



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Pycnoporus*
EMPLEANDO COMO MARCADOR MOLECULAR EL GEN DE LA
LACASA**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

FRANCISCO DAMIAN RIOS MORALES

ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL

CUERNAVACA, MORELOS

mayo, 2022

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Basidiomicetos.....	2
1.2. Hongos de la pudrición blanca: el sistema ligninolítico	3
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Características de <i>Pycnoporus</i>	4
2.2. Distribución de <i>Pycnoporus</i>	5
2.2.1. Distribución mundial	5
2.2.2. Distribución en México.....	6
2.2.3. Distribución en el estado de Morelos	7
2.3. Usos de <i>Pycnoporus</i> : moléculas de importancia biotecnológica e industrial	8
2.4. Identificación molecular en hongos y marcadores utilizados	9
3. JUSTIFICACIÓN.....	12
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	13
5.1. Objetivo general.....	13
5.2. Objetivos específicos	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1. Material biológico.....	14
6.2. Cultivo y obtención del micelio	14
6.3. Extracción de ADN	14
6.4. Amplificación del gen lacasa por PCR	15
6.5. Electroforesis en gel de agarosa.....	18
6.6. Purificación del producto de PCR	18
6.7. Análisis bioinformático.....	18
6.8. Análisis filogenético.....	19
7. RESULTADOS.....	19
7.1. Extracción de ADN	19
7.2. Amplificación de la secuencia del gen lacasa por PCR.....	20
7.3. Análisis bioinformático.....	22
7.4. Análisis filogenético.....	24

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	Error! Bookmark not defined.
9. LITERATURA.....	Error! Bookmark not defined.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo reproductivo típico de un basidiomiceto.....	2
Figura 2. Píleo e himenóforo de especies del género <i>Pycnoporus</i>	5
Figura 3. Distribución de <i>Pycnoporus</i> en el mundo.	6
Figura 4. Áreas de distribución de <i>Pycnoporus</i> en México	7
Figura 5. Distribución de <i>Pycnoporus</i> en el estado de Morelos.....	8
Figura 6. Representación esquemática de las regiones estudiadas del DNAr y los diferentes oligonucleótidos.	10
Figura 7. Cepa HEMIM-53.....	14
Figura 8. Sitios de unión de los oligonucleótidos utilizados (F2, RL3, FL3, RL4, FL4 y R8).....	20
Figura 9. Gel de electroforesis 0.8% con las bandas obtenidas de la extracción de ADN.. ..	21
Figura 10. Gel de agarosa 0.8% con las bandas del producto de PCR del fragmento 1 de la secuencia del gen lacasa.....	21
Figura 11. Gel de agarosa 0.8% con las bandas del producto de PCR del fragmento 2 de la secuencia del gen lacasa.....	23
Figura 12. Análisis Blast del fragmento 1 de la secuencia del gen lacasa.....	24

Figura 13. Análisis Blast del fragmento 2 de la secuencia del gen lacasa.	25
Figura 14. Árbol filogenético con el fragmento 1 de la secuencia del gen lacasa obtenido del programa MEGA SOFTWARE.....	26
Figura 15. Árbol filogenético con el fragmento 2 de la secuencia del gen lacasa obtenido del programa MEGA SOFTWARE.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos para las secuencias de lacasa.	15
Tabla 2. Compuestos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa.....	16
Tabla 3. Condiciones de la reacción de PCR para el fragmento 1 del gen lacasa.	17
Tabla 4. Condiciones de la reacción de PCR para el fragmento 2 del gen lacasa.	17
Tabla 5. Condiciones de la reacción de PCR para el fragmento 3 del gen lacasa.	17
Tabla 6. Cuantificación de ADN.....	19
Tabla 7. Características del oligo FL4 rediseñado.....	22
Tabla 8. Cuantificación de los productos de PCR de los fragmentos 1 y 2 del gen lacasa.	22

ABREVIATURAS

MnP- Manganese peroxidase.

LiP- Lignin Peroxidase.

RFLP- Restriction fragment length polymorphism.

RAPDs- Random amplification of polymorphic DNA.

ITS- Internal transcribed spacer.

ADN- Ácido desoxirribonucleico.

ARN- Ácido ribonucleico.

HIT- Medio de cultivo solido hecho de harina integral de trigo.

PCR- Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés: Polymerase chain reaction).

CEIB- Centro de investigación en Biotecnología.

CIB- Centro de investigaciones biológicas.

HEMIM- Herbario Micológico de Morelos.

Spp- Varias especies del mismo género.

Taq- *Thermus aquaticus*.

P. annosus- Pycnoporus annosus.

P. epilobii- Pycnoporus epilobii.

P. mimicus- Pycnoporus mimicus.

P. serialis- Pycnoporus serialis.

P. sanguineus- Pycnoporus sanguineus.

P. coccineus- Pycnoporus coccineus.

P. cinnabarinus- Pycnoporus cinnabarinus.

P. puniceus- Pycnoporus puniceus.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mi madre y a mi padre, que gracias a su apoyo pude iniciar y concluir mi carrera profesional; a mis hermanas que con su amor y palabras de aliento me motivaron a salir adelante; a mi amada esposa, que gracias a su compañía, me sentí con mucha confianza; a mi hija Rebeca, mi princesa mágica, el sol que ilumina mi vida, la persona que me motiva a salir adelante y ser mejor persona.

Cuando tengas la edad suficiente para leer y comprender esto, hija, quiero decirte que te amo y que te deseo lo mejor, esfuérzate para conseguir lo que anhelas, sea lo que sea, te apoyaremos madre y yo, se feliz y haz las cosas con amor, para que lo disfrutes. No importa la edad que tengas siempre serás mi bebé y no importa la edad que yo tenga, siempre te amare con la misma intensidad de cuando naciste.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en general a toda mi familia, por su amor, su apoyo y sus palabras de aliento; a la Dra. Elba Villegas, por abrirme las puertas a su laboratorio; a mis compañeros de laboratorio, por sus consejos y enseñanzas que me brindaron; a mis sinodales, que gracias a sus correcciones pude concluir con este proyecto; y en especial agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y a mi querida facultad de biología, lugar en el que obtuve amistades, experiencias únicas y sobre todo, gran conocimiento sobre esta hermosa ciencia, gracias porque aquí pude desarrollarme profesionalmente.

RESUMEN

Pycnoporus es un género de hongo basidiomiceto que se encuentra estrechamente relacionado con *Trametes* siendo morfológicamente similar, pero contrario a su color verdoso, grisaseo, pardo oscuro de éste. De acuerdo con Lomascolo *et al.* (2011) este género presenta tres características principales:

- 1) Producir metaloenzimas de cobre y hierro implicadas en los compuestos de las paredes de las células vegetales.
- 2) Poseer una ruta metabólica que involucra la funcionalidad de los compuestos aromáticos de la pared celular para dar alto valor añadido a compuestos como aromas y antioxidantes.
- 3) Capacidad para producir cuerpos fructíferos y líneas celulares monocarióticas en condiciones de cultivo de laboratorio.

Las especies de *Pycnoporus* tienen un intenso color rojo-anaranjado (Ryvarden, 1991; Ryvarden y Gilbertson, 1994) y el género comprende 8 especies: *P. annosus*, *P. epilobii*, *P. mimicus*, *P. serialis*, *P. sanguineus*, *P. coccineus*, *P. cinnabarinus* y *P. puniceus*. Habitualmente la identificación de las especies se basa en sus características morfológicas macro y microscópicas, así como su distribución geográfica en el mundo (Nobles y Frew, 1962), además, los metabolitos primarios y secundarios que produce el género *Pycnoporus* exhiben características diferenciales dependientes de cada especie y sus condiciones de cultivo, entre ellos enzimas ligninolíticas. Sin embargo, la separación entre especies de *Pycnoporus*, es decir *P. sanguineus*, *P. cinnabarinus*, *P. coccineus* y *P. puniceus* sigue siendo difícil, sobre todo a nivel morfológico macroscópico porque las características que presentan son muy similares (Eggert *et al.*, 1998; Lomascolo *et al.*, 2011; Lesage-Meessen *et al.*, 2011; Coronel, 2016; Díaz, 2015; Andrade, *et al.*, 2020), es decir el carpóforo presenta un píleo el cual puede medir de 1 a 9 centímetros, el ancho 2-6 centímetros y un espesor que va de 0.2 a 2 centímetros. Los colores van de la escala del rojo al anaranjado, himenio poroso, típicamente sésiles, consistencia corchosa, esporas de color blanquecinas con forma ovalada,

cilíndrica o piramidal. Se puede diferenciar a estas especies mediante un estudio detallado en cuanto a la morfología del cuerpo fructífero, esporas e hifas.

La identificación por medio de técnicas moleculares de genes que comprenden secuencias ITS del ADN ribosómico, β -tubulina y enzimas como ARN polimerasa, celobiohidrolasa-C, topoisomerasa II, manganeso peroxidasa o lacasas ha sido de gran ayuda especialmente en hongos basidiomicetos (Eggert *et al.*, 1998; Lomascolo *et al.*, 2002). Sin embargo, existen pocos trabajos a nivel internacional y nacional donde se empleen más de tres marcadores moleculares de identificación de hongos basidiomicetos. En este trabajo se propuso la identificación de la cepa de *Pycnoporus* HEMIM-53 proveniente de Quilamula, Tlaquiltenango, del estado de Morelos, para determinar si pertenece a la especie *P. coccineus* usando oligonucleótidos dirigidos al gen lacasa de 1646 pb, amplificándolo en tres fragmentos (566, 584 y 496 pb). Se lograron amplificar los primeros dos fragmentos: fragmento 1, de 531 pb y el fragmento 2, de 513 pb, que, juntos equivalen al 63.42% de las bases totales del gen, los resultados sugieren que el fragmento de 531 pb representa el 32.26% del gen completo y pertenece a la especie *P. sanguineus* con un 96% de identidad y a la especie *P. coccineus* con un 80.61%. El fragmento de 513 pb representa el 31.16% del gen total, los resultados sugieren que la cepa pertenece a *P. sanguineus* con un 89.44% de identidad y a la especie *P. coccineus* con un 79.86%. Sin embargo, no se pudo obtener ninguna secuencia del fragmento de 496 pb. Cabe mencionar que la cepa podría tratarse también de una cepa híbrida y quizá sea necesario obtener todo el genoma de la cepa para mandarlo a secuenciar y mejorar los resultados obtenidos.

1. INTRODUCCIÓN

El reino Fungi es considerado un grupo mega diverso (Margulis, L., & Chapman, 2009, Heredia *et al.*, 2008), se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, registrándose más de 80, 000 especies de hongos en el mundo, de las cuales 7,000 especies se encuentran distribuidas en México (Díaz, 2015). Contribuyen a la descomposición de la materia orgánica, participando en los ciclos biogeoquímicos y de esta forma juegan un papel de vital importancia en el mantenimiento de los ecosistemas (Pompa, 2011). Además, pueden representar una importancia económica, alimenticia, medicinal y biotecnológica para el hombre, aunque algunos otros pueden resultar también perjudiciales (Díaz, 2015).

Los hongos comparten parcial o totalmente las siguientes características: nivel de organización unicelular, pluricelular o dimórfico; paredes celulares que contienen quitina y/o celulosa; hifas uninucleadas, binucleadas o plurinucleadas; división nuclear mitótica y meiótica; nutrición heterótrofa; reproducción sexual y asexual (Batallas, 2016). Estos organismos crecen sobre cualquier tipo de materia orgánica y en base a su nutrición se agrupan en tres grandes grupos: Los parásitos, que extraen las sustancias orgánicas que necesitan de un hospedero al que debilitan y a la larga lo matan; los simbióticos, aquellos que subsisten en relación mutua intercambiando sustancias orgánicas con algas (Líquenes) o las raíces de los árboles (Micorrizas); por ultimo están los saprófitos que se alimentan de la materia orgánica en descomposición como la madera (Díaz, 2015) evitando la acumulación de la biomasa vegetal en los ecosistemas (Aro *et al.*, 2005). Este último grupo incluye a grupos del filo Ascomycota, pero está mejor representado en cuanto a número de especies por el grupo Basidiomycota. Los basidiomicetos además de su participación en los ecosistemas evitan la acumulación de biomasa vegetal, son productores de diferentes tipos de enzimas, metabolitos o compuestos con potencial biotecnológico, razón por la cual los científicos se han interesado tanto en ellos (Díaz, 2015).

1.1. Basidiomicetos

Dentro de reino de los hongos se encuentra el filo Basidiomycota, del cual se estima que existen más de 30,000 especies en el mundo (Webster & Weber, 2007), entre ellas especies microscópicas y macroscópicas. Algunas características de este filo son su píleo en forma de sombrilla, su reproducción es de tipo sexual y asexual y esto lo logran gracias a las basidiosporas que se producen en el himenóforo, específicamente en los basidios. El ciclo de vida típico de un basidiomiceto (Figura 1) se divide en dos fases: una fase monocariótica y una fase dicariótica. Dicho ciclo comienza con una basidiospora que germina y origina un micelio monocariótico (Micelio primario), dos micelios primarios se buscan y ocurre la plasmogamia dando origen a un micelio dicariótico (Micelio secundario). Cuando las condiciones son ideales para el hongo, el micelio dicariótico es inducido a la formación del cuerpo fructífero, iniciando la cariogamia y la meiosis en los basidios (Células binucleadas) produciendo 4 células monocarióticas (Lomascolo *et al.*, 2011).

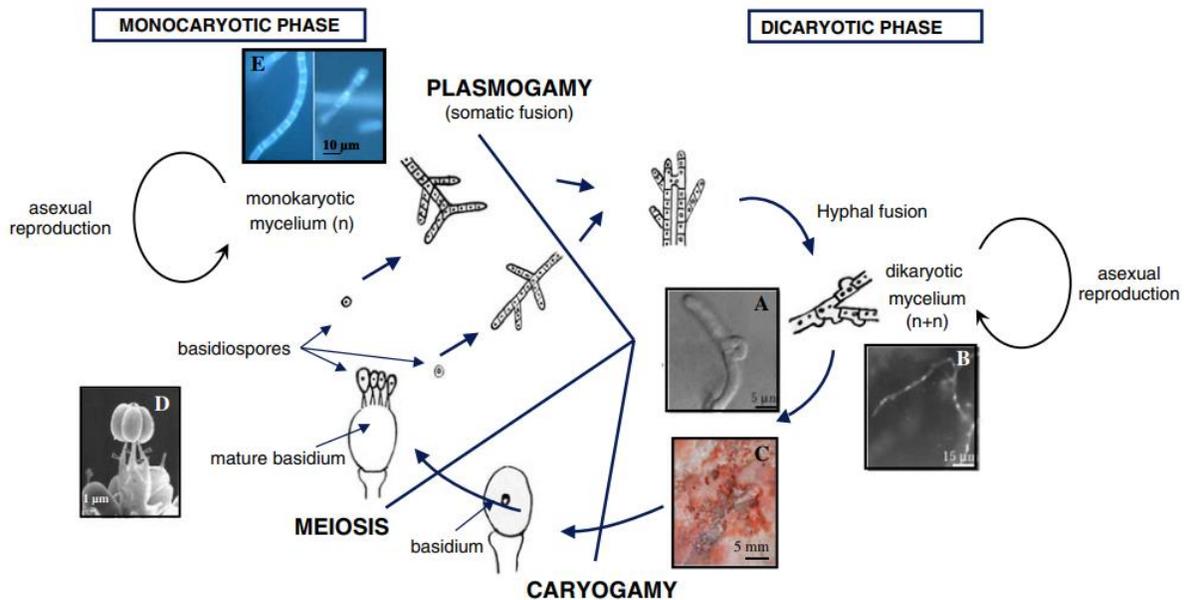


Figura 1. Ciclo reproductivo típico de un basidiomiceto.

Los basidiomicetos son conocidos por descomponer la madera y en base a ello se ha dado una clasificación: hongos de pudrición blanca, hongos de pudrición parda o marrón y hongos de pudrición blanda. Los hongos de pudrición blanda son aquellos que

degradan la celulosa, los de pudrición parda son aquellos que degradan no solo la celulosa, sino que también se encargan de degradar la hemicelulosa, mientras que los hongos de pudrición blanca son aquellos que degradan la lignina, esto lo logran gracias a su sistema ligninolítico, el cual consiste en la producción de enzimas inespecíficas con gran potencial oxidativo, las cuales son capaces de degradar también compuestos fenólicos, compuestos de estructuras complejas como los hidrocarburos, y compuestos nocivos para el ambiente (Galhaup *et al.*, 2002; de Souza *et al.*, 2022). Por dichas razones los científicos se han interesado tanto en los hongos de pudrición blanca, encontrando en ellos gran potencial biotecnológico e industrial.

1.2. Hongos de la pudrición blanca: el sistema ligninolítico

Se conocen como hongos de la pudrición blanca a todos aquellos hongos que degradan la lignina. Su importancia radica su sistema ligninocelulítico, el cual consiste en un grupo de enzimas como: manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP), fenoxazinona sintasa y lacasas (Eggert *et al.*, 1995, Roes- Hill *et al.*, 2009). Las lacasas son capaces de oxidar compuestos fenólicos y no fenólicos difíciles o imposibles de degradar por otras enzimas, siendo unas de las enzimas más eficientes degradadoras de lignina (Srinivasan *et al.*, 1995).

Las lacasas son glicoproteínas, metaloenzimas multicobre cuyo tamaño es de aproximadamente 1646 pb. Son importantes en la degradación de la lignina, debido al gran potencial redox que le brindan los iones de cobre presentes en su sitio activo. Estas enzimas catalizan la oxidación de compuestos fenólicos como orto y para difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, diaminas de arilo y las ligninas. Se ha demostrado que las lacasas también degradan compuestos no fenólicos en presencia de moléculas que actúen como mediadores de transferencia de electrones (Srinivasan *et al.*, 1995; Lomascolo *et al.*, 2002; Sigoillot *et al.*, 2002; Couto *et al.*, 2006; Uzan *et al.*, 2010; Lesage-Meessen *et al.*, 2011; Lomascolo *et al.*, 2011; Lavasseur *et al.*, 2014). El género *Pycnoporus* es quizá el grupo más novedoso en cuanto al estudio de hongos de pudrición blanca que producen lacasas y que descomponen la madera, razón por la

cual las propiedades biotecnológicas y de degradación de las lacasas en este género se han detallado progresivamente desde 1990 en artículos internacionales y nacionales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Características de *Pycnoporus*

Pycnoporus es un grupo de hongos cosmopolitas clase Agaricomycete, orden Polyporales, familia polyporaceae. Este género comprende 8 especies registradas las cuales son: *P. annosus*, *P. epilobii*, *P. mimicus*, *P. serialis*, *P. sanguineus*, *P. coccineus*, *P. cinnabarinus* y *P. puniceus*, siendo las más representativas las últimas 4 (Figura 2) (Díaz, 2015), por ser las especies que se han reportado en los artículos como productoras de moléculas de valor biotecnológico e industrial como las enzimas lacasas (Lomascolo *et al.*, 2002; 2011; Lesage-Meessen *et al.*, 2011; Lavasseur *et al.*, 2014; Couto *et al.*, 2006).

Pycnoporus es un grupo de homobasidiomycetos heterotálicos con sistema de apareamiento tetrapolar (Nobles & Frew, 1962). En especímenes maduros el cuerpo fructífero de estos hongos va de color blanquecina a plateada (Guzmán, 2003), aunque tienden a presentar otras variaciones macroscópicas tales como forma, grosor, textura de la superficie, consistencia, sistema de hifas, reacciones macroquímicas (Cifuentes *et al.*, 1986, Gilbertson & Ryvarden, 1986). Este género presenta fructificación anual con un píleo liso, sésil y coriáceo, con forma de medialuna y en ocasiones con zonas concéntricas débilmente marcadas, también presenta túbulos cilíndricos y sistema de hifas dimíticas o trimíticas con hifas generativas, envolventes y esqueléticas. A nivel microscópico las esporas son oblongas o cilíndricas hialinas con paredes lisas y amiloideas es decir que son similares al almidón, coloreándose de negro azulado con el yodo, igual que lo hace el almidón (Tormo, 2014).

Las especies *Pycnoporus* tienen un intenso color rojo-anaranjado el cual se da gracias a la presencia de algunos pigmentos como la tramesanguina, el ácido cinabarinico y la cinabarina, cabe mencionar que estos pigmentos presentan actividad antimicrobiana,

antifúngica y antiviral, además estos hongos son muy eficaces como productores de enzimas lacasas y por esta razón han despertado el interés en la comunidad científica (Ryvarden, 1991; Ryvarden y Gilbertson, 1994).

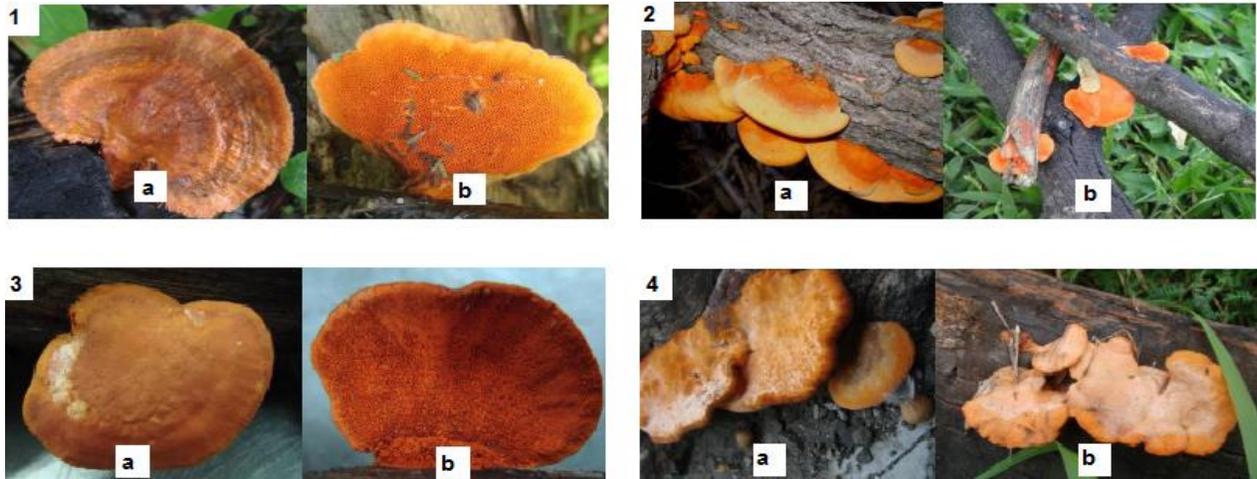


Figura 2. Píleo e himenóforo de especies del género *Pycnoporus* que se han reportado en artículos: 1. (a) Píleo y (b)Himenóforo de *P. sanguineus*; 2. (a) Píleo y (b) Himenóforo de *P. cinnabarinus*; 3. (a) Píleo y (b) Himenóforo de *P. coccineus*; 4. (a) Píleo y (b) Himenóforo de *P. puniceus* (Modificado de Téllez *et al.*, 2016).

2.2. Distribución de *Pycnoporus*

2.2.1. Distribución mundial

Pycnoporus es un género cosmopolita y se encuentra distribuido en zonas tropicales y subtropicales del planeta, en la figura 3 se muestra una franja roja que representa las zonas tropicales y las líneas punteadas amarillas delimitan las zonas subtropicales del planeta, ambas regiones representan los sitios en los que puede hallarse distribuido el género *Pycnoporus*.

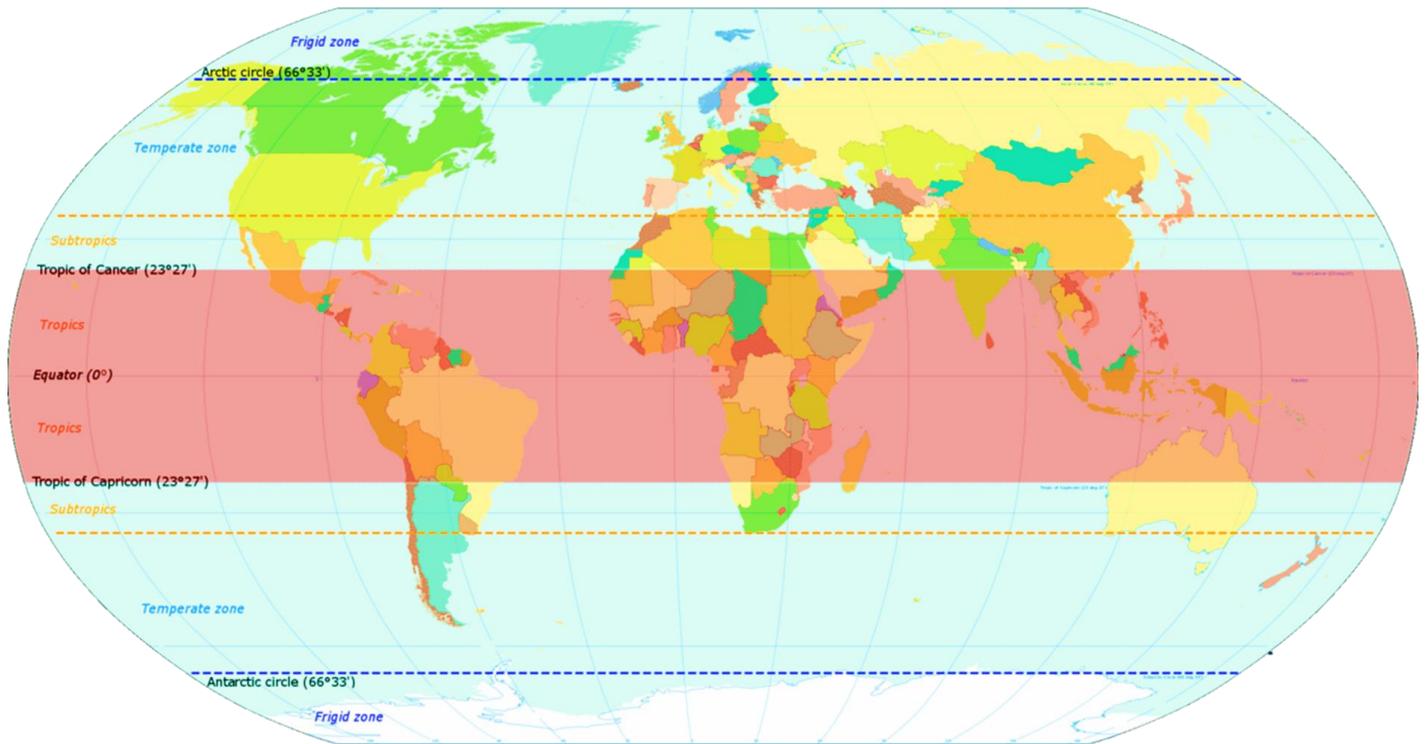


Figura 3. Distribución de *Pycnopus* en el mundo: la franja roja indica las zonas tropicales y las líneas punteadas color amarillo delimitan las zonas subtropicales, sitios donde puede estar distribuido el género *Pycnopus*.

2.2.2. Distribución en México

De acuerdo con los datos recabados por Pérez-Silva en 1988 y el sitio web naturalista, se sabe que *Pycnopus* se encuentra ampliamente distribuido en casi todos los estados de México con excepción de Baja California Norte, Durango, Aguascalientes y Zacatecas (Figura 4), creciendo sobre sustratos diversos como troncos de encino, pino, café, entre otros.

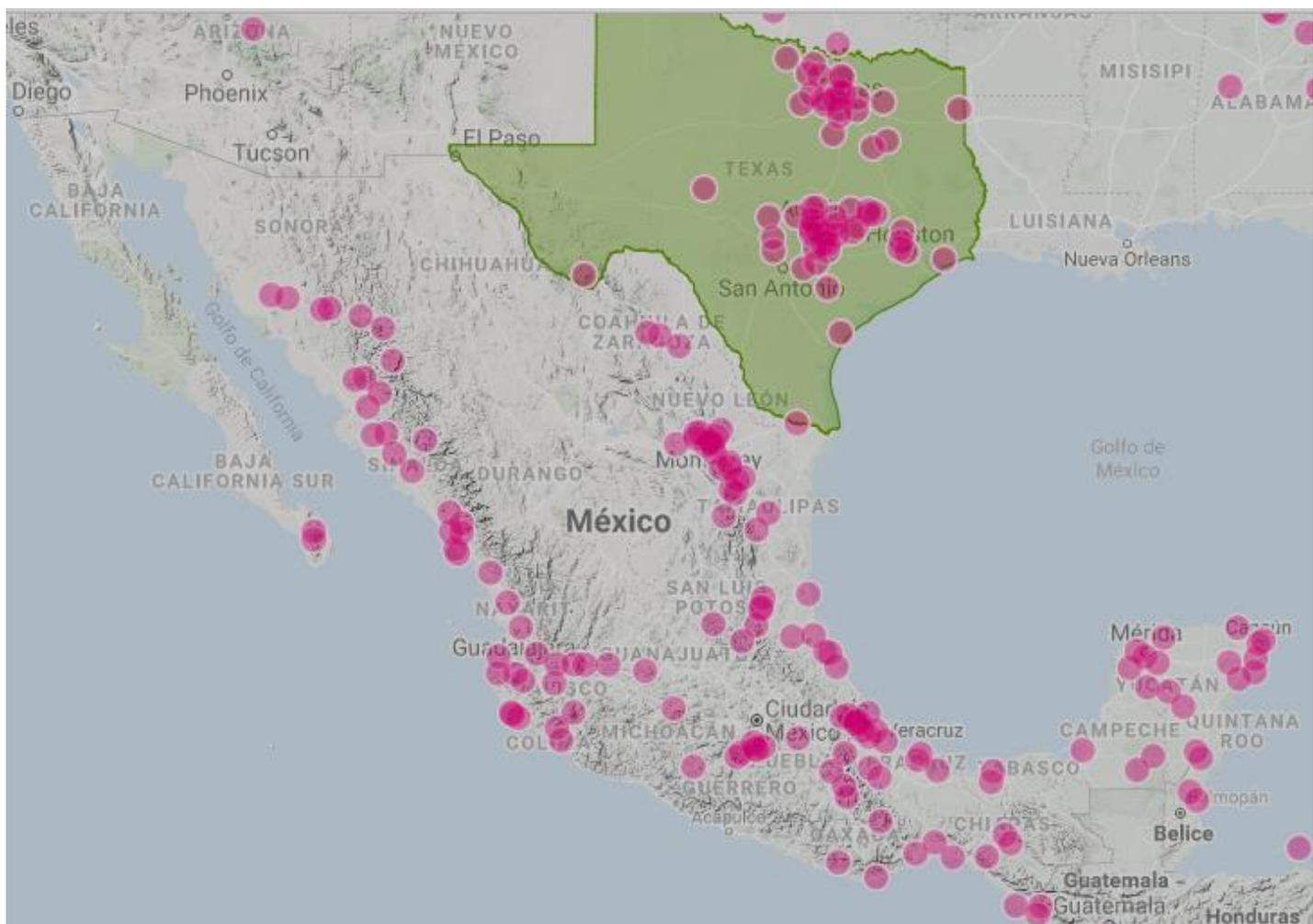


Figura 4. Áreas de distribución de *Pycnopus* en México.

2.2.3. Distribución en el estado de Morelos

Aunque existe poca información sobre la distribución de *Pycnopus* en el estado de Morelos, Díaz en 2013 describe registros sobre la presencia de *Pycnopus* en el estado de Morelos en los municipios de Tepoztlán, Yautepec, Jojutla, Tlaquiltenango, Cuernavaca, Temixco y Zacatepec (Figura 5).



Figura 5. Distribución de *Pycnoporus* en los municipios indicados de color azul, de acuerdo con Díaz en 2013.

2.3. Usos de *Pycnoporus*: moléculas de importancia biotecnológica e industrial

Pycnoporus un grupo de hongos de pudrición blanca que tienen como principal función en los ecosistemas la degradación de la lignina, evitando la acumulación de biomasa vegetal, esto lo logran gracias a las moléculas que produce como sus enzimas lacasas. Se cultiva en agar, sustrato sólido, cultivos semisólidos y cultivos líquidos de donde se obtienen principalmente metabolitos con actividades enzimáticas y otras aplicaciones como beta-glucanos y antioxidantes (Mendoza *et al.*, 2020). Las enzimas lacasas

producidas por este hongo presentan diversas aplicaciones biotecnológicas como la fabricación de medicamentos contra el cáncer. En la industria alimenticia se aplica dicha enzima en ciertos procesos que modifican o mejoran el color del alimento o bebida, de esta manera, una interesante aplicación en la industria alimenticia implica la eliminación de compuestos fenólicos, responsables del pardeamiento y la turbidez en el jugo de frutas, la cerveza y el vino (Couto *et al.*, 2006). En la industria del papel las lacasas son utilizadas para deslignificar la pulpa de la madera que se genera durante el proceso de fabricación del papel para volverlo menos rígido y al mismo tiempo blanquearla. En procesos de biodegradación son utilizadas para transformar subproductos agrícolas, materias primas, contaminantes orgánicos y xenobióticos industriales en aguas residuales, evitando así la acumulación de estos compuestos que dañan los ecosistemas (Lomascolo *et al.*, 2002; Couto *et al.*, 2006; Lomascolo *et al.* 2011; Lesage-Meessen *et al.*, 2011; Lavasseur *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que los pigmentos como el ácido cinabarínico, la cinabarina y tramesanguina, cuya síntesis es catalizada por lacasas, presentan actividad antibacteriana, antiviral y antimicótica, aunque poco se sabe de esta última, también son utilizados como ingredientes de cosméticos para dar un tono rojo intenso a maquillajes y tintes para el cabello (Lomascolo *et al.*, 2002; Couto *et al.*, 2006; Lomascolo *et al.*, 2011; Lesage-Meessen *et al.*, 2011; Lavasseur *et al.*, 2014). El cuerpo fructífero de *Pycnoporus* es utilizado en infusiones de té para eliminar parásitos y dolores intestinales, además de poseer propiedades antitumorales (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2016), inclusive, también es aplicado sobre verrugas y granos para desinflamar y remediar problemas menopáusicos (Pérez-Silva *et al.*, 1998).

2.4. Identificación molecular en hongos y marcadores utilizados

La correcta identificación de los hongos es de gran importancia para poder agrupar a las diversas especies existentes. Por lo tanto, la identificación de especies de hongos basada en características morfológicas no es suficiente para una correcta identificación por lo que se han propuesto enfoques de biología molecular que vuelven más acertados los resultados de una identificación de hongos.

En los últimos años, la evaluación más precisa de la identificación y la diversidad de hongos se ha logrado usando marcadores moleculares. Un marcador molecular es una secuencia específica de nucleótidos que puede ser monitoreada, tales como el espaciador interno transcrito (ITS), región de ADN ribosomal nuclear que comprende las regiones ITS1, ITS2, ITS4, y el gen 5.8s (Figura 6) y además se utilizan secuencias parciales de genes que codifican subunidades de ARN, tales como la polimerasa, β -tubulina, celobiohidrolasa- C, topoisomerasa II, manganeso peroxidasa, fenoxazinona sintasa y lacasas (Le Roes Hill *et al.*, 2009; Lesage-Meessen *et al.*, 2011). Existen otras técnicas utilizadas para la identificación molecular en hongos tales como RFLP (restricción de longitud de fragmentos polimorfismo) y RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar) y todas estas comprenden regiones altamente conservadas y variables que pueden ser utilizados para comparar filogenéticamente entre organismos del mismo género y entre cepas de la misma especie.

Lomascolo en 2002, llevó a cabo la identificación molecular utilizando las regiones ITS1-5.8s-ITS2 (Figura 6) de secuencias genómicas de 20 cepas de *Pycnoporus* (2 de *P. coccineus*, 8 de *P. cinnabarinus* y 10 *P. sanguineus*). El árbol filogenético que se obtuvo agrupa a las cepas de acuerdo con su origen geográfico, un grupo incluye cepas asiáticas y el otro grupo a cepas del norte de Europa.

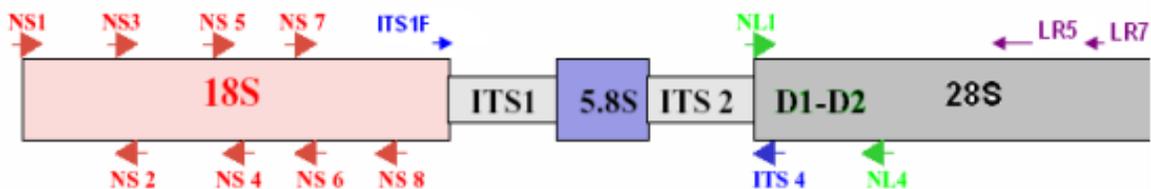


Figura 6. Representación esquemática de las regiones estudiadas del DNAr y los diferentes oligonucleótidos (Solé, 2002).

Rungjindamai en su estudio de 2008, llevó a cabo la caracterización molecular de basidiomicetos de Tailandia utilizando las regiones ITS y las especies fueron identificadas como *P. puniceus* que formaron un grupo con *P. sanguineus* agrupándolos en un clado basal (Ryvarden & Johansen, 1980).

Lesage-Meessen en 2011, describieron las relaciones filogenéticas de treinta y seis cepas de *Pycnoporus* obtenidas de diferentes colecciones internacionales (dos cepas de *P. puniceus*, 5 de *P. cinnabarinus*, 25 de *P. sanguineus* y 4 de *P. coccineus*) utilizando marcadores moleculares: ITS de DNAr y beta tubulina, en el cual se obtuvieron cepas de *P. sanguineus*, *P. coccineus*, *P. cinnabarinus* y *P. puniceus*. Posteriormente realizó árboles filogenéticos en los que observó que las cepas de *P. sanguineus*, *P. coccineus*, *P. cinnabarinus* se encontraban estrechamente relacionados, siendo las cepas de *P. puniceus* las más alejadas en los clados. Cabe mencionar que al analizar parte de la secuencia de la cepa HEMIM-53, esta se encuentra en un clado junto a *P. sanguineus*.

Batallas Molina en 2016, realizó la identificación morfológica y molecular mediante el análisis de las regiones ITS de macrohongos colectados. Se identificaron morfológicamente cuatro especies de macrohongos: *Favolus tenuiculus*, *Lentinus scleropus*, *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes elegans*, molecularmente *Favolus tenuiculus* tres de sus cuatro secuencias coincidieron con *F. brasiliensis* y la restante con *Neofavolus alveolaris* reportadas en el GeneBank. Las secuencias de *L. scleropus* con 97% de identidad eran parecidas a la única secuencia de *L. scleropus* registrada en el GenBank, todas las secuencias de *P. sanguineus* coincidieron en 100% con *P. sanguineus* en comparación con las secuencias del banco de genes, *T. elegans* y sus secuencias coincidieron con las secuencias de *T. elegans*. La caracterización morfológica coincidió con la molecular en casi todas las especies.

Díaz en 2015, realizó la identificación molecular y morfológica de especímenes de *Pycnoporus spp* con cepas del herbario micológico del CIB-UAEM, utilizando las cepas HEMIM-51 que proviene de la Cangrejera en Coatzacoalcos Veracruz, HEMIM-52 y 53 del municipio de Tlaquiltenango y Morelos respectivamente y HEMIM-54 del municipio de Cuernavaca, Morelos, y cepas de especímenes que fueron colectados en los municipios de Tepoztlán, Yautepec, Jojutla y Tlaquiltenango, para determinar a qué especie pertenecen. Además Díaz revisó las colecciones nacionales y mapeo la distribución de *Pycnoporus* en México, reportando únicamente cepas de *P. sanguineus*.

Se encontró un total de 495 registros de especímenes del género de *Pycnoporus spp.*, y se compararon estos resultados con los resultados reportados por Pérez-Silva en 1988, encontrando un nuevo reporte hecho por el herbario ENCB-IPN de un espécimen depositado en 1989 para el Estado de México, incluyendo a este resultado Díaz realizó un nuevo mapa de la distribución de *Pycnoporus spp.* en el país, observando que los tres estados con mayor número de especímenes depositados en las colecciones fueron Jalisco con 135, Veracruz con 103 y Morelos con 36. En cuanto a la identificación molecular Díaz logro amplificar la secuencia ITS1-5.8S-ITS2 para identificar las cepas de *Pycnoporus spp.*, sin embargo, no pudo obtener resultados de la secuenciación.

Coronel Pastor, 2019 realizó identificación molecular de la cepa de *Pycnoporus* HEMIM-51 utilizando 3 marcadores moleculares: ITS, β -tubulina y lacasa *lac3-1*. En sus resultados con ITS, se identificó la cepa HEMIM-51 cepa como *Pycnoporus coccineus*, con β -tubulina se identificó a la cepa HEMIM-51 como *Pycnoporus sanguineus* y *P. coccineus*. Por último, utilizando el gen *lac3-1* se identificó a la cepa HEMIM-51 como *Pycnoporus sanguineus*.

3. JUSTIFICACIÓN

Pycnoporus es un género de gran interés debido a que produce enzimas y pigmentos que son empleados en la industria farmacéutica, alimenticia y del papel, en biorremediación de aguas residuales, en cosmética y principalmente en la degradación de la lignina, por lo que su identificación es esencial para poder aprovechar esos beneficios. Alrededor del mundo las cepas de *Pycnoporus spp.*, se han caracterizado de manera morfológica macroscópica, por su crecimiento en agar HIT, en cultivo sólido y líquido, por producción de lacasas, cinabarina y ácido cinabarínico, inclusive las correspondientes al cepario de hongos HEMIM del CIB-UAEM (Díaz, 2015; Acosta-Urdapilleta, 2010). Es complicado identificar a las especies *Pycnoporus* de acuerdo con su morfología macroscópica del cepario HEMIM, pueden ser de tres especies diferentes, ya que estas presentan grandes similitudes (como la coloración y la forma del píleo), pero diferencias en sus esporas, por lo que solo la cepa HEMIM-51 fue identificada con técnicas más precisas empleando marcadores moleculares como ITS,

b-tubulina y lacasas (Coronel, 2019; Montaña, 2021), cabe destacar que solo existen dos trabajos a nivel mundial donde se han empleado estos tres marcadores al mismo tiempo para identificar estas cepas.

Debido a la problemática que existe para la identificación de cepas mediante morfología macroscópica y microscópica, en México hasta hace poco se sugería solo la presencia de cepas de *P. sanguineus*, más recientemente, de acuerdo con el sitio web enciclovida se ha reportado la presencia de *P. cinnabarinus* en la mayoría de los estados. Se propone en este trabajo la identificación molecular de la cepa de *Pycnoporus* HEMIM-53 del cepario de hongos HEMIM del CIB- UAEM empleando como marcador molecular el gen lacasa.

4. HIPÓTESIS

El uso de métodos moleculares permitirá la identificación de la cepa de *Pycnoporus* HEMIM-53 empleando como marcador molecular el gen lacasa.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Identificar la cepa de *Pycnoporus* HEMIM- 53, del cepario de hongos HEMIM del CIB- UAEM empleando como marcador molecular el gen lacasa.

5.2. Objetivos específicos

- Amplificar por fragmentos (de entre 500 y 600 pb) la región del gen de la lacasa.
- Obtener los productos de PCR de la secuencia del gen lacasa.
- Analizar de forma independiente cada fragmento de la secuencia del gen lacasa bioinformáticamente y construir árboles filogenéticos para identificar la cepa HEMIM-53.
- Unir los fragmentos y analizar la secuencia completa del gen lacasa bioinformáticamente y construir un árbol filogenético para identificar la cepa HEMIM-53.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Se utilizó la cepa HEMIM-53 (figura 7) de la colección HEMIM del CIB-UAEM, donadas por la M. en C. Ma de Lourdes Acosta Urdapilleta.



Figura 7. Cepa HEMIM-53

6.2. Cultivo y obtención del micelio

Para la obtención del micelio, se utilizó el medio de cultivo de harina integral de trigo (HIT) donde se realizó la siembra de la cepa, fue incubada por 10 días a 28°C, se revisaron constantemente las cajas para eliminar las que estaban contaminadas y se resembró constantemente la cepa para evitar perderla y para realizar las extracciones de ADN necesarias.

6.3. Extracción de ADN

Se utilizó el método de extracción de fenol-cloroformo, modificado a partir del método reportado por Lomascolo *et al.*, 2002. Se aisló el ADN genómico realizando un raspado de las cajas que presentaron crecimiento de micelio de 10 días, utilizando una espátula hasta obtener de 100 a 300 mg de micelio. Se homogenizó con 1000µl de buffer Tris-HCl pH 8.5 el cual contiene 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS-duodecil sulfato de sodio. Después de macerar con un mortero el contenido se vertió sobre un tubo eppendorf y se le aplicó agitación con un vortex durante 1 minuto. Posteriormente se incubó 15 minutos a temperatura ambiente añadiéndole 1000µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Se centrifugó a 13000g durante 1 hora a 4°C, la

parte acuosa fue transferida a un tubo eppendorf que contenía 25µl de RNAsa y se incubó a 37°C por 30 minutos, se añadió 1ml de cloroformo a la fase acuosa y se centrifugó nuevamente a 13000g durante 10 minutos. El ADN se precipitó con la adición de isopropanol y acetato de sodio 3M en una proporción 10:1 v/v y se incubó la muestra en hielo por 2 horas. El sedimento recuperado se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 50 µl de agua grado molecular.

6.4. Amplificación por PCR del gen lacasa

Se utilizaron oligonucleótidos específicos para el gen Lacasa (tabla 1), diseñados en el Laboratorio de Estructura, Función e Ingeniería de Proteínas (en la figura 8 se muestran sus sitios de unión). Los oligonucleótidos originalmente se enviaron a sintetizar con base a las regiones conservadas de la secuencia de *Pycnopus* con el número de acceso: EU683258

Tabla 1. Oligonucleótidos para las secuencias de Lacasa.

Oligos	pb	TM	% GC	Tamaño de fragmento
F2 – 5'-CAY TGG CAY GGR TTC TTC- 3'	18 19	65°C 65°C	47 55	566 pb
RL3 – 5'-ACCGCT TKC CCT GBG TGA C-3'				
FL3 – 5'-GTC ACV CAG GGM AAG CGG T-3'	19	69°C	55	584 pb
RL4 – 5'-GTC VAC RCC WCC DGS CTC GGG-3'	21	69°C	61	
FL4 – 5'-CCC GAG SCH GGW GGY GTB GAC-3'	21	70°C	61	496 pb
R8 – 5'-GAG RTG GAA GTC RAT GTG RC-3'	20	62°C	45	

En rojo se indican las bases sustituidas en base al código de una letra para oligos degenerados, donde: **Y**= C ó T, **R**= A ó G, **K**= G ó T, **B**= C ó G ó T, **V**= A ó C ó G, **M**= A ó C, **W**= A ó T, **D**= A ó G ó T, **S**= G ó C, **H**= A ó C ó T.

>EU683258.1 Pycnoporus *laccase* gene, partial cds

CATTGGCATGGGTTCTTCCAGAAAAGGCACGAACTGGGCGGATGGTCCCAGGTTCCGTGAACCAGTGTCCCATCGCTTCCGGCCACTCGTTCTTG
TATGACTTTCAAGTTCCTCCGACCAAGCAGGTACGAATTCCTGTACACGTTTCATTGCGTCGCAACTAAACCTCCTTACTAGGGACTTTCTGG
TACCATAGCCATCTCTCCACGCAACTACTGCGATGGTTGAGGGGGCCTTTTCGTGCTACGACCCCAACGATCCTCAGCCTAGCCTGTATGAC
ATTGATAACGGTGAGCAGATCATGGTATCGCAATATTGCGTCCACTTATGCTTCTGGCATCCAGACGACACTGTCATGACGCTGGCTGATT
GGTATCACGTTGCTGCCAAGCTCGGACCTCGCTTCCCGTACGCTCAAATGTCTACAAGATCTCACATATACGATTTGACTCACTTCGCTGA
TTACAGATTTGGGTCGGACTCAACCCTTATCAATGGGCTTGGTCGAACCCTGGCATAAGCACCGTCTGAATTGGCAGTTATCAAGGTCACGGC
AGGGAAAGCGGT CAGTATGGATGGTCATCACTCCAACACTGGCTCTGATACATGGCCCTTGTTCACAGCTACCGCTTCCGCTTGGTGTCGC
TTTCTTGGATCCGAACCATACATT CAGCATTGATAATCACACGATGACTATAATTGAGGGGACTCAATCAACACTCAACCCCTAGAGGTT
GATTCAATCCAGATTTTTGCGCGCAGCGCTACTCCTTCGTGGTAGGTCGTAGGCTCCTGTCATCAAGTTTGCAGACATCTTAAATACACC
TTTTTCAATGCAGCTGGATGCTAGCCAGCCGGTGGATAAATACTGGATCCGCGCAAAACCTGCCTTCGGAAACACAGGTTTTGCTGGTGGAA
TCAATTCGGCCATCCTGCGTTATGATGGCGCACCCGAGATCGAGCCTACGCTCTGTCAGACTACTCCTACGAAGCCTCTGAACGAGGTCGACT
TGCATCCTCTCTCGCCTATGCCTGTGGTACGTGTCTCAAAGAACCTCGATTACTAAGTGCATGTCAACTCACATGGTGCATGACAGCCTGGC
AGCTCCGAGCCCGAGGTTCTCA AAGCCTCTGAACCTTGGTCTTCAACTTCGTGAGTACTGGCGCGCTTCCGTAGCGCACGTTTCAACAAAG
CCTGATACCCATGCAGAACGGAACCAACTTTTTTCATCAACGACCACACCTTCGTCCCACCGTCTGTCCAGTCTTGTACAAATCCTCAGTGG
GGCGCAGGCGCTCAGGACCTGGTCCCAGGGGTAGTGTGTTGCTTCCAGCAACTCGTCCATCGAGATATCCTTCCCTGCCACTGCCAA
TGCCCTGGATTCCCCATCCTTTCACCTGCACGGTGTACGTCTGCCTTCCCTCGTCTAAAGGGGGAATTGATATCTGACTCCGATCAGAG
CACGCTTCGCTGTGTCGGAGCGCCGGAAGCAGCGTCTACAACACCCGATCTTCCGCGACGTCGTCAGCACCGGCCAGCCCGGC
GACAACGTCACGATCCGCTTCGAGACCAATAACCCCGGCCGTTGTTCTCCACTGCACATC GACATC GAC TTC CAC CTC

Figura 8. Sitios de unión de los oligonucleótidos utilizados (F2, RL3, FL3, RL4, FL4 Y R8). Imagen tomada de la tesis de maestría de Coronel, 2019.

Antes de iniciar la reacción en cadena de la polimerasa se prepararon tubos para PCR los cuales contenían los compuestos que se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Compuestos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa.

PCR	
compuesto	cantidad
Buffer Taq	5µl
DNTP's	5µl
MgCl ₂	5µl
Forward	1µl
Reverse	1µl
ADN	3µl
Taq polimerasa	0.2µl
Aforar a 50µl	

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador con las condiciones mostradas en las tablas 3, 4 y 5.

Tabla 3. Condiciones de la reacción de PCR para el fragmento 1.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos
Desnaturalización	94°C	30 segundos
Alineamiento	65°C	1 minuto
Elongación	72°C	2 minutos
Extensión final	72°C	7 minutos
30ciclos		

Tabla 4. Condiciones de la reacción de PCR para el fragmento 2.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos
Desnaturalización	94°	30 segundos
Alineamiento	69°	1 minuto
Elongación	72°	2 minutos
Extensión final	72°	7 minutos
30ciclos		

Tabla 5. Condiciones de la reacción de PCR para el fragmento 3.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°	5 minutos
Desnaturalización	94°	30 segundos
Alineamiento	62°	1 minuto
Elongación	72°	2 minutos
Extensión final	72°	7 minutos
30ciclos		

6.5. Electroforesis en gel de agarosa

Una vez terminado el proceso de PCR, se tomaron 8 µl de producto de PCR y 1 µl de azul de bromofenol, se mezclaron y se colocó la muestra en gel de agarosa al 0.8% disuelta en buffer TAE 1X con un pH 8. El gel de agarosa se puso en la cámara de Electroforesis y se corrió a 75V por 40 min, posteriormente se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml durante 20 min. Finalmente se observó el gel en el transiluminador.

6.6. Purificación del producto de PCR

Los productos de PCR que se observaron como bandas claras se purificaron cortando el fragmento de gel que contenía las bandas deseadas, posteriormente se utilizó el kit de extracción de gel Thermo Scientific GeneJET, para purificar el producto de PCR. Se colocaron las bandas cortadas en un tubo eppendorf sin exceder los 500 µl, posteriormente se añadió Binding buffer en una proporción 1:1, se incubó a 50°C por 10 minutos (hasta disolverse el gel), posteriormente se tomaron 800 µl de la muestra y se depositó en un tubo colector (columnas de purificación), se centrifugo el tubo 2 veces durante 1 minuto por vez para eliminar el Binding buffer. Se agregaron 700 µl de Wash buffer, se centrifugo por un minuto y se eliminó el Wash buffer, se centrifugó la columna sin agregarle algo más, posteriormente se colocó la columna sobre un tubo eppendorf y se le añadieron 30 µl de agua libre de nucleasas y se centrifugó durante 1 minuto, se colocó nuevamente la columna sobre un tubo eppendorf y se le añadieron 20 µl de agua libre de nucleasas y se centrifugó durante 1 minuto, posteriormente el resultante se cuantifico en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM mediante un nanodrop. Se repitió el mismo procedimiento para cada uno de los productos de PCR de la secuencia del gen lacasa.

6.7. Análisis bioinformático

Los productos de la purificación se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se realizó una comparación con la base de datos provista por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

6.8. Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó mediante el uso del programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

7. RESULTADOS

7.1. Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN genómico se realizó el procedimiento tal cual se menciona en la metodología. La cepa fue sembrada en medio sólido de harina integral de trigo y fue incubada durante 10 días a 28°C, posteriormente se realizó el raspado de micelio y la extracción del ADN utilizando el método de fenol-cloroformo. El ADN obtenido se conservó en 3 tubos eppendorf, clasificados como muestra 1, 2 y 3, posteriormente las muestras se enviaron a cuantificar al Instituto de Biotecnología de la UNAM (tabla 2).

Tabla 6. Cuantificación de ADN.

Muestras	Contenido de ADN (ng/μl)
Muestra 1	106.0
Muestra 2	186.4
Muestra 3	65.2

En los resultados de la cuantificación se observó que la extracción de ADN fue exitosa y que la cantidad obtenida era suficiente para continuar con los experimentos.

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en el cual se corrieron las 3 muestras de ADN a 75V durante 40 minutos, el gel fue teñido con bromuro de etidio y finalmente se observó en el transiluminador. Se lograron observar las bandas para las 3 muestras (Figura 9).

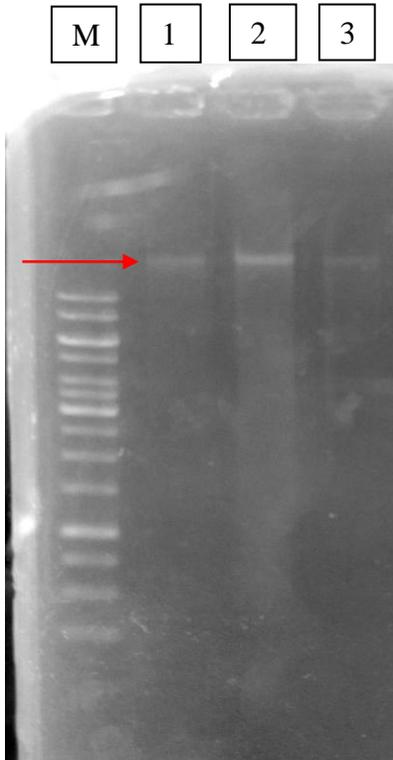


Figura 9. Gel de electroforesis 0.8% con las bandas obtenidas de la extracción de ADN.

7.2. Amplificación de la secuencia del gen por PCR

Para amplificar los fragmentos de la secuencia del gen lacasa se realizó un PCR para cada fragmento con las condiciones ya mencionadas, modificando únicamente la T_M la cual fue 65° para el primer fragmento, 69° para el segundo y 65° para el tercero. Una vez obtenidos los productos de PCR se corrió un gel de agarosa al 0.8% para cada fragmento. En las figuras 10 y 11 se pudo observar que la amplificación fue exitosa y se observaron las bandas esperadas.

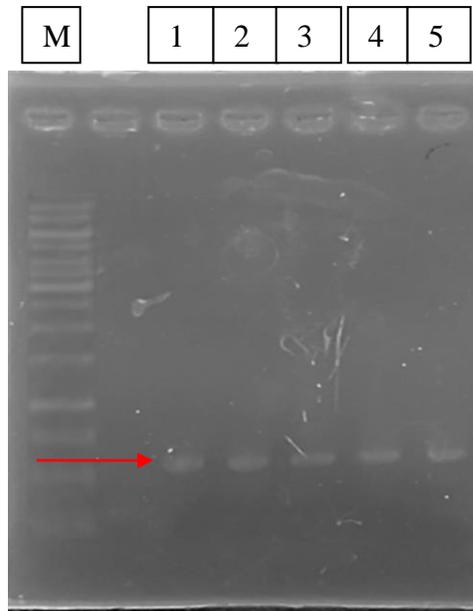


Figura 10. Gel de agarosa 0.8% con las bandas del producto de PCR del fragmento 1 de la secuencia del gen lacasa.

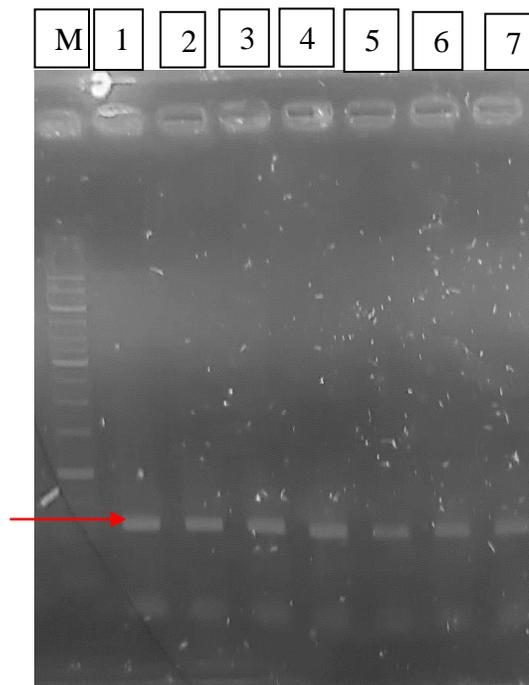


Figura 11. Gel de agarosa 0.8% con las bandas del producto de PCR del fragmento 2 de la secuencia del gen lacasa.

Para el tercer fragmento la amplificación no fue exitosa ya que no se observaron las bandas en el gel de agarosa, se repitió el PCR para el tercer fragmento modificando la temperatura y las cantidades de algunos compuestos, sin embargo, el resultado fue el mismo. Se decidió diseñar un nuevo oligo FL4 (tabla 7) y se repitió la reacción probando diferentes concentraciones de los compuestos y diferentes temperaturas (64°, 63.5°, 63° y 62°), tomando en cuenta la Tm del oligo R8, sin embargo no se obtuvieron resultados, las bandas no se mostraron en el gel de agarosa.

Tabla 7. Características del oligo FL4 rediseñado, donde:
Y= C ó T, **D**= A ó G ó T, **S**= G ó C, **H**= A ó C ó T.

Oligo	pb	Tm1	Tm2	Tamaño de fragmento
CDC TSA ACH TGG TYT TCA ACT T	22	63.99°	61.66°	496 pb

Una vez obtenidos los productos de PCR de los fragmentos 1 y 2 de la secuencia del gen lacasa se purificaron utilizando el kit de extracción de gel Thermo Scientific GeneJET, se cuantificaron (tabla 8) y posteriormente se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM, obteniendo un fragmento de 531 pb (fragmento 1) y otro de 513 pb (fragmento 2).

Tabla 8. Cuantificación de los productos de PCR de los fragmentos 1 y 2.

Muestras	Contenido de ADN (ng/μl)
Producto de PCR del fragmento 1	24.4
Producto de PCR del fragmento 2	9.3

7.3. Análisis bioinformático (BLAST)

A continuación, se muestran los resultados del análisis BLAST para el fragmento 1 y 2 de la secuencia del gen lacasa.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Pycnoporus coccineus strain MUCL 38525 laccase gene .partial cds	399	399	99%	4e-107	80.61%	EU714501.1
Pycnoporus cinnabarinus strain MUCL 38420 laccase gene .partial cds	364	364	99%	1e-96	79.55%	EU684160.1
Pycnoporus cinnabarinus laccase.(Lcc1) gene .complete cds	359	359	99%	7e-95	79.36%	AY147188.1
Pycnoporus coccineus strain BRFM 938 laccase gene .complete cds	353	353	99%	3e-93	79.17%	FJ858750.1
Pycnoporus coccineus strain MUCL 38523 laccase gene .partial cds	353	353	99%	3e-93	79.17%	EU683254.1
Pycnoporus cinnabarinus laccase.(lcc3-1) gene .complete cds	353	353	99%	3e-93	79.17%	AF025481.1
Pycnoporus cinnabarinus strain BRFM 44 laccase gene .partial cds	207	207	69%	3e-49	77.60%	EU684156.1
Pycnoporus cinnabarinus strain MUCL 30555 laccase gene .partial cds	207	207	69%	3e-49	77.60%	EU683258.1
Pycnoporus cinnabarinus laccase.(Lac1) gene .complete cds	207	207	69%	3e-49	77.60%	AF170093.1
Pycnoporus cinnabarinus strain CIRM-BRFM 237 laccase gene .partial cds	202	202	48%	1e-47	81.32%	EU684159.1
Pycnoporus cinnabarinus strain BRFM 231 laccase gene .partial cds	202	202	69%	1e-47	77.33%	EU684154.1
Pycnoporus cinnabarinus strain CIRM-BRFM 945 laccase gene .partial cds	202	202	48%	1e-47	81.32%	EU714500.1
Pycnoporus cinnabarinus strain BRFM 247 laccase gene .partial cds	198	198	48%	2e-46	81.18%	EU684157.1
Pycnoporus cinnabarinus copper binding domains I and II	132	132	29%	2e-26	81.99%	AJ620582.1
Pycnoporus coccineus isolate Lcc3 laccase gene .partial cds	128	128	15%	2e-25	95.12%	AY243854.1
Uncultured basidiomycete partial lac gene for laccase .exon 1 .clone S7-H1-Seq13	124	124	15%	3e-24	95.00%	AJ540236.1
Pycnoporus cinnabarinus partial mRNA for laccase (lac3 gene)	124	124	15%	3e-24	95.00%	AJ420334.1
Stropharia squamosa partial lac gene for laccase .isolate P4a	113	113	14%	6e-21	93.51%	AJ542597.1
Steccherinum murashkinskyi isolate LE-BIN_1963 laccase 5 mRNA .complete cds	78.7	78.7	19%	2e-10	80.39%	MH257617.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 979 laccase gene .partial cds	558	558	99%	6e-155	86.10%	EU714502.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 942 laccase gene .partial cds	553	553	99%	3e-153	85.90%	FJ232700.1
Pycnoporus sanguineus strain BRFM 902 laccase gene .complete cds	544	544	99%	2e-150	85.55%	FJ858751.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 980 laccase gene .partial cds	544	544	99%	2e-150	85.55%	EU684161.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 906 laccase gene .partial cds	544	544	99%	2e-150	85.55%	EU678776.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 902 laccase gene .partial cds	544	544	99%	2e-150	85.55%	EU678773.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 896 laccase gene .partial cds	544	544	99%	2e-150	85.55%	EU678768.1
Pycnoporus sanguineus strain MUCL 29375 laccase gene .partial cds	542	542	99%	6e-150	85.52%	EU684158.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 893 laccase gene .partial cds	538	538	99%	8e-149	85.23%	EU678779.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 943 laccase gene .partial cds	536	536	99%	3e-148	85.36%	FJ232701.1
Pycnoporus sanguineus strain BRFM 898 laccase gene .partial cds	532	532	99%	4e-147	85.23%	EU678781.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 905 laccase gene .partial cds	527	527	99%	2e-145	85.04%	EU678782.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 897 laccase gene .partial cds	527	527	99%	2e-145	85.04%	EU678780.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 900 laccase gene .partial cds	527	527	99%	2e-145	85.04%	EU678771.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 899 laccase gene .partial cds	527	527	99%	2e-145	85.04%	EU678770.1
Pycnoporus sanguineus strain BRFM 894 laccase gene .partial cds	527	527	99%	2e-145	85.04%	EU678769.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 895 laccase gene .partial cds	527	527	99%	2e-145	85.04%	EU678767.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 892 laccase gene .partial cds	527	527	99%	2e-145	85.04%	EU678766.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 903 laccase gene .partial cds	521	521	99%	8e-144	84.85%	EU678774.1
Pycnoporus sanguineus strain CIRM-BRFM 981 laccase gene .partial cds	514	514	99%	1e-141	84.63%	EU714503.1

Figura 12. Análisis Blast del fragmento 1 de la secuencia del gen lacasa.

Para el fragmento 1 de la secuencia del gen lacasa, con una cobertura (Query cover) del 99% se encontró identidad con *Pycnoporus sanguineus* con un porcentaje del 79.17% al 86.10%, así mismo se encontró un porcentaje de identidad del 79.17% al 80.61% con cepas de *Pycnoporus coccineus* y con *Pycnoporus cinnabarinus* se encontró porcentaje de identidad del 79.17% al 79.55%.

Descripción	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor e	Por. Ident	Adhesión
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa CIRM-BRFM 897 gen de lacasa_cds parciales	577	577	92%	2e-160	89.44%	EU678780.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa BRFM 898 gen de lacasa_cds parciales	571	571	92%	8e-159	89.22%	EU678781.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa CIRM-BRFM 900 gen de lacasa_cds parciales	571	571	92%	8e-159	89.22%	EU678771.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa BRFM 894 gen de lacasa_cds parciales	571	571	92%	8e-159	89.22%	EU678769.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa CIRM-BRFM 895 gen de lacasa_cds parciales	571	571	92%	8e-159	89.22%	EU678767.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa CIRM-BRFM 905 gen de lacasa_cds parciales	566	566	92%	4e-157	89.01%	EU678782.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa CIRM-BRFM 903 gen de lacasa_cds parciales	566	566	92%	4e-157	89.01%	EU678774.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa CIRM-BRFM 899 gen de lacasa_cds parciales	566	566	92%	4e-157	89.01%	EU678770.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa CIRM-BRFM 892 gen de lacasa_cds parciales	566	566	92%	4e-157	89.01%	EU678766.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa MUCL 29375 gen de lacasa_cds parciales	564	564	89%	1e-156	89.73%	EU684158.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa CIRM-BRFM 942 gen de lacasa_cds parciales	553	553	89%	3e-153	89.26%	FJ232700.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa CIRM-BRFM 943 gen de lacasa_cds parciales	542	542	89%	6e-150	88.81%	FJ232701.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa CIRM-BRFM 979 gen lacasa_cds parciales	542	542	89%	6e-150	88.81%	EU714502.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa CIRM-BRFM 961 gen de lacasa_cds parciales	540	540	92%	2e-149	88.10%	EU714503.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa IMB H2180 gen de lacasa_cds parciales	309	309	85%	7e-80	80.05%	EU683256.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa IMB G53 gen de lacasa_cds parciales	305	305	85%	9e-79	79.86%	EU683255.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus coccineus cepa MUCL 38527 gen lacasa_cds parciales	305	305	85%	9e-79	79.86%	EU683253.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa CIRM-BRFM 542 gen de lacasa_cds parciales	305	305	85%	9e-79	79.86%	EU678786.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus sanguineus cepa IMB W006-2 gen de lacasa_cds parciales	305	305	85%	9e-79	79.86%	EU678784.1
<input type="checkbox"/> Gen de Pycnopus coccineus lcc1 para laccasas_cds completos	305	305	85%	9e-79	79.91%	AB072704.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus coccineus cepa IUM 0450 gen de lacasa_cds parciales	300	300	85%	4e-77	79.63%	KP718631.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus coccineus lcc1 mRNA para laccasa_cds completos	187	187	31%	3e-43	87.97%	AB072703.1
<input type="checkbox"/> Pycnopus cinnabarinus laccase (lcc3-2) gen_cds completos	145	145	29%	2e-30	84.67%	AF123571.1

Figura 13. Análisis Blast del fragmento 2 de la secuencia del gen lacasa.

Para el fragmento 2 de la secuencia del gen lacasa, con una cobertura (Query cover) del 92% se encontró identidad con *Pycnopus coccineus* con un porcentaje del 89.01% al 89.44%. Con una cobertura (Query cover) del 85% se encontró identidad con *Pycnopus sanguineus* con un porcentaje del 79.63% al 79.86%.

7.4. Análisis filogenético

Al realizar el árbol filogenético para el fragmento 1 de la secuencia del gen lacasa (figura 13), se pudo observar que la cepa HEMIM 53 se encuentra agrupada en un clado donde se encuentra *P. sanguineus*. Al realizar el árbol filogenético para el fragmento 2 de la secuencia del gen lacasa (figura 14), se pudo observar nuevamente que la cepa HEMIM 53 se encuentra agrupada en un clado junto a *P. sanguineus*.

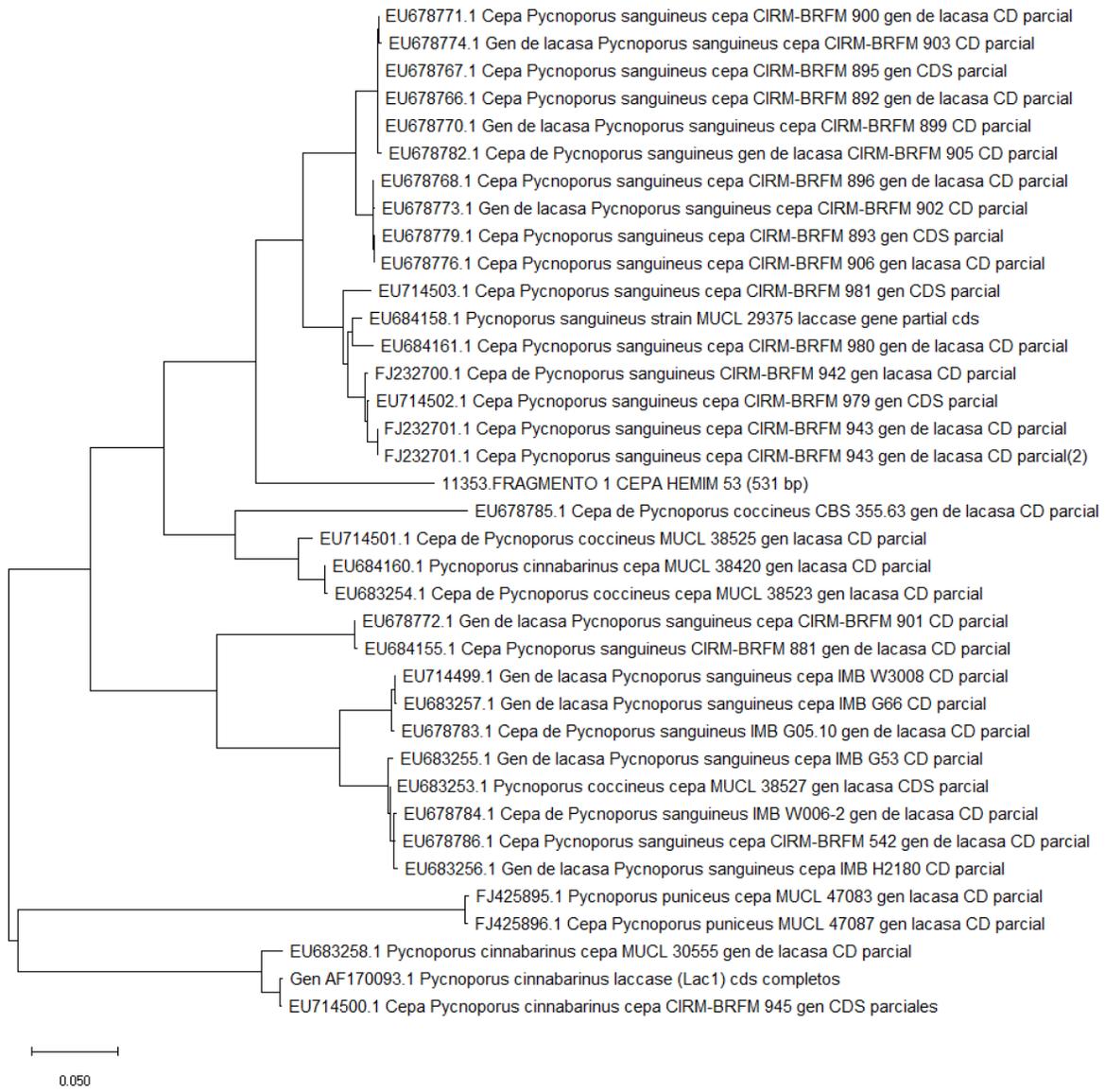


Figura 14. Árbol filogenético con el fragmento 1 de la secuencia del gen lacasa obtenido del programa MEGA SOFTWARE.

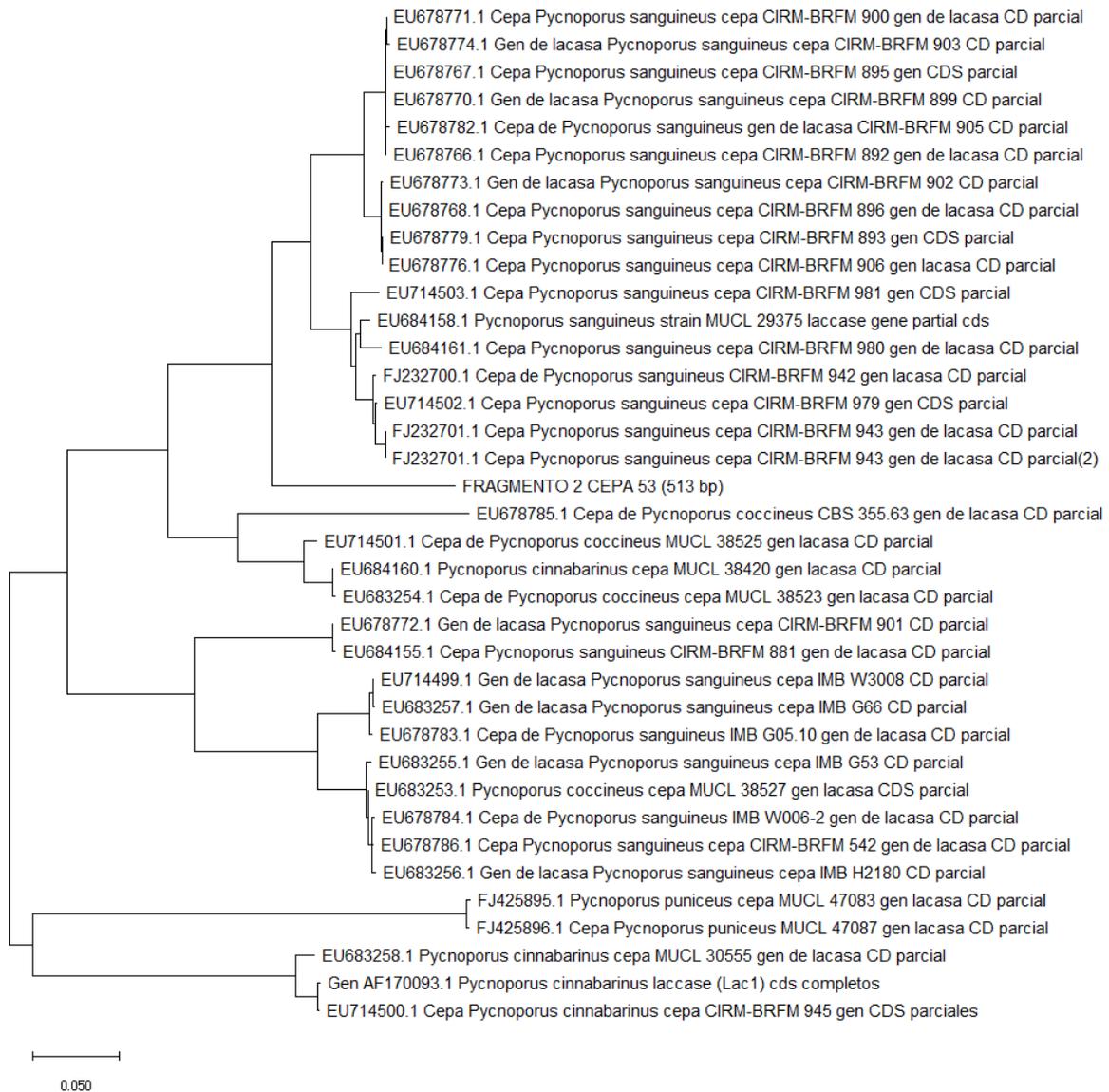


Figura 15. Árbol filogenético con el fragmento 2 de la secuencia del gen lacasa obtenido del programa MEGA SOFTWARE.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Existen diversos trabajos sobre la identificación de *Pycnopus* utilizando marcadores como ITS, β -tubulina y lacasas, sin embargo existen solo dos trabajos que han realizado identificación de este hongo utilizando los tres marcadores al mismo tiempo,

uno es el que realiza Lesage-Meessen *et al.*, 2011 en el cual analiza 36 cepas de *Pycnopus* (5 de *P. cinnabarinus*, 2 de *P. puniceus*, 4 de *P. coccineus* y 25 de *P. sanguineus*) y las agrupa construyendo arboles filogenéticos en los que observó que las cepas de *P. sanguineus*, *P. coccineus*, *P. cinnabarinus* se encontraban estrechamente relacionados, siendo las cepas de *P. puniceus* las más alejadas en los clados. El otro trabajo es el realizado por Coronel, 2019 en el que realiza la identificación molecular de la cepa HEMIM-51. En su trabajo, coronel pastor construye arboles filogenéticos donde observó que con ITS se identificó la cepa HEMIM-51 como *Pycnopus coccineus*, con β -tubulina se identificó a la cepa HEMIM-51 como *Pycnopus sanguineus* y *P. coccineus*. Por último, utilizando el gen lacasa se identificó a la cepa HEMIM-51 como *Pycnopus sanguineus*.

En este trabajo se realizó la identificación molecular de la cepa HEMIM-53 utilizando como marcador la secuencia del gen lacasa. Se decidió amplificar y secuenciar el gen por fragmentos, 3 en específico, de entre 500 a 600 pb, pero solo se consiguió secuenciar los primeros dos debido a que no se consiguió amplificar el tercer fragmento con los oligos con los que se pretendía hacerlo (FL4 y R8). Se decidió rediseñar el oligo FL4 y se probaron diferentes condiciones para tratar de amplificar el tercer fragmento y aun así no se obtuvieron resultados. Se enviaron a secuenciar los productos de PCR de los fragmentos 1 y 2, una vez recibidas las secuencias se realizaron los correspondientes BLAST, el resultado arrojó que el fragmento 1, de 531 pb, representa el 32.26% de la secuencia total del gen lacasa (1646 pb) y presenta una cobertura (Query cover) del 99% para *Pycnopus coccineus*, *Pycnopus sanguineus* y *Pycnopus cinnabarinus*, con un porcentaje de identidad del 86.10% para *P. sanguineus*, 80.61% para *P. coccineus* y 79.55% para *P. cinnabarinus*. El fragmento 2, de 513 pb, representa el 31.16% de la secuencia total y presenta una cobertura (Query cover) del 92% y un porcentaje de identidad del 89.44% con *P. sanguineus*. Además, el fragmento 2 presenta una cobertura (Query cover) del 85% y un porcentaje de identidad del 79.86% con *P. coccineus*.

Del fragmento 1 solo se obtuvieron el 93.81% de las bases esperadas, ya que, de un total de 566 pb, se pudieron amplificar 531. Del fragmento 2 solo se obtuvieron el

87.84% de las bases esperadas, ya que, de un total de 584 pb, se pudieron amplificar 513. Cabe recordar que el tercer fragmento de 496 pb no se logró amplificar.

Posteriormente se realizaron los árboles filogenéticos correspondientes para el fragmento 1 y 2, incluso se unieron las 2 secuencias y se realizó un árbol filogenético más. En los resultados de ambos fragmentos unidos se observó que la cepa HEMIM-53 se encuentra alineada en un clado junto a *P. sanguineus*.

Se lograron amplificar los fragmentos 1 y 2 de la secuencia del gen lacasa, con un tamaño de 531 pb y 513 pb respectivamente. El fragmento 3 hasta ahora no se ha logrado amplificar ya que posiblemente alguno de los oligos no se pegó correctamente a la secuencia o quizá las condiciones del PCR no fueron las adecuadas, por lo tanto, no se consiguieron estandarizar.

Se obtuvieron los productos de PCR y se enviaron a secuenciar, una vez recibidas las secuencias de los fragmentos 1 y 2 se realizaron los correspondientes BLAST, el resultado arrojó que la pequeña secuencia obtenida del fragmento 1 presenta una cobertura (Query cover) del 99% para *Pycnoporus coccineus*, *Pycnoporus sanguineus* y *Pycnoporus cinnabarinus*, con un porcentaje de identidad del 86.10% para *P. sanguineus*, 80.61% para *P. coccineus* y 79.55% para *P. cinnabarinus*. De acuerdo con los datos de BLAST, en las secuencias que se obtuvieron del fragmento 2, este presenta una cobertura (Query cover) del 92% y un porcentaje de identidad del 89.44% con *P. sanguineus*. Además, el fragmento 2 presenta una cobertura (Query cover) del 85% y un porcentaje de identidad del 79.86% con *P. coccineus*. El fragmento 3 de la secuencia del gen lacasa no pudo analizarse de ninguna forma debido a que no se ha logrado amplificar.

Se realizaron los árboles filogenéticos de los fragmentos 1 y 2 y se demostró que ambos fragmentos se agrupan en un mismo clado junto a *P. sanguineus*.

Se puede inferir que la cepa HEMIM-53 pertenece a la especie *P. sanguineus* debido a que en los BLAST se observa afín a esta especie con una mayor cobertura y un mayor

porcentaje de identidad, sin embargo, es necesario secuenciar, realizar un BLAST y un árbol filogenético con el tercer fragmento de la secuencia del gen lacasa y realizar los mismos análisis uniendo los tres fragmentos, es decir, con la secuencia completa, para poder obtener un resultado concreto.

9. LITERATURA

Acosta Urdapilleta, Obscura N, Rossano R. (2016) “USO DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus* PARA LA ELABORACIÓN DE BEBIDAS” *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* (2016) 675-679.

Andrade, W. E. G., Insuasti, J. A. P., Checa, A., & del Ambiente, C. E. D. B. (2020). Banco de recursos genéticos para *Pycnoporus* spp. *Revista Biorrefinería* Vol, 3(3).

Aro, N., Pakula, T., & Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 719-739.

Batallas Molina, R. D. C. (2016). Caracterización Morfológica Y Molecular de Cuatro Especies de Macrohongos Comestibles Y Medicinales En Zonas De Cultivo De La Comunidad Kichwa De Oglán–Pastaza, Ecuador.

Cifuentes J, Villegas M, Perez-Ramirez L. 1986 – Hongos. In *Manual de Herbario*. A. Lot and F. Chiang. Consejo Nacional de la Flora, México D.F.

Coronel Pastor, L. C. (2019). Identificación molecular de cepas de *Pycnoporus* spp. Tesis De Maestría. Universidad Autónoma Del Estado de Morelos.

Couto, S. R., & Herrera, J. L. T. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology advances*, 24(5), 500-513.

Cruz Muñoz, R. (2015). Caracterización de los pigmentos de *Pycnoporus sanguineus* y su citotoxicidad sobre hongos y bacterias Fitopatógenas. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional.

De Souza, L., Shivakumar, S., & Das, A. (2022). Dual phase statistical optimization of biological pre-treatment of sugarcane bagasse with *Pycnoporus coccineus* MScMS1 for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of environmental management*, 302, 113948.

Dias DA, Urban S. 2009 – HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Natural product communications* 4, 489–498.

Díaz, M. A. (2013). Caracterización molecular de cepas de *Pycnoporus sanguineus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Eggert, C., Temp, U., y Eriksson, KE (1995). El sistema ligninolítico del hongo de la podredumbre blanca *Pycnoporus cinnabarinus*: purificación y caracterización de la lacasa. *Microbiología Aplicada y Ambiental*, 62 (4), 1151-1158.

Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., y Haltrich, D. (2002). Incremento de la producción de lacasas por el basidiomiceto degradante de la madera *Trametes pubescens*. *Tecnología de enzimas y microbios*, 30 (4), 529-536.

Gilbertson RL, Ryvarden L. 1986 – North American Polypores. Vol. I Fungiflora. Oslo, Norway. Gioia L, Manta C, Ovsejevi K, Burgueño J, Menéndez P, Rodríguez-Couto S. 2014 – Enhancing laccase production by a newly-isolated strain of *Pycnoporus sanguineus* with high potential for dye decolouration. *RSC Advances* 4, 34096–34103.

Guarro J, Gene J, Stchigel AM. - 1999. La evolución de hongos Taxonomía. *Microbiología clínica Comentarios* 12, 454-500.

Guzmán G. 2003 – Hongos de El Edén Quintana Roo. Introducción a la microbiota tropical de México. INECOL y CONABIO, Xalapa.

Heredia, G., Ruiz, C., & Capelo, S. (2008). Biología e Importancia de los hongos microscópicos filamentosos. En G. Heredia, Tópicos sobre diversidad, ecología y usos de los Hongos Microscópicos en Iberoamérica. México: Proagraf S. A.

Le Roes-Hill, M., Goodwin, C., y Burton, S. (2009). Fenoxazinona sintetasa: ¿qué hay en un nombre? *Tendencias en biotecnología*, 27 (4), 248-258.

Lesage-Meessen, L., Haon, M., Uzan, E., Levasseur, A., Piumi, F., Navarro, D., y Lomascolo, A. (2011). Relaciones filogeográficas en el hongo *Pypornoporus* Polypore inferidas de datos moleculares. *Cartas de microbiología FEMS*, 325(1), 37-48.

Levasseur, A., Lomascolo, A., Chabrol, O., Ruiz-Dueñas, FJ, Boukhris-Uzan, E., Piumi, F. y Benoit, I. (2014). El genoma del hongo de la pudrición blanca *Pycnoporus cinnabarinus*: un modelo de basidiomicetos con un arsenal versátil para la descomposición de la biomasa lignocelulósica. *Bmc Genomics*, 15 (1), 486.

Lomascolo, A., Cayol, JL, Roche, M., Lin, GUO, Robert, JL, Record, E., y Asther, M. (2002). Agrupación molecular de cepas de *Pycnoporus* de diversos orígenes geográficos y aislamiento de cepas monocarióticas para la hiperproducción de lacasa. *Mycological Research*, 106 (10), 1193-1203.

Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Herpoël-Gimbert, I., Sigoillot, JC, y Lesage-Meessen, L. (2011). Peculiaridades de las especies de *Pycnoporus* para aplicaciones en biotecnología. *Microbiología aplicada y biotecnología*, 92(6), 1129-1149.

Margulis, L., & Chapman, M. J. (2009). Kingdoms and domains: an illustrated guide to the phyla of life on Earth. Academic Press.

Montaño Morales, M. L. (2021). Identificación molecular de la cepa HEMIM 51 utilizando como marcador molecular el gen lacasas. Tesis De Licenciatura. Universidad Autónoma Del Estado de Morelos.

Nobles MK, Frew BP. 1962 – Studies in wood-inhabiting hymenomycetes: V. the genus *Pycnoporus* Karst. Canadian Journal of Botany 40, 987–1016.

Pérez-Silva, Evangelina, Elvira Aguirre-Acosta, and Cristina Pérez Amador. "Aspectos sobre el uso y la distribución de *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae) en México." *Scientia Fungorum* 3.4 (1988): 137-144.

Pompa A., Aguirre E., Encalada A., Cifuentes A., Valenzuela R. 2011. Los macromicetos del jardín botánico de ECOSUR “Dr. Alfredo Barrera Marin” Puerto Morelos, Quintana Roo

Ryvarden L. 1991 – Genera of polypores: nomenclature and taxonomy. Oslo. Norway. Synopsis Fungorum 5, 1-363.

Rungjindamai N, Pinruan U, Choeyklin R, Hattori T, Jones EBG. 2008 – Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*. Thailand. Fungal Diversity 33, 139–161

Sigoillot, C., Lomascolo, A., Record, E., Robert, JL, Asther, M., y Sigoillot, JC (2002). Sistema lignocelulolítico y hemicelulolítico de *Pycnoporus cinnabarinus*: aislamiento y caracterización de una celobiosa deshidrogenasa y una nueva xilanasa. *Tecnología de enzimas y microbios*, 31 (6), 876-883.

Solé M. 2002. Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden Onygenales. Tesis doctoral. Unidad de Microbiología. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Rovira y Virgili.

Srinivasan, C., TM D'Souza, K. Boominathan, y CA Reddy. 1995. Demostración de lacasa en el basidiomiceto pudrición blanca *Chrysosporium phanerochaete* BKM-F1767. *Appl. Reinar. Microbiol.* 61: 4274 hasta 427

Téllez-Téllez, M., Villegas, E., Rodríguez, A., Acosta-Urdapilleta, ML, O'Donovan, A., y Diaz-Godinez, G. (2016). Ensayo 11 de la micosfera: Hongos de *Pycnoporus*: identificación morfológica y molecular, distribución mundial y potencial biotecnológico. *Micosfera*, 7, 1500-1525.

Tormo Molina Rafael. 2014. Plantas y Hongos. Universidad de Extremadura Universidad de Extremadura <http://www.plantasyhongos.es/referencias/contenidos.htm>

Uzan, E., Nousiainen, P., Balland, V., Sipila, J., Piumi, F., Navarro, D., y Lomascolo, A. (2010). Laccasas de alto potencial redox de los hongos ligninolíticos *Pycnoporus coccineus* y *Pycnoporus sanguineus* adecuados para biotecnología blanca: desde la clonación de genes hasta la caracterización y aplicaciones de enzimas. *Revista de microbiología aplicada*, 108 (6), 2199-2213.

Webster, J., Y Weber, R. (2007). Basidiomycota. En Introduction of Fungi (pág. 487). United Kingdom: Cambridge University Press.

Cuernavaca, Morelos a 16 de marzo de 2022

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **Francisco Damian Rios Morales**, con el título del trabajo: **IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE Pycnoporus EMPLEANDO COMO MARCADOR MOLECULAR EL GEN DE LA LACASA.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación Profesional por Etapas como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. MA. DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA

SECRETARIO: DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ

VOCAL: DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL

SUPLENTE: DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ

SUPLENTE: M. EN C. MARIEL ADAME ROMÁN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIEL ADAME ROMÁN | Fecha:2022-03-16 16:52:12 | Firmante

IWCIXFw8dAa5HqR3YVveKY5qGhdaR2AicBtgjQYyrx2YFzYFYNKUdrillrPF6zJnGE8xc50JFBvkBxRPM9rkOyX5GQWYpdyMLvDZ+Kpv8R5g6LFJn7BiWm/qSO5jilM1VmlS4cn4RLW7zt9o0voYNLkzSrti08HaWQDWHVJ/k3+8MD+f6DRCKnG9/TvnFHnVuvldfH5GEoZ81xSr0lNyi8djicYFrHhO/CEGdda5MzCFbp8yPOoDziW3HGm3A72JE6r5HEK1DKxyT Tk7ZgD6uLOH/MjA4QZowil9X57Kq5L1vY2xXX7gbljwzq4gFdqZJXP7PbRfTlcpjsBZg==

MA DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA | Fecha:2022-03-16 18:24:45 | Firmante

odaVQOp/sM7V8HsbzdrR3k8e7tPcCBrp7e1b1KU2oCW9wJYwKCGNAvdoFWrQp74BsNuVgOEJb8PoBsOs7uNX5/InwJrf+Ja1eKFXfMmlho5T0I9N5i7STPIQ67iv8KD9KkYHroBLzf6qjVvwNPdc2gkFY97w81rlwKyZntig6MeCrBOCHQwr8VXpxMHWPmMP6kWRHiNudy7CuKYqYzoBAOzyV9hOIBEbatHznolyhT502ITSGLe6wRFKjbAizeEx0sAerppgDdu 883lu6vKtkuYntFxbdmGm9oPUqcPakxP/P82lXzisZcfasNLE8vXyyPFgAYcrzg7hM3nRQ==

MAURA TELLEZ TELLEZ | Fecha:2022-03-16 21:55:57 | Firmante

gqCgDhzleipaiNU4Re8ZL3A5iBxqTUS2/dWUze2imYF+NPq4STuBpZ+LHCp8g2PUJRI8L5SHZ63+h87kz5SZ7aOOXgs/dLi5aPMJ8e+RrrB01YQIBjKX5kKVirK4fkifDHOuoWIOI9L1fx3j1nEsloEH6LLSjeNAM39OfxneG6lCZzyY706dWxWzogQwxjO9z52byV3A2WfdFbjp4D1qS77K2wka4/9uMqNrmvy8WYUJ+x8a/g+OPLqAbb/YE/f8zqDasstFZZWj1yPseUhcEiZ9NczJOWI94RQdyASvkUmUZ86xns6D3G20rSeOt77xl8R229SV+M1E6L8Vcjp+g==

GERARDO DÍAZ GODÍNEZ | Fecha:2022-03-17 08:35:49 | Firmante

NXvwors4n6JT402QqnXTO8mFmlvBoqliDacYaVlcSc4vhyEaolKdd1YY3cFyhdC3yebVkvVWwIU6FovUb8IJ7ykYQwCtCR1NBr30bS8KOFptWtnH7abfRXd5xnIAfqMxxpEN8cpmWHz3WGBPdCfBC7+A5ZSQBPyPmUbCch3UkZVPsXgKrxhirBHtX7O30UE5UnZkKrZ1B6aj9o9CiGgKuAKPmBjHFwvbtU1v775cKW09i0DMXGCoyewhP3j/p4V95zMEILRMCsVHz a9lmR7UEG1HzXELDEKzX4rfyBOmo2qic63tda0XGxH1leDdF4xEX1zQWf9RwGpiAxROF8SxLgQ==

ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL | Fecha:2022-03-18 15:14:35 | Firmante

aE7oti308dclM6NyT0tmJfSTclLUqn/uw0nabnjroMpXXJfmRDeiki5HjV2LsYDs0PsfdBubu+c1ifFSsOql/vO89G/2THdLKZY0NX17Vn2/bok59arSb7z5J6PjbAZCdmRZLAsEITy+TAjm7MQBqhODa9SxhQTPihLtfSomGtlwC99sSJ+1wuXIDZh6e6VCx6aSwspAxaAQ4+oZoYNwRH12g6Npbd7ziY2soB8IGH3qEmX8KUqBxrHcNTOAaklSJJiX5gZK3zANMu8TV oqXkx7CLFPuHZKhTPreVXRtlKacDpDKGUDhJiACkqGaQcYnCMXbbecVYLaX3RixVsA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



XD72cJIZw

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/T05N47Ly2k2UbGhLm4kFFnywTcnFIOaD>

