado por la colonia en placas con medio de cultivo, en dos direcciones perpendiculares, hasta que la superficie de la placa es completamente cubierta por el micelio.

b) Crecimiento en peso seco se obtuvo pesando el micelio producido en el medio líquido, en filtros millipore con un poro de 0,2 μm de diámetro y secados a 95°C durante cuatro horas.

c) Trozos de micelio se extraen desde varios puntos de la colonia a fin de detectar diferencias morfológicas debidas a diferentes temperaturas, pHs, o en distintos medios de cultivo, fijándolos con lactofenol.

2.6 Cruzamientos

Los cruzamientos se realizaron en placas de agar con extracto de malta al 1,5% p/v. Dos inóculos de micelios compatibles son puestos a una distancia de 1 cm. Cuando las hifas en crecimiento de ambos inóculos se contactan, ocurre anastomosis de ellas, lo cual es seguido por una rápida migración de núcleos a través de ambos micelios. Esto da origen a hifas dicarióticas, distinguibles por la formación de fíbulas.

La aparición de fíbulas se controló en preparaciones microscópicas teñidas con azul de lactofenol, bajo aumentos del microscopio óptico de 400 x y 1000 x, después de una semana de iniciado el cultivo.

2.7 Mutagénesis

El cultivo monospórico correspondiente a la cepa 470-6 se creció durante 7 días en matraz Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio agar-extracto de malta 1,5% p/v a 30°C. La colecta de conidios se hizo lavando el micelio con 20 ml de agua destilada estéril y filtrando esta suspensión en gasa estéril (tres dobleces) a fin de retener trozos de micelio. Los conidios se contaron en cámara Neubauer. La suspensión de conidios con una concentración de 2×10^7 conidios/ml se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min en centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC5-B. El líquido sobrenadante se descartó y el precipitado de células se resuspendió en 10 ml de agua destilada estéril. Esta suspensión de conidios se depositó en placas Petri.

Los conidios se irradiaron con una lámpara UV germicida 15W General Electric, tipo G8T5 que emite principalmente radiación de 254 nm, durante 30, 60, 90 segundos desde una distancia de 18 cm. Los conidios irradiados se diluyeron en agua destilada estéril. 50 μ l de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} se distribuyeron en placas con medio completo e incubaron en oscuridad por 48 hrs a 30°C. Las colonias obtenidas a partir de un conidio se aislaron en tubos con 5 ml de agar-extracto de malta 1,5% p/v y posteriormente se seleccionaron en medio mínimo, en medio suplementado con ácido tánico 0,05% p/v, en el caso de las mutantes fenoloxidasa negativas. Las mutantes auxotróficas que no crecieron en medio mínimo fueron transferidas a medio mínimo suplementado con distintas mezclas de aminoácidos (Apéndice 2).

2.8 Determinación de proteínas

La concentración de proteínas en muestras de medio de cultivo líquido se determinó por el método de Lowry et al. (1951). Como estándar se usó albúmina de suero de bovino con una concentración de 1 mg/ml.

Las proteínas presentes en el medio de cultivo se precipitaron con sulfato de amonio (Schleif et al., 1981) al 80% de saturación a 4°C por 24 horas.

Las proteínas precipitadas se centrifugaron a 10.000 x g, por 20 min en centrífuga refrigerada Sorvall, modelo RC5-B. El sobrenadante se descartó y se utilizó el precipitado, el cual se

resuspendió en 1 ml Tris 10 mM, pH 7,0. La suspensión se dializó durante 1 hr contra NaCl 0,1 M. Posteriormente 0,4 ml de muestra, se utilizaron en las reacciones descritas en el método de Lowry.

La lectura se hizo a 750 nm en espectrofotómetro Shimadzu, modelo RV-150-02.

2.9 Preparación de extractos crudos

El micelio de Pycnoporus sanguineus, cultivado en medio líquido (medio mineral basal suplementado con glucosa al 2% p/v) se cosechó mediante filtración al vacío y se lavó con 6 volúmenes de agua destilada para eliminar las sales y el azúcar del medio de cultivo.

El micelio húmedo, congelado durante 1 hora a -20° C, se molió en mortero con arena de mar estéril hasta obtener una pasta homogénea. Para ello, se adicionó buffer fosfato de sodio, pH 6,0, en una relación de 3:1 con respecto al peso húmedo del micelio. El homogeneizado se centrifugó a 5.000 x g durante 15 minutos en centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC5-B. El precipitado se descartó y se utilizó el líquido sobrenadante para la detección de actividad de lacasa.

2.10 Purificación de lacasa

La purificación de lacasa se realizó a 4° C. Se agregó sulfato de amonio en una saturación de 80% al medio de cultivo líquido (1 litro), filtrado a través del papel filtro de celulosa (Whatman N^o2). El precipitado se colectó por centrifugación

(15.000 x g, 20 minutos) en centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC5-B. En seguida se resuspendió en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 6,0 y se dializó extensamente contra el mismo buffer.

El dializado se cargó en una columna de DEAE-Sepharose (1,5 cm x 20 cm) equilibrada con el buffer fosfato. Después de lavar con el buffer de equilibrio (200 ml), se aplicó un gradiente lineal de NaCl 0 - 0,2 M en un flujo de 10 ml/h. Las fracciones activas del eluido se reunieron, dializaron contra el buffer fosfato y se guardaron a -70°C.

2.11 Determinación de actividad lacasa

La actividad lacasa se ensayó a 30°C mediante registro de absorbancia a 465 nm de una mezcla de reacción (3 ml) que contenía guayacol 10 mM, buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 6,0 y la enzima.

El control consistió en la mezcla de reacción ya descrita con la enzima previamente inactivada por calor a 100°C durante 5 minutos.

2.12 Cinética de actividad lacasa

Periódicamente (durante 50 días) se colectaron por filtración al vacío a través de filtros millipore 0,2 µm muestras de 20 ml de medio de cultivo de la cepa silvestre 470-6 y de las mutantes pox_1^- y pox_4^- . Estas cepas fueron crecidas con agitación

(130 rpm) a 30° en matraces Erlenmeyer de 2 lt de capacidad que contenían 1 lt de medio mineral basal adicionado con glucosa 2% y tiamina 0,1 mg/ml.

Estos 20 ml de muestra fueron tratados como se describe en purificación de lacasa (sección 2.10), sin ser incorporados a la columna cromatográfica. Una vez dializados extensamente, se determinó la concentración de proteínas (sección 2.8) y la actividad de lacasa (sección 2.11).

2.13 Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 12% y 5% p/v de acuerdo al método de Laemmli (1970). Los geles se prepararon a partir de una solución stock de acrilamida: N-N' metilenbisacrilamida en una relación de concentración de 30:0,8% p/v. La electroforesis se realizó en placas de vidrio de 10 x 12 cm, utilizando tampón Tris-glicina pH 8,3 (3,03 g/l de Tris, 14,4 g/l de glicina) con SDS al 10% en ambos electrodos. Las muestras se corrieron a temperatura ambiente a una corriente constante de 4 mA por bolsillo, hasta que el colorante de referencia (azul de bromofenol 0,01%) migró un 90-95% del largo total del gel.

La preparación de los geles se realizó a partir de soluciones stock (Apéndice 4).

El gel separador de acrilamida 12% se preparó con Tris pH 8,8, 0,625 ml, solución acrilamida bis acrilamida 1 ml, agua destilada 0,875 ml, persulfato de amonio 10% p/v 12,5 μ l, Temed 0,75 μ l.

El gel concentrador de acrilamida al 5% se preparó con Tris pH 6,8, 0,315 ml, acrilamida bis acrilamida 0,208 ml, agua destilada 0,732 ml, persulfato de amonio 0,25 μ l, Temed 0,75 μ l. Después de la polimerización del gel, cada bolsillo fue cargado con 10 μ l de muestra de proteína obtenida como en sección 2.8 y buffer de muestra en relación 1:1 v/v. El buffer de muestra contenía azul de bromofenol 0,01%, glicerol 10%, mercaptoetanol 5%, SDS 3%, Tris 62,5 mM. La mezcla de proteína más buffer de muestra se trató previamente durante 5 min a 100°C.

Los geles se fijaron y tiñeron con una solución de azul brillante de Coomassie R al 0,025% p/v, disuelto en una solución acuosa de metanol al 45% v/v y ácido acético al 9% v/v durante 12 hrs a temperatura ambiente. Los geles se destiñeron en el mismo solvente, durante al menos, 3 hrs y se completó el desteñido con ácido acético al 10% v/v.

2.14 Pruebas para fenol oxidasas

Varios ensayos enzimáticos se realizaron in situ (drop-test) sobre las placas con micelio en desarrollo en placas de agar extracto malta. Los ensayos con 1-naftol, p-cresol y guayacol se realizaron de acuerdo a Käärík (1965). Estos ensayos enzimáticos se describen en el cuadro resumen siguiente:

Sustrato	Enzima	Color producido por la reacción positiva
1-naftol 0,1 M en etanol 96%	Lacasa	Púrpura
Guayacol 0,1 M en etanol 96%	Lacasa	Púrpura
Peróxido de hidrógeno al 0,4% con pirogalol al 1%, recién preparado	Peroxidasa	Café-amarillento
L-tirosina 0,5% con 1 gota de NaOH 1 N	Tirosinasa	Amarillo
p-cresol 0,1 M en etanol 96%	Tirosinasa	Café-naranja

Todas las reacciones se realizaron en hifas que crecen activamente en el borde de la colonia y en hifas ubicadas en el centro de la colonia. La prueba para tirosinasa fue realizada en placas con micelio aéreo. Todas las reacciones fueron leídas después de 3, 24 y 72 horas.

RESULTADOS

3.1 Características morfológicas de Pycnopus sanguineus var. osorninus

Pycnopus sanguineus var. osorninus presenta basidiocarpos sésiles, dimidiados, de 8,0-13,5 mm en sección transversal en la zona proximal del píleo, adelgazándose hacia el borde. Poseen un radio central 20-50 mm y 32-80 mm en dirección lateral. La superficie superior del carpóforo es de color blanco y con un tenue brillo. Posee una o dos bandas ligeramente anaranjadas, siendo la más periférica de una mayor intensidad (Fig. 1).

Luego de ser colectado y deshidratado, la superficie del carpóforo se torna más intensamente anaranjada; rugosa, suave al tacto, con el borde ligeramente irregular y con un leve surco ubicado a 1 cm al interior de él. El contexto del carpóforo es suberoso, denso, con bandas de zonación de color naranja, rojas e hialinas, de anchos variables. En contacto con KOH al 4% se torna negro (Fig. 2)

En estado fresco la superficie inferior del carpóforo es de color anaranjado intenso, tornándose rojo bermellón al deshidratarse. La superficie inferior posee 4-5 poros por mm (Fig. 3).

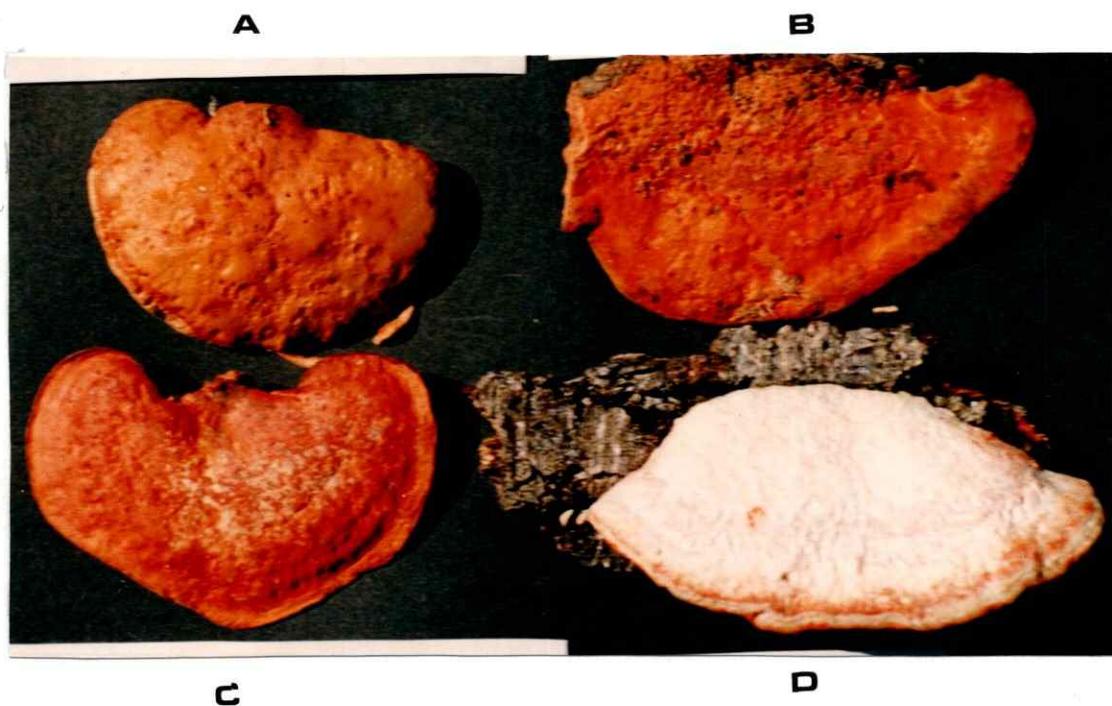


FIG. 1. Superficie superior de basidiocarpos de tres especies del género Pycnoporus. A: P. cinnabarinus, B: P. coccineus, C: P. sanguineus, D: P. sanguineus var. osorninus.

Los basidiocarpos A, B, C fueron obtenidos del Jardín Botánico Real de Kew (Inglaterra). El basidiocarpo D fue colectado en un bosque nativo de Osorno (Chile).

La barra corresponde a 10 mm.

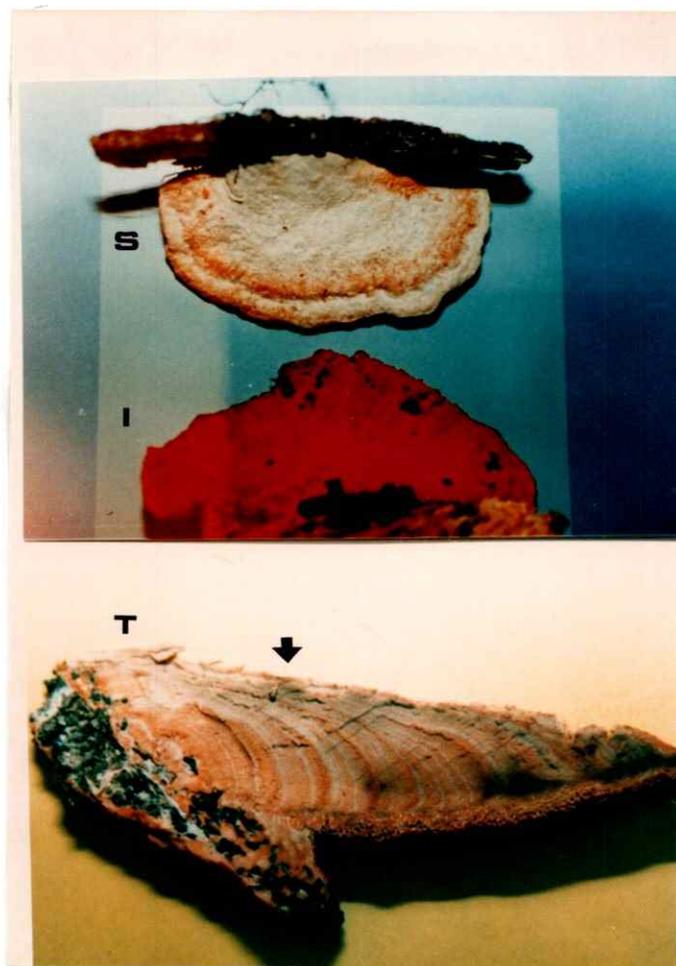


FIG. 2. Basidiocarpo de Pycnoporus sanguineus var. osorninus adherido a trozos de troncos de Notophagus dombeyi. S. cara superior del basidiocarpo. I. cara inferior del basidiocarpo. T. corte transversal del basidiocarpo.

La flecha indica el contexto denso del basidiocarpo, con bandas de zonación de color naranja, rojas e hialinas, de anchos variables.

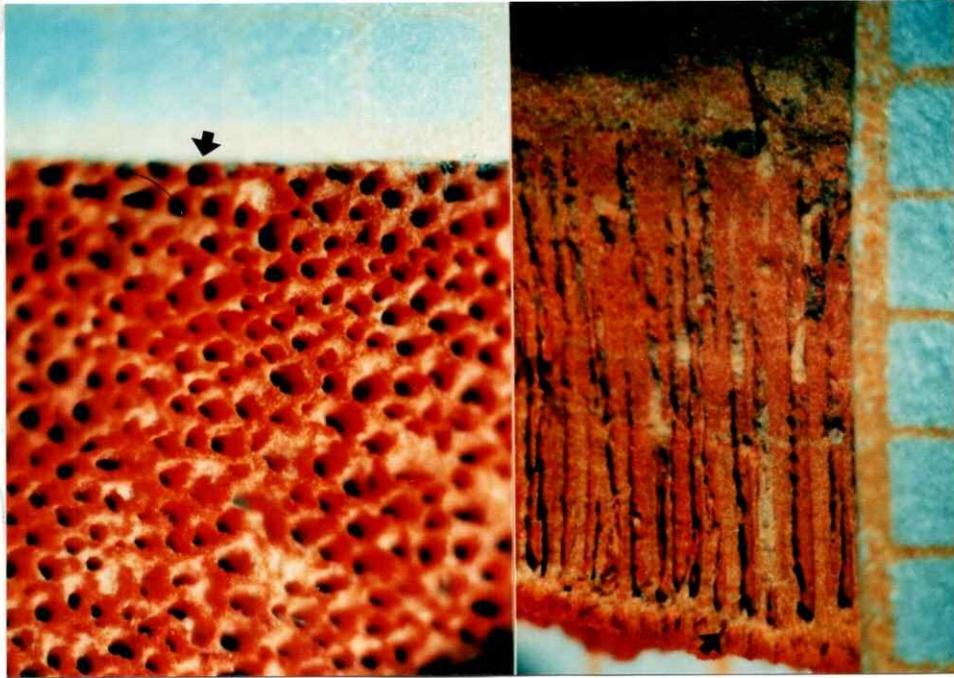


FIG. 3. Detalle de la superficie inferior del basidiocarpio de Pycnoporus sanguineus var. osorninus.

En el lado izquierdo de la fotografía se observan poros de salida de los tubos del himenóforo, con diámetros de 100-300 μm . El lado derecho de la fotografía corresponde a un corte transversal del basidiocarpio a nivel de los tubos del himenóforo, con largo de hasta 4 mm. La flecha indica los poros. Escala graduada en milímetros.

El himenóforo es tubular, con tubos proximales de 1,5 mm en carpóforos pequeños, hasta 4 mm de largo en los de más edad, de color naranja crema, circulares-elipsoidales, en corte transversal, poseen un diámetro de 100-300 μm (Fig. 3). Basidios subclaviformes, 3-5 μm ancho x 14-17 μm largo, con 4 esterigmas (Fig. 4). Los basidiosporas son cilíndrico-elipsoidales, aplanadas por un lado, levemente curvadas, hialinas, no amiloides, 1,5-2,0 x 3,5-5,0 μm , lisas, de paredes delgadas.

Sistema hifal trimítico, con hifas generativas de 1,5-2,0 μm de diámetro, con fíbulas que forman medallones, hialinas (Fig. 5); hifas esqueléticas no ramificadas de 1,8-5,0 μm de diámetro, pared gruesa; hifas esqueléticas ramificadas (ligadoras) de 3,0 μm de diámetro. Ambos tipos de hifas esqueléticas carecen de septum y llevan pigmento rojo en su pared externa, dispuesto en bandas o continuamente sobre las hifas. Este pigmento desaparece en KOH al 10% y persiste en ácido láctico (Fig. 6).

3.2 Ciclo de vida de Pycnoporus sanguineus var. osorninus

Pycnoporus sanguineus var. osorninus tiene dos fases en su ciclo de vida:

- a) una fase haploide, monocariótica, con un micelio que puede ser propagado por esporas asexuales: artroconidios y clamidosporas.
- b) una fase heterocariótica, en la cual cada célula contiene dos núcleos que difieren en la característica de apareamiento. Esta segunda fase, llamada dicarion, es caracterizada por un micelio

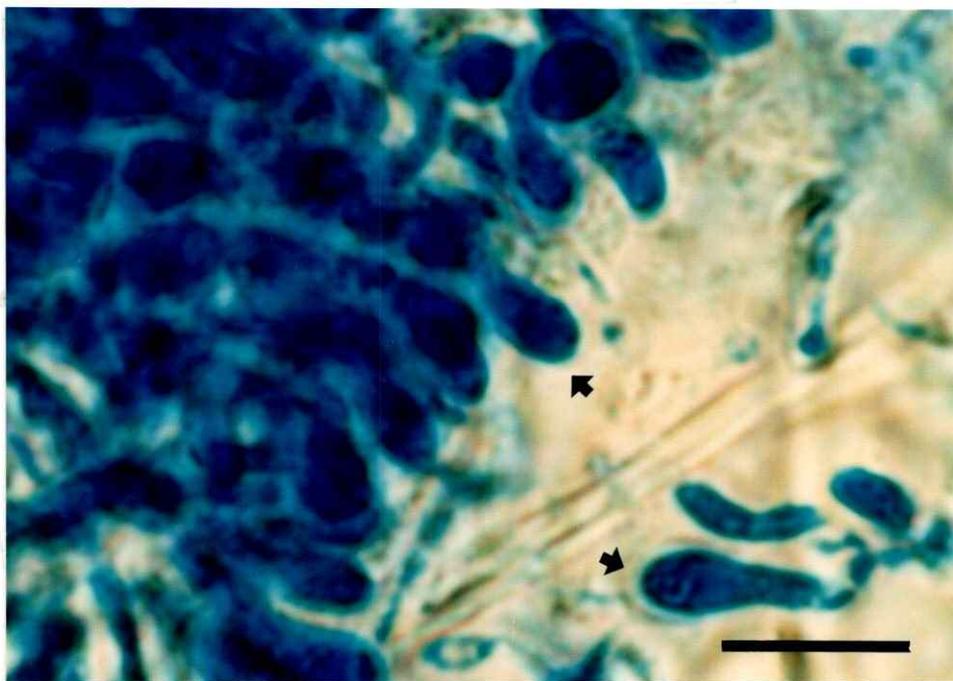


FIG. 4. Preparación microscópica del himenóforo de Pycnoporus sanguineus var. osorninus. La preparación fue obtenida con un corte a mano alzada del basidiocarpo de este hongo, en la zona del himenóforo y teñida con azul de lactofenol.

Las flechas indican grandes basidios subclaviformes de 3-5 μm de ancho por 14-17 μm de largo, los que darán origen a 4 basidiosporas cilíndrico elipsoidales.

La barra corresponde a 10 μm .



FIG. 5. Hifas generativas del micelio de Pycnoporus sanguineus var. osorninus con fíbulas que forman medallones.

La preparación fue teñida con azul de lactofenol. La flecha indica fíbulas originadas a nivel del septum de la hifa; la conexión entre las dos células encierra un espacio entre ésta y la hifa principal.

La barra mide 10 μm .



FIG. 6. Trozo de tronco de Notophaqus dombeyi invadido por hifas de Pycnoporus sanguineus var. osorninus (flecha), con intensa coloración roja.

fibulado. La fase dicariótica permite la fusión de los dos núcleos en el basidio para dar un núcleo diploide que sufre meiosis inmediatamente. La meiosis es seguida por la producción de cuatro basidiosporas (Fig. 7).

3.3 Fenotipo de P. sanguineus en diferentes condiciones de cultivo

Pycnoporus sanguineus var. osorninus tiene un rango de temperatura de crecimiento entre 10°C y 45°C, con un óptimo entre 30°C y 40°C (Fig. 8).

Exhibe una tasa máxima de crecimiento en agar-extracto de malta con un diámetro colonial de 186,8 mm/semana, equivalente a un crecimiento radial de 13,3 mm/día a 30°C (Fig. 9).

Los valores de pH que permiten su crecimiento varían entre 3,2 y 5,7 y permiten un desarrollo con un diámetro de la colonia de 20,7 mm/día. A pH sobre 5,7, la velocidad de crecimiento disminuye para alcanzar un incremento en diámetro de la colonia de 1,2 mm/día a pH 7,2 (Fig. 10). Los distintos pH no provocan cambios en las características microscópicas del micelio.

No se detectan cambios morfológicos en el micelio como producto de variaciones en los rangos de temperatura y pH estudiados, lo cual sí ocurre cuando varía la composición química del medio.

En cultivos en medio líquido con sulfato de amonio, como fuente de nitrógeno, sacarosa y sales, se forman clamidosporas en

CICLO DE VIDA DE *Pycnopus*

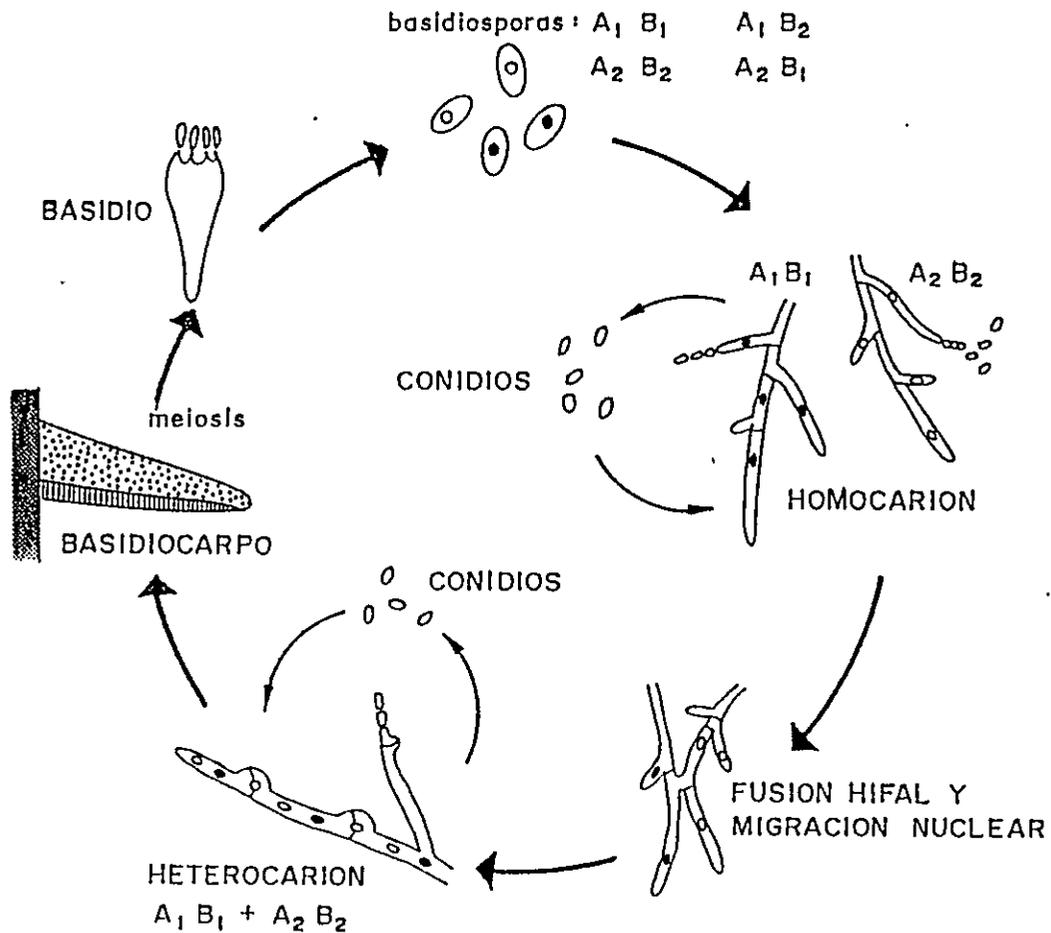


FIG. 7. Ciclo de vida de *Pycnopus sanguineus* var. *osorninus*.

Su diseño se basa en las observaciones efectuadas en este estudio. Es un ciclo de vida con dos fases: a) una fase haploide, monocariótica, y b) una fase heterocariótica.

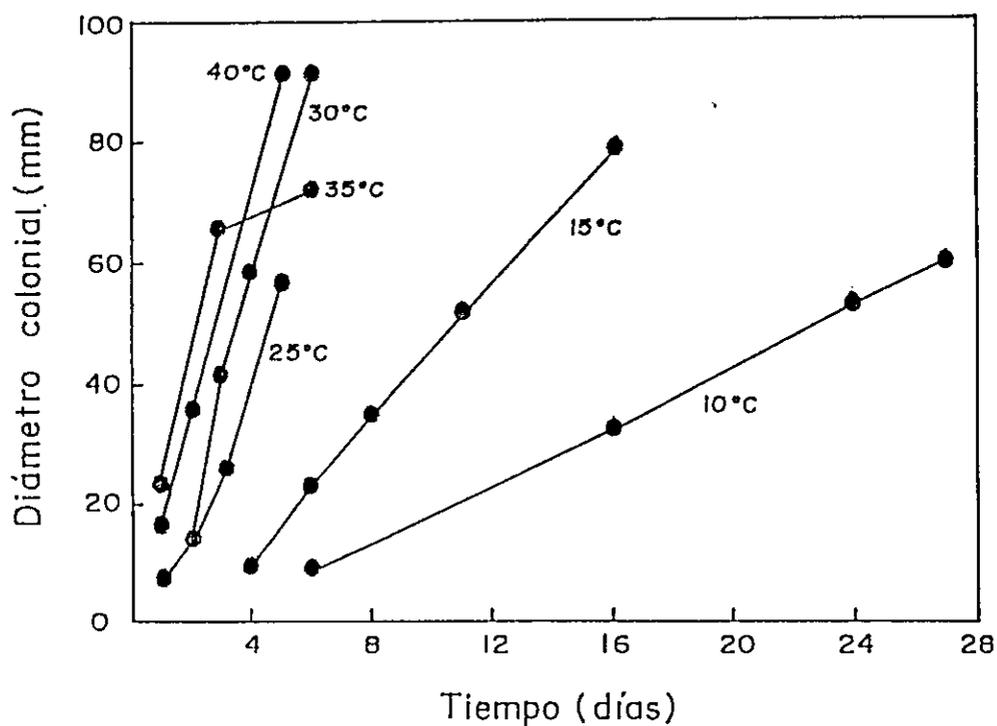


FIG. 8. Efecto de la temperatura en el crecimiento lineal de Pycnoporus sanguineus var. osorninus. El micelio de Pycnoporus fue crecido en placas de agar extracto malta 1,5%. El crecimiento lineal se determinó midiendo bajo lupa de disección, el diámetro alcanzado por la colonia en la placa, en dos direcciones perpendiculares. Las temperaturas de incubación fueron 10°C, 15°C, 25°C, 30°C, 35°C y 40°C.

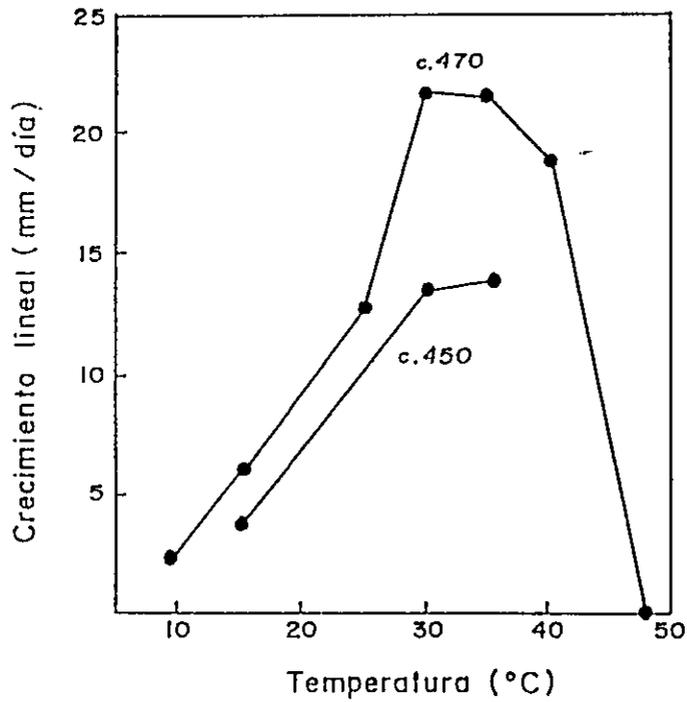


FIG. 9. Efecto de la temperatura en el crecimiento lineal de Pycnopus sanguineus var. osorninus (c. 470) y Pycnopus cinnabarinus (c. 450). Los valores del crecimiento lineal se obtuvieron como la pendiente máxima de las curvas presentadas en la Figura 8.

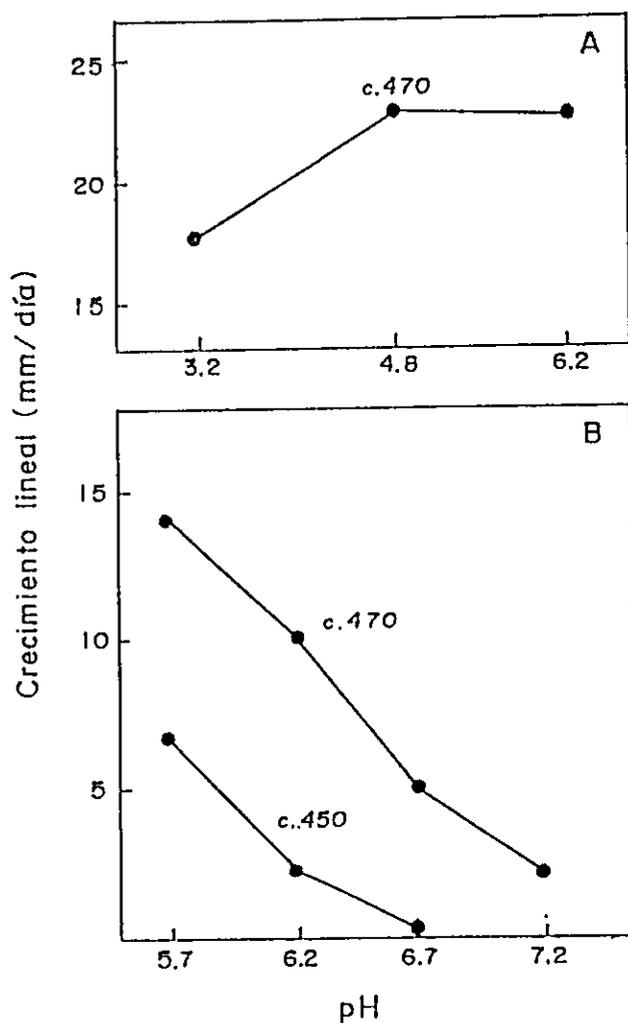


FIG. 10. Efecto del pH del medio de cultivo en el crecimiento lineal de *P. sanguineus* var. *osorninus* (c. 470) y de *P. cinnabarinus* (c. 450).

El micelio de *Pycnoporus* fue cultivado a 30°C en placa de agar extracto malta 1,5% y los pHs fueron ajustados en A: con ácido ortofosfórico 85% y en B: con buffer fosfato de sodio.

un número diez veces superior al observado en medio con nitrato (Fig. 11). Las clamidosporas son intercalares o terminales, solitarias o dobles y en mayor número, separadas por un septo sin fíbula en la base. Sus dimensiones fluctúan entre 5 x 6 a 7 x 12 μm . El micelio se presenta condensado.

En medio sólido, con amonio, sacarosa y sales, P. sanguineus se expande con rapidez, pero la colonia que resulta presenta un micelio laxo con pocas hifas aéreas, sin zonación y produciendo muy escaso pigmento. No se aprecia un incremento en la producción de clamidosporas, como sucede cuando se cultiva en medios líquidos.

En medio agar-extracto malta el aspecto de la colonia es algodonoso en las primeras etapas del desarrollo, pasando luego del primer mes a formar un micelio aéreo farináceo, con manifestaciones de zonación. La colonia es inicialmente blanca, para producir posteriormente un color naranja rojizo (Fig. 12). Como en medios sólidos, el micelio que cubre la superficie de los medios líquidos también adquiere el color anaranjado rojizo el cual es aportado fundamentalmente por las hifas esqueléticas que crecen en manojos verticales, con apariencia de cojines que hacen posible una fructificación rudimentaria. En la naturaleza estas estructuras conforman los túbulos.

Las hifas esqueléticas son de un color amarillo pálido, con gránulos de color rojo naranja en su parte externa. Estos desaparecen al agregar una solución de KOH al 10% al micelio. Por el contrario, las hifas fértiles, incluyendo las marginales tienen

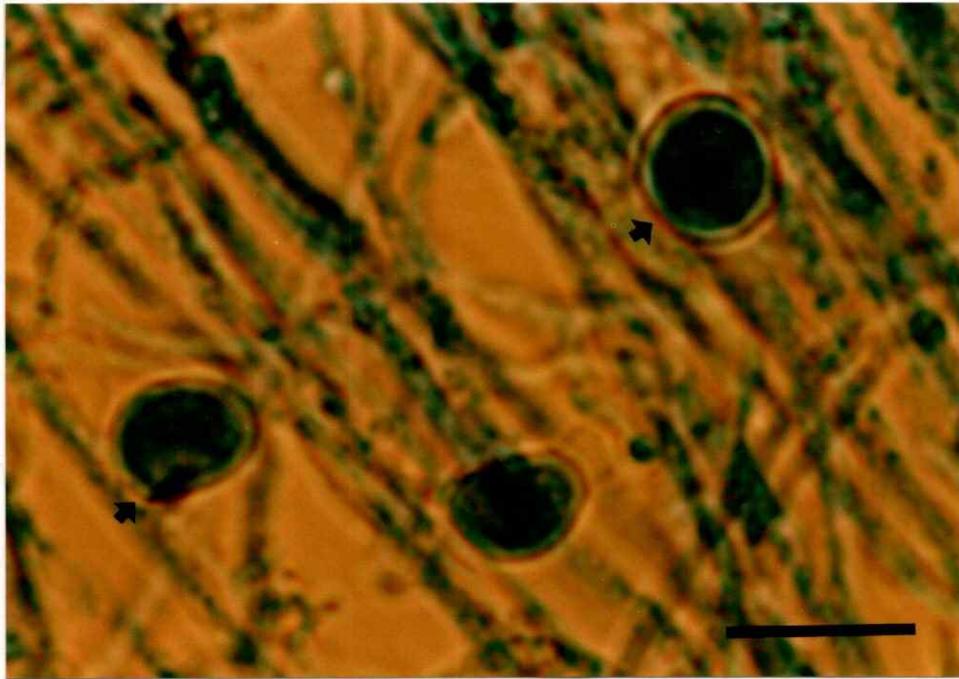


FIG. 11. Preparación microscópica del micelio de Pycnoporus sanguineus var. osorninus.

El hongo se cultivó a 30° en medio mineral basal, glucosa 20 g/l y sulfato de amonio 1,4 g/l como fuente de nitrógeno. Las flechas indican la presencia de esporas asexuales denominadas clamidosporas. Tinción azul de lactofenol. Barra = 10 μ m

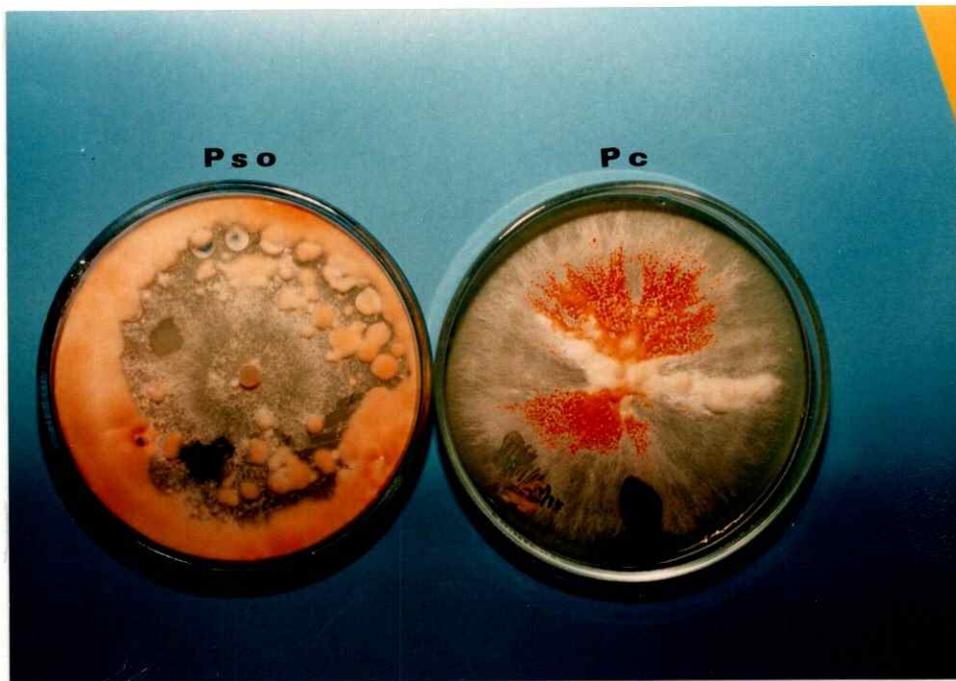


FIG. 12. Cultivos en medios sólidos de dos especies de Pycnopus.

Pso: Pycnopus sanguineus var. osorninus, y

Pc : Pycnopus cinnabarinus

Los cultivos se obtuvieron a 30°C en agar extracto maltá 1,5%. La mancha oscura corresponde a la oxidación que produce la lacasa sobre el sustrato α -naftol.

septos con fíbulas en la mayoría de ellas. El ancho de las hifas fértiles está entre 0,6 y 2,5 μm . Muchas de ellas se rompen produciendo artroconidios en abundancia (Fig. 13).

El desarrollo de Pycnoporus observado en medio de cultivo con aserrín de pino, es muy similar al desarrollo observado en agar-malta. El micelio fructifica con un himenio de escaso desarrollo, con tubos de 170-230 μm de diámetro y disepimentos de 30-50 μm de ancho, formando aproximadamente 4 poros/mm en la superficie, con producción de abundantes basidiosporas de un tamaño 1,5 x 2,0 x 3,5-5,0 μm . Estas basidiosporas proceden de basidios de 4-5 μm ancho x 12-16 μm largo, con 4 esterigmas, en un himenio de poca profundidad, que forma muy escasos poros al no juntarse los disepimentos (Fig. 14).

El ácido tánico 0,05% se utilizó en los medios de cultivo en que se seleccionaron las mutantes fenoloxidasa negativas, de tal forma que resultó necesario evaluar el efecto de este compuesto en el crecimiento del micelio de Pycnoporus. Así mismo la sorbosa que ha sido descrita para otras especies fúngicas como inductor de crecimiento colonial.

En medio agar-malta y ácido tánico al 0,05%, la velocidad de crecimiento lineal se ve disminuida. A los cuatro días de incubación, el diámetro colonial alcanza una dimensión inferior en un 10% con respecto al control. En medio agar-malta con sorbosa al 2,0%, el diámetro colonial a los cuatro días de incubación alcanza sólo el 50% con respecto al control. La adición de ambos compuestos acentúa el efecto. Así, el diámetro

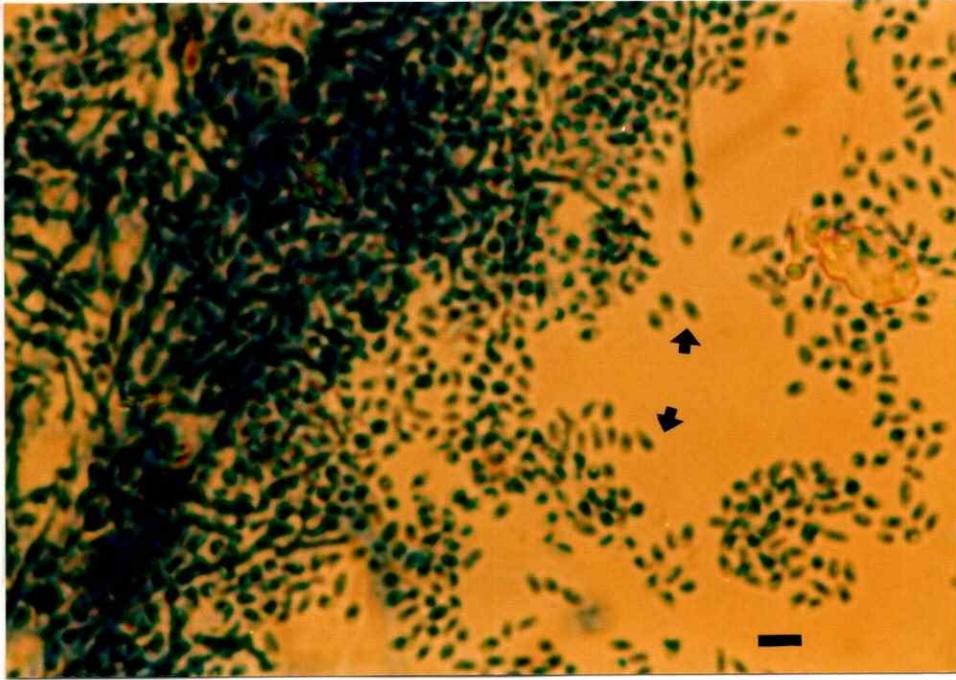


FIG. 13. Micelio de Pycnoporus sanguineus var. osorninus con abundante producción de conidios (flecha). La preparación microscópica se realizó a partir de un cultivo de 7 días del hongo a 30°C en placa de agar extracto malta 1,5%. La tinción corresponde a azul de lactofenol. BARRA= 1 μ m.

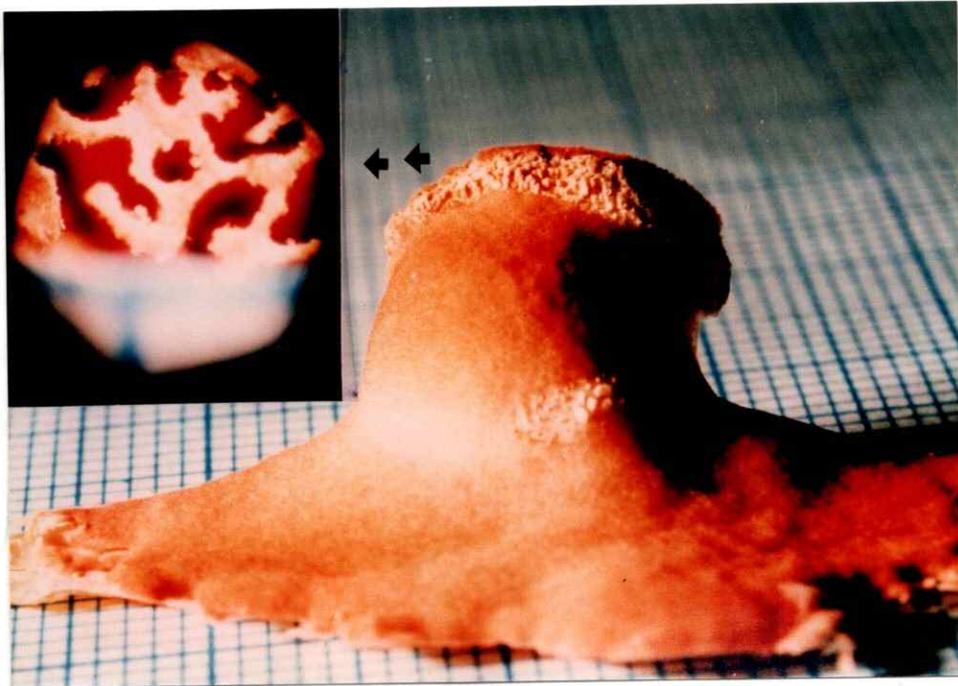


FIG. 14. Basidiocarp de Pycnoporus sanguineus var. osorninus obtenido en cultivo de laboratorio.

El recuadro corresponde a una zona de la fructificación (flechas) con escasos poros del himenóforo, en contraste a los basidiocarpos de la naturaleza. El micelio dicariótico se cultivo a 30°C, en agar extracto de malta 1,5%. Escala graduada en milímetros.

alcanzado por la colonia a los cuatro días de incubación es de 1/3 aproximadamente con respecto al control. No obstante, el crecimiento es sostenido hasta después de los 10 días de incubación (Fig. 15).

La incorporación de D-L-p fluorofenilalanina en el medio de cultivo afecta en cierta medida la tasa de crecimiento de este basidiomicete. A los siete días de incubación, concentraciones crecientes de este compuesto, hasta 15 $\mu\text{g/ml}$, permiten un incremento del diámetro de la colonia de un 10% con respecto al control. A los 14 días de incubación el diámetro colonial permanece estacionario (Fig. 16).

3.4 Obtención y cruzamientos de cepas monospóricas de Pycnopus

En basidiomicetes que forman cuerpos fructíferos característicos los productos de la meiosis pueden ser aislados y analizados.

La fructificación obtenida en el laboratorio del micelio de Pycnopus permitió coleccionar basidiosporas. La germinación de cada una de estas basidiosporas en agar extracto malta 1,5% dio origen a colonias de micelios monospóricos.

Mediante cruzamientos de estos micelios monospóricos se determinaron cuatro polos sexuales, condición que se conoce como heterotalismo tetrapolar.

El micelio haploide derivado del dicarion será de cuatro clases A_1B_1 , A_2B_2 , A_1B_2 y A_2B_1 .

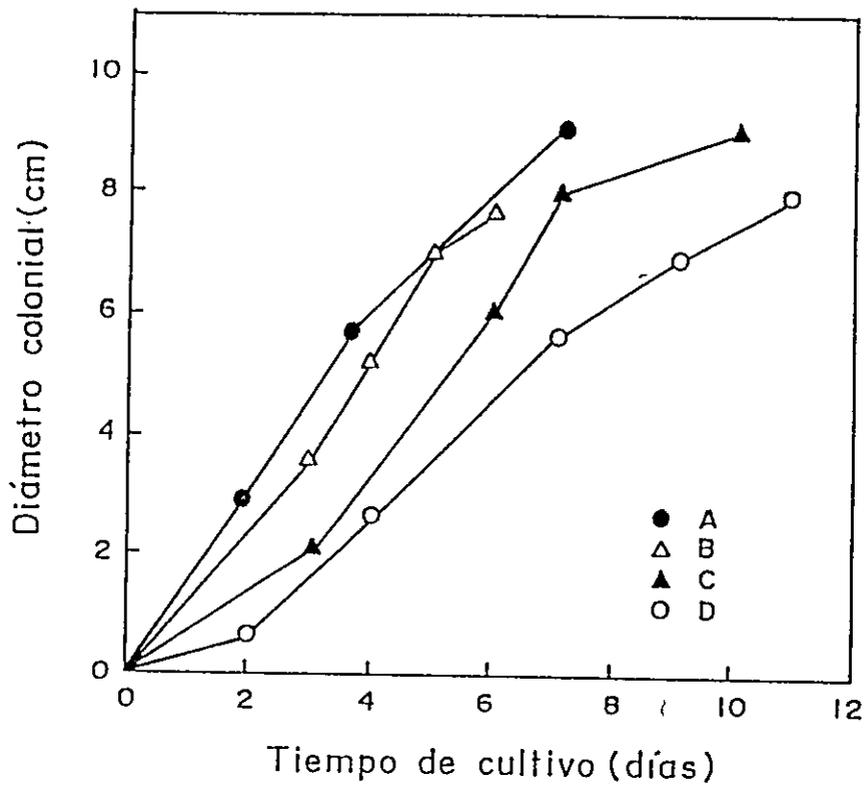


FIG. 15. Crecimiento lineal de la cepa 470 en diferentes medios de cultivo. El micelio se creció en agar extracto malta 2% a 30°C. En A (●) no adición; en B (△) se adicionó ácido tánico 0,05%; en C (▲) se adicionó sorbosa 2% y en D (○) se adicionó la mezcla ácido tánico 0,05% y sorbosa 2%.

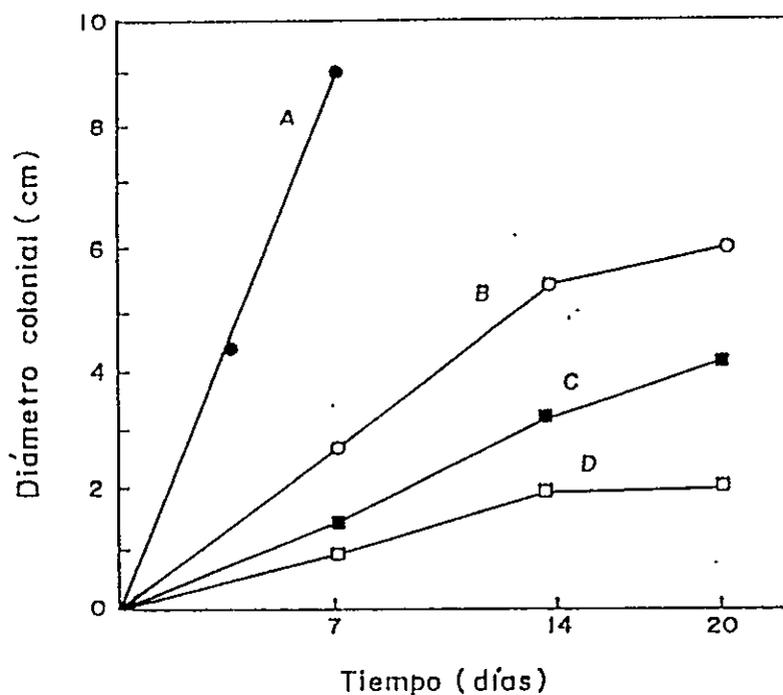


FIG. 16. Efecto de D-L-p fluorofenilalanina en el crecimiento lineal de la especie *Pycnoporus sanguineus* var. *osorninus*.

La cepa se cultivó en agar 1,5%, glucosa 4%, sales, vitamina B y sulfato de amonio con fuente de nitrógeno adicionado con distintas concentraciones con este análogo de aminoácido.

En A (●) no adición; B (○) se adicionó 5 $\mu\text{g/ml}$; C (■) 10 $\mu\text{g/ml}$ y en D (□) 15 $\mu\text{g/ml}$.

La temperatura de incubación fue de 30°C.

La fíbula se desarrolla solamente si el dicarión es heterocigoto para el locus A. La migración nuclear tendrá lugar en el caso de que el dicarión sea heterocigoto para el locus B.

Los resultados de los cruzamientos mostrados en la Tabla 1 permiten derivar el genotipo sexual de las cepas monospóricas 470-x de Pycnopus sanguineus var. osorninus.

Las cepas 470-6, 470-9 comparten los mismos factores de apareamiento, con un genotipo sexual A_1B_1 .

Las cepas 470-3 y 470-8 son portadoras del genotipo sexual A_2B_2 .

La cepa 470-2 tiene el genotipo sexual A_1B_2 y la cepa 470-4 el A_2B_1 .

Los cruzamientos entre micelios monospóricos del resto de las cepas de Pycnopus permitieron seleccionar los distintos tipos de apareamiento de cada una de ellas y realizar cruzamientos entre las diferentes cepas estudiadas.

Las cepas aisladas en Osorno y Temuco (Chile) demostraron ser heterotálicas tetrapolares (Tabla 1).

La confrontación en conjunto de las cepas monospóricas de Pycnosporus variedad osorninus, con las cepas monospóricas de Pycnosporus cinnabarinus, incluyendo los cuatro polos, no condujo al desarrollo de fíbulas en ninguno de los casos (Tabla 2).

Tabla 1. Cruzamiento de las cepas monospóricas 470-x

Cepas monospóricas de Pycnopus

470-x	470-2	470-3	470-4	470-6	470-8	470-9
470-x						
470-2	-					
470-3	-	-				
470-4	+	-	-			
470-6	-	+	-	-		
470-8	-	-	-	+	-	
470-9	-	+	-	-	+	-

+ indica formación de fíbulas; - ausencia de fíbulas.

x variando entre 2, 3, 4, 6, 8, 9.

Genotipo sexual de las cepas monospóricas 470-x derivado de los resultados de los cruzamientos indicados en esta Tabla.

A_1B_1 : 470-6, 470-9

A_2B_2 : 470-3, 470-8

A_1B_2 : 470-2

A_2B_1 : 470-4

TABLA 2. Cruzamiento en todas las posibles combinaciones de cultivos monospóricos de Pycnopus. P. cinnabarinus, cepa española 450-x; cepas chilenas 470-x, 472-x, 473-x y 479-x: P. sanguineus, 940-x y 950-x.

	450				470			472				473				479				940			950			
	3	5	6	8	3	17	6	4	8	19	20	4	5	8	9	2	3	6	8	3	6	14	1	2	5	6
450-3	-	+	-	-																						
5	+	-	-	-																						
6	-	-	-	+																						
8	-	-	+	-																						
470-3	-	-	-	-	-	+	-																			
17	-	-	-	-	+	-	-																			
6	-	-	-	-	-	-	-																			
472-4	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-															
8	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-															
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+															
20	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-															
473-4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-											
5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-											
8	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+											
9	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-											
479-2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-							
3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-							
6	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+							
8	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-							
940-3	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-				
6	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-				
14	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-				
950-1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
5	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-

(+) Indica formación de hifas con fíbulas, (-) indica carencia de fíbulas.

Las colonias desarrolladas a partir de los micelios primarios de las cepas 450-x y 470-x formaron barreras con hifas pigmentadas y una gran cantidad de hifas de enlace de 1,2 - 2,0 μm de diámetro, e hifas septadas afibuladas de 2-5 μm de diámetro.

El cruzamiento entre los polos de P. cinnabarinus, cepa 450, con los polos de las cepas 940 y 950 de P. sanguineus en general no permitió el desarrollo de fíbulas, excepto en uno de los casos (Tabla 2). El crecimiento micelial en placa no produjo fructificaciones. Las fíbulas fueron escasas.

Las cepas de Pycnoporus aislados en el bosque valdiviano manifiestan heterotalismo alelomórfico múltiple, tal como ha sido evidenciado previamente para otras cepas del mismo género (Nobles y Frew, 1962) y como se manifiesta en este estudio con las cepas de P. sanguineus.

Los cruzamientos de los polos de las cepas monospóricas de la variedad osorninus con los polos de las cepas monospóricas de P. sanguineus condujo a la formación de fíbulas y de micelio secundario en varias combinaciones (Tabla 2).

3.5 Mutagénesis de Pycnoporus sanguineus var. osorninus con luz ultravioleta

La sobrevivencia relativa de conidios homocarióticos al ser expuestos a la luz UV durante 30 segundos es aproximadamente 1%. Sobrepasados los 90 segundos de exposición, la radiación

ultravioleta de 254 nm resulta letal en un 100% de los conidios (Tabla 3).

El tratamiento de conidios de Pycnoporus con luz ultravioleta durante 30 a 90 segundos de exposición ha permitido obtener mutantes de esta cepa (Tabla 4).

Entre las mutantes auxotróficas obtenidas (Método 2.7) está una que requiere adenina para crecer (ad⁻). Este mutante no crece en medio mínimo suplementado con guanosina. En medio suplementado con adenina su crecimiento evaluado en peso seco sobrepasa ligeramente el de la cepa silvestre (470) (Fig. 17).

Otras mutantes auxotróficas seleccionadas e identificadas corresponden a una que requiere prolina (pro⁻) y otra que requiere isoleucina y valina (ilv⁻).

Se ha obtenido también una mutante morfológica (col), que en medio completo tiene un crecimiento muy restringido en comparación con la cepa silvestre.

En medio agar-extracto malta suplementado con ácido tánico se han seleccionado posibles cepas fenoloxidasas negativas (pox⁻) que no producen halo café en torno a los márgenes de la colonia, como lo hace la cepa silvestre (Fig. 18).

Todas las mutantes seleccionadas han sido cruzadas con la cepa silvestre 470 de Pycnoporus sanguineus, y su descendencia analizada.

La descendencia de los cruzamientos realizados entre la cepa 470 de P. sanguineus y las mutantes ad⁻, pro⁻ y col muestran una

TABLA 3. Sobrevida relativa de conidios a la radiación UV durante diferentes intervalos de tiempo.

Tiempo de exposición (seg)	Sobrevida conidios (%)
0	100
30	1,29
60	0,22
90	0,01
120	0,00
180	0,00

2×10^7 conidios/ml de la cepa 470 se suspendieron en 10 ml de agua destilada estéril en una placa Petri de 100 mm y fueron irradiados con radiación UV de 254 nm por distintos tiempos. La energía emitida es de 0,3 - 0,4 W/m².

TABLA 4. Mutantes obtenidas por tratamiento de conidios de Pycnoporus sanguineus var. osorninus con radiación ultravioleta (254 nm).

CEPA MUTANTE	FENOTIPO
ad ⁻ PSO 4109	auxotrofa para adenina
pro ⁻ PSO 14282	auxotrofa para prolina
ilv ⁻ PSO 1458	auxotrofa para isoleucina-valina
col PSO 1439	crecimiento colonial
pox ₁ ⁻ PSO 1460	fenoloxidasa negativa
pox ₂ ⁻ PSO 1455	fenoloxidasa negativa
pox ₃ ⁻ PSO 1417	fenoloxidasa negativa
pox ₄ ⁻ PSO 1452	fenoloxidasa negativa
pox ₅ ⁻ PSO 1447	fenoloxidasa negativa

La cepa silvestre en medio de cultivo con ácido tánico 0,05% p/v, forma un halo café en torno a los márgenes de la colonia lo cual se reconoce como reacción Bavendamm positiva. Las mutantes de fenoloxidasa negativa no presentan halo coloreado en torno a la colonia, hecho que fue considerado como una reacción Bavendamm negativa.

PSO: Pycnoporus sanguineus var. osorninus.

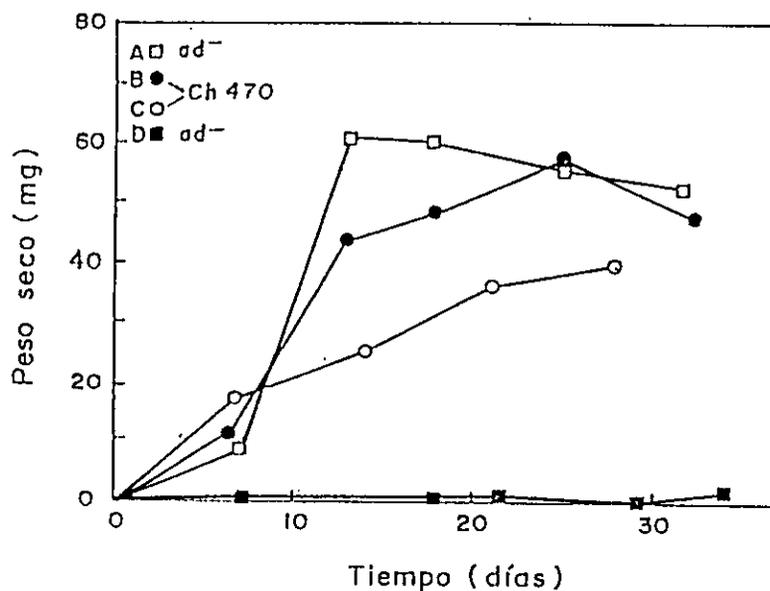


FIG. 17. Crecimiento del micelio de la cepa silvestre 470 y de la mutante auxotrófica para adenosina, ad^- . Crecimiento evaluado en miligramos de peso seco.

Ambas cepas fueron crecidas a $30^{\circ}C$ con agitación (130 rpm) en medio mínimo, el cual fue adicionado con adenosina 0,01%.

A (\square) mutante auxotrófica ad^- crecida con adenosina; B (\bullet) cepa silvestre 470 crecida con adenosina; C (\circ) cepa silvestre 470 en medio mínimo; D (\blacksquare) mutante auxotrófica ad^- en medio mínimo.

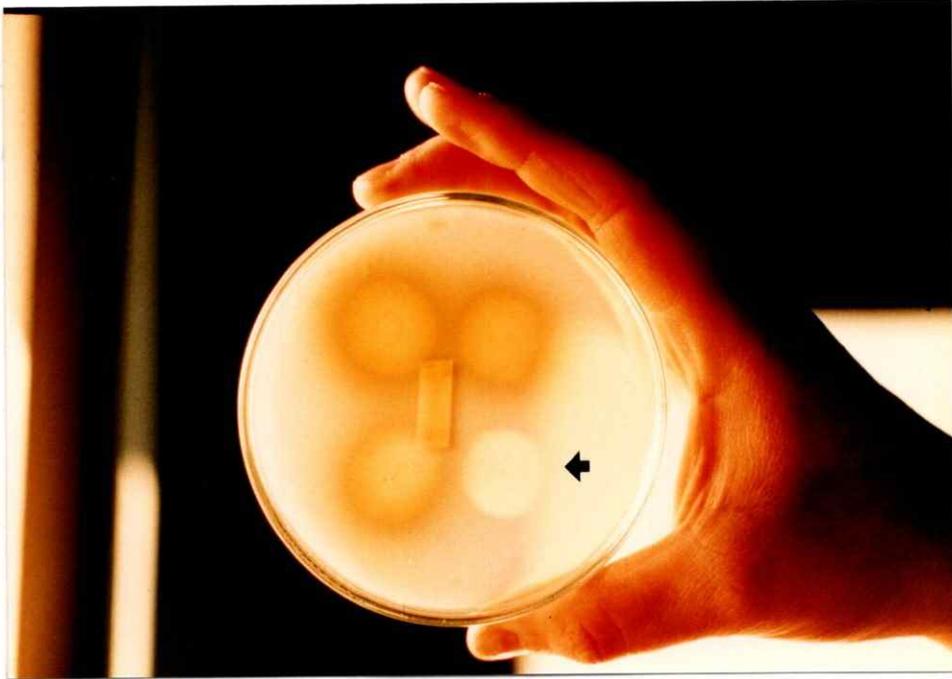


FIG. 18. Colonias de Pycnoporus sanguineus var. osorninus. Estas colonias se originaron a partir de basidiosporas de la F₁ del cruzamiento entre la cepa silvestre y la mutante fenoloxidasa negativa. La flecha indica la colonia de la mutante crecida en medio nutritivo completo suplementado con ácido tánico 0,05%.. La mutante fenoloxidasa negativa carece de halo café en torno a los márgenes de la colonia.

segregación de 1:1 con respecto al fenotipo silvestre tal como se observa en la Tabla 5. A diferencia de lo que sucede en el caso de los cruzamientos entre la cepa 470 de P. sanguineus con las mutantes ilv^- y pox^- que muestran segregaciones diferentes a la proporción 1:1. En el caso de ilv^- la segregación es 1:4 y en el caso de pox^- la segregación es 1:6.

3.6 Test de placa para fenoloxidasas

La coloración desarrollada por el micelio de P. sanguineus crecido en agar-extracto malta al incorporarle 50 μ l de tirosina, guayacol o pirogalol permite detectar el posible aprovechamiento de dichos sustratos por parte de la cepa 470 de este hongo. El micelio adquiere color púrpura con guayacol, color café con pirogalol, color amarillo con tirosina. Con respecto a las mutantes pox^-_1 , pox^-_3 , pox^-_5 no se observa cambio de color del sustrato guayacol y en el caso de las mutantes pox^-_2 , pox^-_4 sólo las hifas marginales dan una reacción tenue.

Con pirogalol, la cepa silvestre (470-6) da reacción intensa. Las mutantes pox^-_1 , pox^-_3 , pox^-_4 dan reacción positiva, pero de menor intensidad con respecto a la cepa silvestre. Las mutantes pox^-_2 , pox^-_5 dan una reacción tenue solo en las hifas marginales (Tabla 6). No se observó cambio de color al agregar tirosina a los micelios de las diferentes mutantes.

TABLA 5. Descendencia de cruzamientos entre mutantes y la cepa silvestre de *Pycnoporus sanguineus* var. *osorninus* (cepa 470)

Cruzamientos	N° esporas analizadas	Fenotipo de basidiosporas descendientes				
		ad ⁻ :+	pro ⁻ :+	ilv ⁻ :+	col:+	pox ₁ ⁻ :+
470 x ad ⁻	140	52%:48%				
470 x pro ⁻	112	53%:47%				
470 x ilv ⁻	120	18%:82%				
470 x col	780	49%:51%				
470 x pox ₁ ⁻	110	14%:86%				

Las cepas mutantes fueron cruzadas con la cepa silvestre y se colectaron basidiosporas. Diluciones de estas cosechas fueron germinadas en agar extracto de malta al 1.5% y posteriormente probadas en los medios específicos (Apéndices 1, 2).
(+: fenotipo silvestre)

TABLA 6. Test de placa para fenoloxidasas. Los sustratos utilizados corresponden a guayacol y pirogalol. Estos sustratos fueron aplicados sobre hifas centrales y marginales y se observó cambio de coloración a las 24 y 48 hrs de aplicados.

Cepas	Guayacol		Pirogalol	
	Central	Marginal	Central	Marginal
470-6	++	++	++	++
pox ⁻ ₁	-	-	+	+
pox ⁻ ₂	-	+	-	+
pox ⁻ ₃	-	-	+	+
pox ⁻ ₄	-	+	+	+
pox ⁻ ₅	-	-	-	+

+ : cambios de color; - : ausencia de color.

3.7 Caracterización molecular de la actividad fenoloxidásica

Diferencias en actividad de lacasa

La cinética de actividad lacasa extracelular durante el cultivo de la cepa silvestre de Pycnoporus y de dos mutantes fenoloxidasas negativa en medio mineral basal y glucosa al 2% muestra una actividad detectable en la cepa silvestre alrededor del día 20, con un máximo de actividad alrededor del día 30. Esta actividad decae a un nivel basal alrededor del día 40. En los medios de cultivo en que fueron crecidas las mutantes fenoloxidasas negativas (pox_1^- y pox_4^-) no se detectó actividad enzimática de lacasa (Fig. 19).

La preparación de extracto crudo de la cepa mutante pox_1^- no reveló actividad enzimática de lacasa en relación a la actividad enzimática del extracto crudo de la cepa silvestre 470-6.

El máximo de actividad enzimática coincide temporalmente con el máximo de proteínas extracelulares totales detectadas en el medio de cultivo de la cepa silvestre (Fig. 20).

A pesar de estar ausente la actividad enzimática de lacasa en el medio de cultivo de estas mutantes, los niveles de proteínas extracelulares totales alcanzan valores, aunque temporalmente desfasados, relativamente próximos a los observados para la cepa silvestre (Fig. 20).

ACTIVIDAD LACASA EXTRACELULAR DETECTADAS DURANTE EL CULTIVO DE *Pycnoporus sanguineus* VAR. *Osorninus*

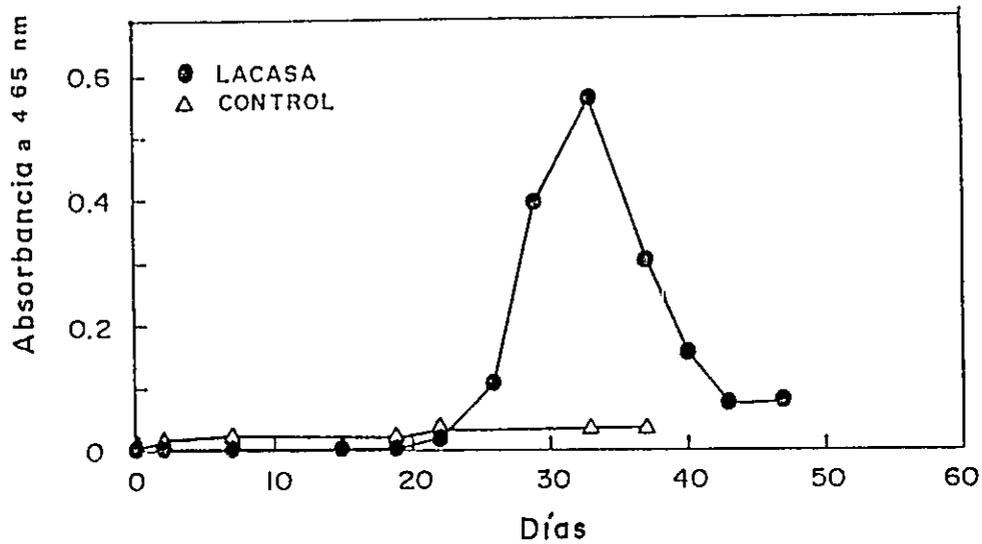


FIG. 19. Actividad enzimática de lacasa extracelular detectada durante el cultivo de *Pycnoporus sanguineus* var. *osorninus*. Como control se usó la enzima inactivada a 100°C por 5 minutos y como sustrato se usó guayacol 10 mM. Las cepas mutantes pox_1^- y pox_4^- no exhiben actividad lacasa tanto en el medio de cultivo como en extractos crudos.

PROTEINAS EXTRACELULARES DETECTADAS DURANTE
EL CULTIVO DE *Pycnoporus sanguineus* VAR. *Osorninus*

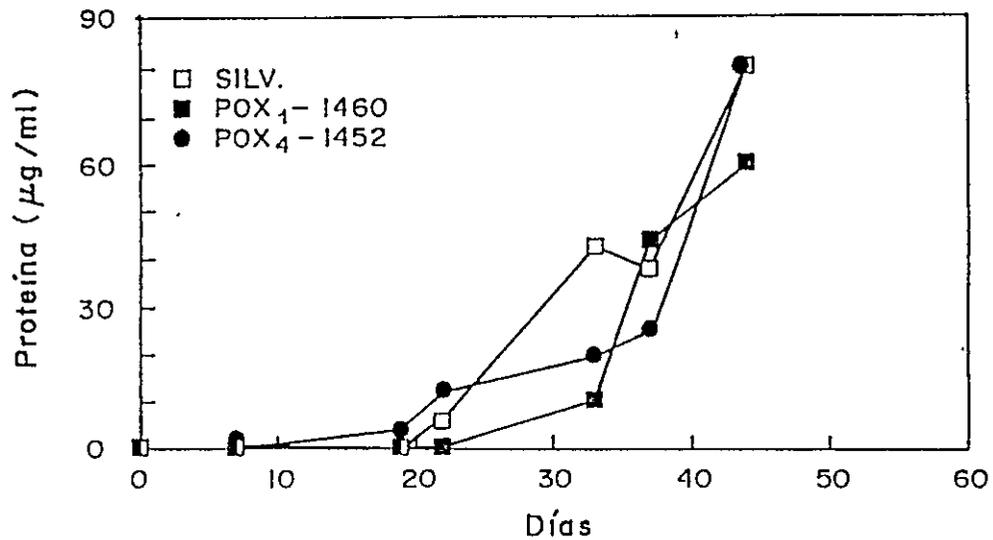


FIG. 20. Proteínas extracelulares totales detectadas durante el cultivo de *Pycnoporus sanguineus* var. *osorninus* y dos mutantes fenoloxidasa negativa (pox_1^- y pox_4^-). Las cepas fueron cultivadas en medio mineral basal y glucosa 2% p/v. Proteínas totales fueron detectadas por método de Lowry (1951).

Proteínas extracelulares

En un experimento preliminar, los micelios de las cepas 470-6 y la mutante pox_1^- fueron crecidos con agitación (130 rpm) a 30°C en matraces Erlenmeyer de 2 lt de capacidad que contenían 1 lt de medio mineral basal adicionado con glucosa 2% y tiamina 0,1 mg/ml, con el objeto de coleccionar y concentrar las proteínas extracelulares liberadas al medio de cultivo por ambas cepas.

La electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas acumuladas en el medio de cultivo líquido extracelular de la cepa silvestre de Pycnoporus 470-6, después de 15 días de incubación, muestra a lo menos 16 bandas diferentes. Las bandas de mayor intensidad de acuerdo al estándar de peso molecular (Da) son: una banda de 180.000; dos bandas entre 116.000 y 84.000; dos bandas entre 84.000 y 58.000; una banda entre 58.000 y 48.500; tres bandas entre 48.500 y 36.500; una banda entre 36.500 y 26.600; una banda de migración muy por debajo del estándar de 26.600 (Fig. 21, columnas A y D).

Al analizar las proteínas extracelulares producidas por una mutante pox_1^- es posible observar una reducción considerable en la intensidad de la mayoría de las bandas. Se destaca una de mayor intensidad que corresponde a la ubicada entre 36.500 y 26.600 (Fig. 21, columnas C y F), y la ausencia de las bandas ubicadas entre los estándares 116.000 y 58.000.



FIG. 21. Electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas extracelulares de Pycnoporus sanguineus var. osorninus.

Los micelios de las cepas 470-6 y pox_1^- fueron crecidas con agitación (130 rpm) a 30°C en 1 lt de medio mineral basal adicionado con glucosa 2% y tiamina 0,1 mg/ml.

Las proteínas extracelulares liberadas al medio de cultivo fueron concentradas 1.000 x con sulfato de amonio 80% (Schleif et al., 1981). Se cargaron 10 μl de muestra por carril. Los carriles A y D contenían proteínas extracelulares de la cepa 470-6; los carriles B y E corresponden a estándar de peso molecular contenidos en MW-SDS Blue Kit (Apéndice 3). C y F contenían proteínas extracelulares de la cepa mutante fenoloxidasa negativa pox_1^- .

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el estudio de la variedad Pycnopus aislada en el bosque del Sur de Chile, indican que es un organismo heterotrófico para compuestos carbonados y vitaminas tales como tiamina, biotina o piridoxina. Sus requerimientos nutricionales en cultivos en el laboratorio son satisfechos con azúcares simples, tales como glucosa o sacarosa, sales minerales, una fuente de nitrógeno inorgánica y agua.

De los estudios de crecimiento a diferentes temperaturas y pHs, se concluye que esta cepa es euritérmica y de crecimiento en pH ácido. Los pHs básicos son inhibidores de su crecimiento. Su temperatura de crecimiento óptima es 35°C.

Las hifas constituyen la unidad estructural básica de Pycnopus, las cuales crecen en forma apical. Las hifas son capaces de ramificarse a distancias regulares para formar un micelio que crece marginalmente con simetría radial. Cuando este crecimiento lineal es lento y está asociado con ramificación proximal, el micelio forma una colonia discreta, restringida espacialmente. Esta situación de crecimiento restringido es inducido también por la adición de L-sorbosa en el medio de cultivo. Aunque Pycnopus es sensible a esta hexosa, una concentración de L-sorbosa de 2% p/v es aún insuficiente para inducir crecimiento colonial.

La condición de crecimiento del micelio puede ser modificada por fusión hifal, transformándose en una red tridimensional. Esta propiedad posibilita que varios micelios genéticamente distintos lleguen a estar asociados en una única unidad fisiológica. Una importante propiedad de sus núcleos es que ellos pueden migrar a lo largo de las hifas y a través de los poros en los septos incompletos (Hudson, 1986).

La esporulación en este basidiomicete es en forma de conidiosporas. Artroconidios se originan externamente a una hifa como resultado de repetidos procesos de fragmentación. Las clamidosporas son estructuras intercalares que se desarrollan dentro de la hifa. Ellas, por lo general, adquieren paredes gruesas y su citoplasma acumula material lipídico y glicógeno. Generalmente son multinucleadas. El sulfato de amonio, como fuente de nitrógeno y de alguna forma la concentración de oxígeno, regulan la formación de este tipo de estructuras (Fig. 1).

La utilización de distintas fuentes de nitrógeno permite detectar la influencia de este elemento en el fenotipo del micelio, como también el efecto regulador de estos compuestos en la producción de enzimas excretadas por este hongo.

El marcado efecto que tiene en el fenotipo del micelio de Pycnoporus el tipo de compuesto nitrogenado utilizado en el medio de cultivo, inducen a pensar en la existencia de genes

reguladores del tipo are A en estas cepas, como el descrito para Aspergillus, un gen regulador que es central a la represión catabólica del nitrógeno.

Pycnoporus es sensible al análogo de amino ácido D-L-p fluorofenilalanina, inhibidor competitivo que provoca alteraciones en el metabolismo celular. Esta característica puede resultar útil en el control de la dispersión de este hongo.

La utilización de análogos de amino-ácidos en relación con los mecanismos de regulación enzimática ha sido estudiada, así por ejemplo, Horowitz et al. (1961) informan que la actividad de fenol-oxidasa en cultivos de Neurospora crassa puede ser inducida exponiendo los cultivos a concentraciones limitantes de los nutrientes principales o por la presencia de análogos de amino-ácidos en el medio de cultivo.

Wichers et al. (1985) encontró que la limitación de compuestos que contienen nitrógeno en el medio, o bien la adición de p-fluorofenilalanina o etionina al medio de cultivo, resultó en una actividad fenoloxidasa aumentada de una suspensión de células de Mucuna pruriens.

La incorporación de p-fluorofenilalanina en el medio de cultivo de Pycnoporus y la determinación de las concentraciones a las cuales este análogo de amino-ácido resulta inhibitorio para la expansión de su colonia posibilita, por otro lado, el estudio del efecto que este compuesto pudiera tener en la regulación de la actividad de las fenoloxidasas que este organismo produce.

Los resultados obtenidos (Tabla 2) al cruzar la var. osorninus con las otras especies de Pycnopus permiten concluir incompatibilidad sexual con Pycnopus cinnabarinus y la compatibilidad sexual con Pycnopus sanguineus.

El cruzamiento entre cepas de una misma especie, provenientes de áreas geográficas distintas, normalmente conduce a resultados positivos en todas las combinaciones en que participan los cuatro polos monospóricos de cada cepa heterocariótica (Nobles y Frew, 1962). Ello es explicado por la gran variedad de alelos sexuales que existen en los Himenomicetes (Burnett, 1975). Esto es lo que se observa en el resultado del cruzamiento entre las dos cepas de P. sanguineus, proveniente de Uruguay y de Argentina. Sin embargo, el estudio de esta especie con la variedad osornina produce resultados positivos sólo en un 25% de los casos. Esto podría interpretarse como una manifestación de restricciones del flujo génico entre las poblaciones subtropicales de la costa atlántica y las poblaciones chilenas de clima temperado y frío, separadas por una barrera geográfica tan importante como es la cordillera de Los Andes y por las diferentes condiciones bioclimáticas de cada área.

Los carpóforos chilenos fueron previamente distinguidos de los carpóforos clasificados como P. sanguineus, por su forma, tamaño del carpóforo y grosor del himenóforo.

Así la especie chilena puede considerarse como Pycnoporus sanguineus variedad osorninus tomando en cuenta las diferencias sexuales y morfológicas entre los carpóforos del Atlántico y las cepas chilenas.

La capacidad de este hongo de producir grandes números de conidios idénticos, predominantemente haploides, le confiere utilidad en la investigación de mutaciones espontáneas e inducidas.

Las mutaciones que crean cambios en la secuencia de pares de bases suministran sitios identificables en su material genético. Estos sitios considerados como marcadores genéticos pueden ser utilizados para describir genes de interés, en el trazado de mapas o en la identificación de determinadas regiones del genoma.

Si bien es cierto que a partir de un mapa de restricción se puede determinar la secuencia del DNA entre puntos que están suficientemente próximos, las mutaciones, sin embargo, siguen siendo esenciales para identificar la función de los productos de los genes.

Además los marcadores genéticos obtenidos serán de utilidad en el diseño de sistemas de clonado de genes de interés; en experimentos de transformación de estos hongos y en general en la aplicación de las técnicas de ingeniería genética sobre el material genético de esta especie.

La luz ultravioleta de 254 nm resultó ser un agente mutagénico potente para Pycnoporus. Su acción se ve favorecida por poseer este hongo esporas hialinas y al realizar los experimentos de mutagénesis cuando el cultivo está en fase logarítmica de crecimiento.

La mutante morfológica de Pycnoporus denominada col está afectada en los rasgos vegetativos de crecimiento, los cuales determinan un cambio morfológico de toda la colonia. Los resultados de los cruzamientos de esta cepa con la cepa silvestre permiten concluir que esta cepa no tendría problemas reproductivos y sería estable fenotípica y genotípicamente. La lesión en su material genético parece ser de carácter simple, dada la segregación de 1:1 obtenida en cruzamiento con la cepa silvestre.

La lesión en las mutantes ad^- y pro^- es también del tipo simple, como lo sugiere la reiterada segregación 1:1 del carácter indicado en los cruzamientos con la cepa silvestre. La velocidad de crecimiento de ad^- en medio suplementado con adenina supera ligeramente a la cepa silvestre.

Los cruzamientos de las mutantes ilv^- y pox^- con la cepa silvestre inducen a pensar en la existencia de lesiones del material genético que afectan a más de un gen. Estos resultados sugieren diferentes explicaciones. Una podría ser suponer dos genes involucrados en la lesión de la mutante ilv^- y que basta con que uno de ellos esté en la condición silvestre para que se restaure la vía metabólica.

Complementariamente, el análisis de la descendencia de los cruzamientos entre las mutantes fenoloxidasa negativa y la cepa silvestre da cuenta de un gradiente en la magnitud de los halos en torno a las colonias cuando estas son crecidas en medios que contienen ácido tánico.

Si se examinan los descendientes de este cruzamiento se encuentra que difieren en el grado de expresión de la capacidad de oxidar ácido tánico. Si se supone que este fenotipo es cuantitativo podrían ponerse a prueba las siguientes hipótesis de factores múltiples:

- i) los caracteres cuantitativos están determinados por numerosos pares alelomórficos de genes,
- ii) estos genes duplican sus efectos que son aditivos,
- iii) la contribución de cualquier alelo individual al fenotipo neto es tan pequeña que podría ser explicada por variación ambiental.

La variación observada puede tener diversos orígenes, algunos debidos a variación ambiental y otros a causas genéticas. Entre estas últimas es útil conocer cuántos factores efectivos están segregando, cuánto es debido a acción acumulada y cuánta es debida a interacción génica, como por ejemplo epistasis.

Los organismos haploides pueden ser analizados por los componentes de las medias de la variación.

Aspectos bioquímicos

El análisis del medio de cultivo líquido de la cepa silvestre de Pycnopus muestra que este hongo es capaz de exportar al medio de cultivo gran número de proteínas, entre las cuales están incluidas las fenoloxidasas.

La cepa silvestre de Pycnopus exporta al medio de cultivo un cierto número de proteínas de los cuales al menos tres tienen un peso molecular similar al de las ligninasas descritas y a lo menos cuatro proteínas en el rango de peso molecular descrito para lacasas.

La mutante pox^{-1} exhibe diferencias en este respecto. Por un lado las bandas correspondientes a posibles ligninasas están expresadas en forma muy tenue y las correspondientes a posibles lacasas están ausentes. Estos resultados son corroborados por los tests de placa que utilizan guayacol como sustrato para lacasa y pirogalol como sustrato para peroxidasa. La mutante da reacción negativa con el sustrato de lacasa y positivo pero con menor intensidad relativa para pirogalol. Estos resultados apuntan a concluir que esta mutación estaría afectando al material genético que controla la producción de lacasa y de algún modo aunque indirectamente la producción de peroxidadas.

Los resultados de las cinéticas de excreción de proteínas y de actividad enzimática de lacasa, permiten concluir que esta enzima se produce en la cepa silvestre, algo tardíamente en el desarrollo del hongo. Probablemente la glucosa estaría jugando un

papel en la represión de la expresión génica de lacasa, gracias a la existencia de un sistema general coordinador del tipo "represión por catabolito". Este sistema ejercería una preferencia por la glucosa, inhibiendo la expresión de los genes que codifican las enzimas de pasos metabólicos alternativos.

La mutante pox_1^- no parece estar afectada en funciones de excreción de proteínas. Con el fin de investigar a qué nivel molecular afecta la lesión provocada por la mutación, se han realizado intentos de purificar la lacasa producida por la cepa silvestre.

Con respecto a las mutantes fenoloxidasa negativas, será necesario realizar una mayor caracterización de su rol en el proceso de degradación de lignina que este hongo realiza.

PROYECCIONES

Los estudios realizados hasta ahora en Pycnoporus sanguineus demuestran que este organismo constituye un material apto para futuros estudios genéticos y aplicación biotecnológica. Desde luego posee muchas de las características de otras especies de este basidiomicete aislados en el hemisferio norte y que han sido sometidas a intensa investigación a fin de esclarecer la problemática de la degradación de la lignina.

Desde luego está abierta la posibilidad de obtener otras cepas mutantes e investigar en que forma las mutantes pox^- están modificadas en su capacidad de degradar lignina.

La caracterización bioquímica de los productos liberados por estas cepas permitirá establecer las bases moleculares de las múltiples isoenzimas; cuál es el rol de la glicosidación en la actividad y estabilidad de muchas proteínas; cuál es la máxima expresión de las enzimas ligninolíticas.

Pycnoporus puede ser útil para resolver muchas interrogantes tales como : ¿cuáles son los roles en el proceso ligninolítico de glucanos extracelulares, alcohol veratrílico, manganeso y glutamato? ¿cuáles son los detalles acerca de la inducción y regulación de las enzimas que degradan lignina? ¿cuál es la relación entre reacciones de consumo de energía y de producción de energía durante la degradación de lignina?

Un conocimiento adecuado del proceso de deslignificación que los hongos filamentosos desarrollan puede conducir hacia el uso de técnicas biológicas mediante las cuales los enormes residuos lignocelulósicos forestales pueden ser procesados a azúcar, alcohol u otros solventes orgánicos y proteínas.

Por otro lado, la industria del papel y la celulosa pueden utilizar microorganismos para remover la lignina incrustada en la celulosa, en vez del tratamiento químico actual, que a pesar de ser rápido, es muy costoso y provoca grandes problemas de contaminación al producir miles de toneladas de lignina kraft.

Los procesos de deslignificación microbiana pueden también ser utilizados para el tratamiento de estas aguas residuales, orientado hacia la conversión de compuestos fenólicos útiles y polímeros modificados de lignina de interesantes perspectivas futuras.

El conocimiento de las fenoloxidasas ha sido aplicado principalmente al procesar alimentos ya sea para prevenir su coloración café o facilitar la reacción de la enzima cuando se desee. Como resultado de la actividad de las polifeniloxidasas se forman productos coloreados altamente reactivos a menudo moléculas condensadas de peso molecular más alto que el sustrato original de la enzima. Estos compuestos aparecen en muchos productos alimentarios como el resultado de la reacción de oxidación accidental o debido al deliberado diseño de procesamiento que lleve a tal formación de color. La degradación de antocianinas causada por fenoloxidasas puede también resultar

en reducida calidad de frutas, verduras y sus productos. En contraste, en el secado del té, tostado del café o fermentación de la cocoa, la acción de fenoloxidasas es un paso inicial en obtener el producto deseado.

Los hongos degradadores de lignina pueden ser utilizados en la producción de humus. Los compuestos fenólicos que intervienen en la formación de ligninas, tales como los ácidos p-cumárico, cinámico y caféico, que se encuentran en altas concentraciones en suelos de origen orgánico por degradación microbiana de la madera, pueden actuar también como inhibidores químicos de la germinación de las semillas. Aunque ha sido definido que puede haber efectos interrelacionados entre luz y cumarina, lo más probable es que la acción inhibitoria de estos compuestos esté en relación, bien con su carácter antiauxínico, o bien con la capacidad de los fenoles de inactivar enzimas.

REFERENCIAS

1. Ainsworth, A.M. y A.D.M. Rayner (1986). Responses of living hyphae associated with self and non-self fusions in the basidiomycete Phanerochaete velutina. J. Gen. Microbiol. 132: 191-201.
2. Ander, Paul and Karl-Erick Eriksson. 1977. Selective degradation of wood component by white-rot fungi. Physiol. Plant 41: 239-248.
3. Arora, D.S. and D.K. Sandhu. 1985. Laccase production and wood degradation by a white-rot fungus Daedalea flavida. Enzyme Microb. Technol. 7: 405-408.
4. Aylmore, R.C. y N.K. Todd. 1986. Cytology of self fusions in hyphae of Phanerochaete velutina. J. Gen. Microbiol. 132: 571-579.
5. Aylmore, R.C. y N.K. Todd. 1986. Cytology of non-self hyphal fusions and somatic incompatibility in Phanerochaete velutina. J. Gen. Microbiol. 132: 581-591.
6. Bavendamm, W. 1928. Uber das workkommen und den Nachweiss von Oxydasen bei holzzerstorenden Pilzen. Z. Pflkrankh 38: 257-276.

7. Bell, U. 1981. Biochemistry of disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 21.
8. Burgos, J.y S. Ortíz. 1988. Crecimiento de basidiomicetes lignícolas en distintos medios de cultivo, temperaturas y pH. IV Taller de Aprovechamiento de Recursos Lignocelulósicos. Temuco. Universidad de La Frontera.
9. Burgos, J.A. y S.E. Ortíz. 1988. Nueva variedad chilena de Pycnoporus cinnabarinus (Jacq:Fr.) Karst. Estudio de sus características morfológicas y fisiológicas. *Bol. Micol.* 3(4): 227-235.
10. Burnett, J.H. 1975. *Mycogenetics*. Ed. John Wiley & Sons.
11. Casselton, L.A. 1965. The production and behaviour diploids of Coprinus cinereus. *Genet. Res.* 6: 190-208.
12. Cifuentes, V. y C. Martínez. 1990. Cariotipo electroforético de Pycnoporus cinnabarinus. XXIII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. p. 44.
13. Coates, D. y A.D.M. Rayner. 1985. Evidence for a cytoplasmically transmissible factor affecting recognition and somato-sexual differentiation in the basidiomycete Stereum hirsutum. *J. Gen. Microbiol.* 131: 207-219.

14. Davis, R.W., D. Botstein, J.R. Roth. 1980. A manual for genetic engineering. Advanced Bacterial Genetic. Cold Spring Harbor Laboratory.
15. Day, P.R. and C.F. Roberts. 1969. Complementation in dikaryons and diploids of Coprinus lagopus. Genetics 62: 265-270.
16. De Vries, D.M.H., W.H.C.F. Kooistra y J.G.H. Wessels. 1986. Formation of an extracellular laccase by a Schizophyllum commune dikaryon. J. Gen. Microbiol. 132: 2817-2826.
17. Fincham, J.R.S. y P.R. Day. 1971. Fungal Genetics. Third Edition. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh.
18. Gold, M.H., T.M. Cheng, M. Alic. 1983. Formation, fusion, and regeneration of protoplasts from wild-type and auxotrophic strains of the white-rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 46: 260-263.
19. Hammel, K.E., B. Kalyanaraman, T.K. Kirk. 1986. Substrate free radicals are intermediates in ligninase catalysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8708-12.

20. Haylock, R.A., R. Liwicki, P. Broda. 1985. The isolation of mRNA from the basidiomycete fungi Phanerochaete chrysosporium and Coprinus cinereus and its in vitro translation. J. Microbiol. Methods 41: 55-62.
21. Hudson, Harry J. 1986. Fungal Biology. Edward Arnold.
22. Käärrik, A. 1965. The identification of the mycelia of wood decay fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds. Studia Forest Suec. 31: 1-38.
23. Kersten, P.J., M. Tien, B. Kalyanaraman, T.K. Kirk. 1985. The ligninase of Phanerochaete chrysosporium generates cation radicals from methoxy-benzenes. J. Biol. Chem. 260: 2609-2612.
24. Kirk, T.K. 1971. Effects of microorganisms on lignin. Ann. Rev. Phytopathol. 9: 185-210.
25. Kirk, T.K. and E.B. Cowling. 1984. Biological decomposition of solid wood. Adv. Chem. Ser. 207: 455-487.
26. Kirk, T.K. and M. Tien. 1986. Production of multiple ligninases by Phanerochaete chrysosporium: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. Enzyme Microb. Technol. 8: 27-32.

27. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature, London* 227: 680-685.
28. Lowry, O., N. Rosenbrough, A. Farr, R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
29. Mayer, A.M. and E. Harel. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochem.* 18: 193-215.
30. Mills, D.J. and A.H. Ellingboe. 1969. A common - AB diploid of Schizophyllum commune. *Genetics* 62: 271-279.
31. Miyakawa, T., T. Tachikawa, R. Akada, E. Tsuchiya y S. Fukui. 1986. Involvement of Ca²⁺/Calmodulin in sexual differentiation induced by mating pheromone rodotorucine A in Rhodospiridium toruloides. *J. Gen. Microbiol.* 132: 1453-1457.
32. Nobles, M.K. and B.P. Frew. 1962. Studies in wood inhabiting Hymenomyces V. The genus *Pycnoporus* Karst. *Can. J. Bot.* 40: 987-1016.

33. Ortíz, S. y G. Pincheira. 1990. Ciclo de vida e inducción de mutaciones en cepa chilena del basidiomicete de pudrición blanca Pycnoporus sanguineus var. osorninus. XXIII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. p. 54.
34. Ortíz, S., J. Venegas y G. Pincheira. 1991. Caracterización de una mutante fenoloxidasa negativa en el hongo Pycnoporus sanguineus. XXIV Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. p. 38.
35. Otjen, L., R.A. Blanchette. 1986. A discussion of microstructural changes in wood during decomposition by white rot basidiomycete. Can. J. Bot. 64: 905-911.
36. Parag. Y. and B. Nachman. 1966. Diploidy in the tetrapolar heterothallic basidiomycete Schizophyllum commune. Heredity 21: 151-154.
37. Pincheira, G., J. Burgos y S. Ortíz. 1990. Compatibilidad sexual entre Pycnoporus cinnabarinus var. osorninus y Pycnoporus sanguineus. Bol. Micol. 5 (1-2): 9-12.
38. Sakagami, Y., M. Yoshida, A. Isagai y A. Suzuki. 1981. Peptidal sex hormones inducing conjugation tube formation in compatible mating-type cells of Tremella mesenterica. Science (Wash. D.C.) 212: 1525-1527.

39. Sannia, G., P. Giardina, M. Luna, M. Rossi y V. Buonocore. 1986. Laccase from Pleurotus ostreatus. Biotech. Lett. 8 (11): 797-800.
40. Swamy, S., I. Uno y T. Ishikawa. 1984. Morphogenetic effects of mutations at the A y B incompatibility factors in Coprinus cinereus. J. Gen. Microbiol. 130: 3219-3224.
41. Swamy, S., I. Uno y T. Ishikawa. 1985. Regulation of cyclic AMP metabolism by the incompatibility factors in Coprinus cinereus. J. Gen. Microbiol. 131: 3211-3217.
42. Stalpers, J.A. 1978. Identification of wood inhabiting fungi in pure culture. Studies in Mycology 16: 76.
43. Schleif, R.F. and P.C. Wensink. 1981. Practical methods in Molecular Biology. Springer-Verlag New York Inc.
44. Tien, M. y T.K. Kirk. 1983. Lignin degrading enzyme from the hymenomycete Phanerochaete chrysosporium Burds. Science 221: 661-662.
45. Tien, M., Kirk, T.K. 1984. Ligning degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium. Purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2280-2284.

46. Tien, M. y Chen-Pein, D. Tu. 1987. Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from Phanerochaete chrysosporium. Nature 326: 520-23.

47. Walker, J. 1975. The biology of plant phenolics. Edward Arnold (Publishers) Limited. London. p. 33.

48. Wessels, J.G.H., G.H. Mulder y J. Springer. 1987. Expression of dikaryon-specific and non-specific mRNAs of Schizophyllum commune in relations of environmental conditions and fruiting. J. Gen. Microbiol. 133: 2557-2561.

49. Wichers, H.J., T.M. Malingré and H.J. Huizing. 1985. Induction of phenoloxidase in cell suspension culture of Mucuna pruriens L. Planta 165: 264-268.

APENDICE 1

SUPLEMENTOS NUTRICIONALES

Se da una lista de los suplementos nutricionales usados para el trabajo con cepas mutantes de Pycnoporus. Las soluciones stock son tales que 5 ml de la solución agregados a 1 litro de medio resultó en la concentración apropiada para la recuperación del crecimiento de las cepas mutantes.

Nutriente	Solución stock (%)
Adenosina	2,67
Alanina	0,84
Arginina	2,53
Asparagina	0,84
Aspártico ácido	1,0
Cisteína	0,73
Diamino pimélico ácido (DAP)	0,38
Glutamina	14,6
Glicina	0,2
Guanosina	1,7
Histidina	0,31
Isoleucina	0,79
Leucina	0,79
Lisina	1,1
Metionina	0,9
Fenilalanina	0,99
Prolina	4,6
Serina	8,4
Tiamina	0,33
Treonina	0,71
Timina	0,81
Triptofano	0,41
Tirosina	0,36
Uracilo	0,22
Valina	0,7

APENDICE 2

DIAGNOSIS DE AUXOTROFOS

Se da la composición de los suplementos nutricionales agregados al medio mínimo, que permitió determinar los requerimientos de las cepas mutantes. La composición de los medios 1-5 son listados en forma vertical. La composición de los medios 6-10 son listados horizontalmente.

	1	2	3	4	5
6	adenosina	guanosina	cisteina	metionina	tiamina
7	histidina	leucina	isoleucina	lisina	valina
8	fenilalanina	tirosina	triptofano	treonina	prolina
9	glutamina	asparagina	uracilo	aspártico	arginina
10	timina	serina	glutámico a	DAP	glicina

Algunas mutantes purina crecen en adenosina o guanosina; crecen en los medios 1, 2 y 6.

Mutantes que requieren isoleucina y valina crecen en el medio 7.

Mutantes con bloqueo en la vía de los aminoácidos aromáticos crecen en el medio 8.

Se usó sales de ácido aspártico y glutámico.

Las soluciones que contienen triptófano son mantenidas en la oscuridad.

APENDICE 3

Proteínas incluidas en el MW-SDS Blue Kit

Proteínas	- Peso molecular aprox. dalton (subunidad)
α macroglubulina (plasma humano)	180.000
B galactosidasa (<u>E. coli</u>)	116.000
Fructosa-6-fosfato quinasa (músculo de conejo)	84.000
Piruvato quinasa (músculo de pollo)	58.000
Fumarasa (músculo de pollo)	48.500
Deshidrogenasa láctica (músculo de conejo)	36.500
Triosa fosfato isomerasa (músculo de conejo)	26.600

APENDICE 4

Soluciones stock utilizadas en la electroforesis de geles de poliacrilamida.

- ABA: acrilamida 30 g, bis acrilamida 0,8 g, agua destilada hasta completar 100 ml.
- Buffer "lower" pH 8,8: Tris 6,055 g, HCl 6N para llegar a pH 8,8, SDS 10% 4 ml, agua destilada hasta completar 100 ml.
- Buffer "upper" pH 6,8: Tris 6,055 g, HCl 6N para llegar a pH 6,8, SDS 10% 4 ml, agua destilada hasta llegar a 100 ml.
- Persulfato de amonio 100 mg/ml. Se prepara en el momento de usar.
- TEMED
- Buffer de electroforesis pH 8,3: Tris 3,03 g, glicina 14,4 g, SDS 10% 10 ml, agua destilada hasta completas 1 lt.
- Buffer de muestra 2 x): glicerol 20%, mercaptoetanol 10%, SDS 5%, Tris 1,25 mM, azul de bromofenol 0,01%.