



FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

Universidad Nacional del Litoral

“Obtención de Protoplastos en Hongos Agaricomycetes para Aplicaciones Biotecnológicas”

**Tesina para optar por el título de Licenciado en Biotecnología.
Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular.**

Baronetti Guillermo

Director: Dr. Cabeza, Matías Sebastián

Santa Fe – Argentina
2025

A mi familia Y amigos

El presente trabajo de investigación de tesina fue llevado a cabo en el laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular ubicado en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Los resultados aquí expuestos han sido compartidos de manera parcial en las siguientes conferencias científicas:

Baronetti, G. “Obtención de protoplastos de *Pleurotus ostreatus* mediante un formulado enzimático comercial.” XVI Congreso Argentino de Microbiología 21, 22 y 23 de agosto de 2024 Palermo, Buenos Aires, Argentina.

Baronetti, G. “Extracción de protoplastos *Pleurotus ostreatus* mediante lisis enzimática.” XXVII Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral. 1, 2, 3 y 4 de octubre de 2024. Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

Baronetti, G. “Obtención de Protoplastos en hongos Agaricomycetes para Aplicaciones Biotecnológicas.” 5ta edición Instituto de Medicina Regional. 3 de octubre de 2024. Resistencia, Chaco, Argentina.

Agradecimientos

En estas primeras páginas quisiera dejar asentado el agradecimiento a todas las personas y entidades que me acompañaron durante todo este trayecto, por las cuales sin su apoyo, orientación y colaboración, este logro no habría sido posible, de cada uno de estos momentos y personas me llevo los mejores recuerdos, que atesoraré siempre.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral y a sus autoridades por permitirme realizar mi carrera de grado, brindándome una educación de calidad y un desarrollo personal. Un lugar que, con el tiempo, se ha convertido en una parte fundamental de mi vida, y del cual me siento profundamente orgulloso.

Al Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular, por dejarme ser parte de ese grupo privilegiado y de calidad, no solo educativa, profesional sino también humana. En donde pude llevar a cabo mis investigaciones, brindándome el apoyo y los recursos necesarios.

A mi director de cientibeca, Matías Cabeza, y mi codirectora, Paula Sacripanti Olalla quiero expresarles mi más profundo agradecimiento por haber confiado en mí desde el momento cero para llevar a cabo las investigaciones, con predisposición, amabilidad y dedicación, haciendo que el día a día sea más fácil. Formándome desde lo más básico hasta lo fundamental, estando para mí. Quienes siempre estuvieron para hacerme pensar y reflexionar sobre lo que veníamos trabajando, buscando que mejore mi pensamiento crítico y trabajo en grupo. Demostrando interés por el proyecto y siempre yendo un poco más, trabajando juntos por el mismo objetivo. Su implicación y esfuerzo fueron constantes, y por ello, les estoy doblemente agradecido, no solo por ser mis mentores, sino por ser compañeros en este camino.

A los doctores Guillermo García Efron y Soledad Gamarra, que pese a ser líderes en su campo confiaron en mí y me trataron como uno más de su equipo, brindándome su total confianza.

A mis compañeros de laboratorio, los cuales siempre me recibieron con una sonrisa, creando un ambiente más distendido, su ayuda fue invaluable, y cada día de trabajo compartido me recordó la importancia del trabajo en equipo, me llevo innumerables charlas, consejos, risas, extras de laboratorio que hicieron que siempre tuviera ganas de volver al día siguiente.

A mi familia Gustavo, Bibiana, Francisco, Karen y Santi, gracias por acompañarme incondicionalmente a lo largo de estos años de esfuerzo y dedicación, por comprender mis ausencias, por su paciencia en los momentos difíciles y por celebrar conmigo cada pequeño logro. Su apoyo me dio la fuerza para seguir adelante. Agradezco profundamente cada palabra de aliento, cada gesto de cuidado y cada sacrificio que hicieron para que hoy pueda alcanzar esta meta. Este logro es tanto mío como suyo.

¡Gracias!

I.



INDICE

Índice

Agradecimientos.....	3
Abreviaturas	9
Introducción	12
1.1- Características generales de los hongos.....	12
1.2- Aplicaciones biotecnológicas de los hongos.....	12
1.3- Hongos Macroscópicos	14
1.3.1- Filo Ascomycota.....	14
1.3.2- Filo Basidiomycota.....	14
1.3.2.1- Clase Agaricomycetes y su impacto en la ecología, agricultura y biotecnología....	15
1.4- Mecanismos de reproducción en basidiomicetos	15
1.4.1- Ciclo reproductivo en basidiomicetos	15
1.4.2- Genética del apareamiento	17
1.4.3- Fíbulas: Estructuras clave en la morfología del dicarionte.....	18
1.5- Pared celular fúngica: composición, estructura y función protectora	18
1.6- Protoplastos fúngicos.....	19
1.6.1- Tratamiento enzimático para la obtención de protoplastos.....	19
1.7- Optimización de cepas fúngicas para aplicaciones biotecnológicas	20
1.8- Hongos de interés comercial.....	21
1.8.1- <i>Ganoderma sp.</i>	21
1.8.2- <i>Pleurotus sp.</i>	22
2- Objetivos.....	25
Materiales y métodos.....	27
3.1- Materiales y reactivos químicos	27
3.2- Especies fúngicas	27
3.3.1- Cepas bacterianas y procedimientos de cultivos.....	27
3.3.2- Cepas de <i>Escherichia coli</i>	27
3.3.3- Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	27
3.3.4- Transformación de <i>E. coli</i> por método de shock térmico	28
3.3.5- Extracción de ADN plasmídico.....	29
3.3.6- MIDI preparación de ADN plasmídico	29
3.4- Vectores utilizados.....	30
3.5- Extracción de ADN de hongos filamentosos	32

3.6- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	32
3.6.1- PCR empleando colonias bacterianas como molde (<i>colony-PCR</i>)	33
3.7- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	33
3.8- Purificación de DNA desde geles de agarosa.	34
3.8.1- Cuantificación de ácidos nucleicos	34
3.9- Determinación de la secuencia nucleotídica de ADN	34
3.9.1- Oligonucleótidos	34
3.9.2- Análisis de las secuencias	35
3.10- Digestión enzimática de ADN.....	35
3.10.1- Ligación de fragmentos de ADN	35
3.11- VinoTaste Pro	36
3.11.1- Soluciones para la obtención y transformación de protoplastos fúngicos	36
3.12 Protocolo de ensayo: Transformación de protoplastos mediante PEG	37
Resultados y discusión	40
4.1- Cepas fúngicas: origen, cultivo y conservación.....	40
4.2- Identificación molecular de cepas fúngicas mediante secuenciación de la región ITS.40	
4.2.2- Secuenciación directa de los productos de PCR de las regiones ITS.	42
4.2.3- Secuenciación de las regiones ITS clonadas en pGEM-T Easy	43
4.3- Obtención de monocariontes a partir de esporas de <i>Ganoderma sessile</i>	46
4.3.1- Medición velocidad de crecimiento en monocariontes	48
4.3.2- Cruzamiento de monocariontes	50
4.4- Obtención de Protoplastos.....	52
4.4.1- Protocolo obtención de protoplastos <i>Pleurotus ostreatus</i>	53
4.4.2- Protocolo obtención de protoplastos <i>Ganoderma sessile</i>	60
4.4.2.1- Eficiencia regenerativa de protoplastos de <i>G. sessile</i>	61
4.5- Ensayo de sensibilidad antifúngica	62
4.6- Ensayos de transformación.....	64
4.6.1- Obtención de ADN Plasmídico	64
4.6.2- Transformación estable con PEG	64
4.6.4- Transformación por Electroporación	66
Conclusiones	69
Bibliografía.....	73

II.

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATB	Antibiótico
ADNr	ADN ribosómico nuclear
CIM	Concentración inhibitoria mínima
° C	Grados centígrados
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
g	Gramos
xg	Fuerza de centrifugación relativa
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i>)
g/l	Gramos de soluto en un litro de solución
hs	Horas
LB	Luria-Bertani
M	Molar
MEA	Agar Extracto de Malta
min	Minutos
mM	Milimolar
mg	Miligramos
mg/ml	Miligramo de soluto en un mililitro de solución
ml	Mililitros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDA	Medio de cultivo (Agar papa dextrosa)
PEG	Polietilenglicol
p/v	Gramos de soluto en mililitros de solución
RNAse	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
SB	Medio de cultivo Sabouraud Glucosa Agar

seg	Segundos
vol.	Volúmenes
μL	Microlitros
μM	Micromolar
YPD	Medio de cultivo (del inglés, <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>)

01

INTRODUCCIÓN

Introducción

1.1- Características generales de los hongos

Los organismos del reino fungi son uno de los más antiguos en la tierra, apareciendo hace unos 300 millones de años, se calcula que hay más de 1.500.000 especies de hongos. Compuestos por células eucariotas, pueden ser unicelulares, como las levaduras o multicelulares, como los mohos. En este último caso, sus estructuras vegetativas están formadas por hifas, que pueden ser septadas (con tabiques a intervalos regulares) o cenocíticas (sin tabiques, con un citoplasma continuo). Las hifas pueden ser hialinas o pigmentadas; estas últimas, conocidas como hifas dematiáceas, presentan un color oscuro característico. El conjunto de hifas forma el micelio, estructura ramificada y filamentosa, y su agrupación constituye la colonia del hongo. El micelio (cuerpo vegetativo) es el encargado de absorber los nutrientes del entorno para sustentar el crecimiento del organismo.

Los hongos son organismos mayoritariamente aerobios estrictos, aunque algunos pueden presentar metabolismo anaerobio facultativo. Son heterótrofos, ya que carecen de pigmentos fotosintéticos y dependen de la materia orgánica producida por otros seres vivos para su nutrición. Para ello secretan enzimas hidrolíticas, oxidantes y ácidos que les permiten descomponer y absorber los componentes del sustrato, como carbohidratos, lípidos y proteínas. Los hongos pueden reproducirse tanto de manera sexual como asexual, lo que es relevante para su clasificación taxonómica, y generan células especializadas llamadas esporas y conidios, cruciales para su identificación morfológica [1].

Se encuentran ampliamente distribuidos, desarrollándose en la mayoría de los climas, tropicales, subtropicales, templados y fríos. A pesar de su diversidad y relevancia ecológica, industrial y médica, solo una mínima parte del reino Fungi ha sido explorada y caracterizada científicamente.

1.2- Aplicaciones biotecnológicas de los hongos

Los hongos desempeñan un papel fundamental en diversas áreas de la biotecnología debido a su capacidad para producir una amplia variedad de enzimas y compuestos bioactivos con aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria y ambiental. Su uso en la producción de biocombustibles y pigmentos también ha sido ampliamente explorado. Además, estos organismos intervienen en procesos biológicos esenciales, como la descomposición de materia

orgánica, la fermentación industrial y la bioconversión de residuos agrícolas lignocelulósicos en productos de alto valor nutricional. A nivel comercial, se cultivan aproximadamente 35 especies del reino Fungi, de las cuales cerca de 20 se producen a escala industrial, incluyendo variedades con propiedades medicinales [2].

Desde el punto de vista nutricional, presentan características favorables para la alimentación humana, ya que poseen un bajo contenido de calorías, sodio, grasas y colesterol, mientras que su porcentaje de proteínas, que oscila entre el 20 y el 40% del peso seco, los posiciona como una fuente proteica superior a muchas frutas y verduras. Su utilización en la fermentación de productos como quesos y bebidas alcohólicas resalta su importancia en la industria alimentaria. Además, la bioconversión de residuos agrícolas mediante fermentación sólida permite cultivar hongos comestibles como alternativa para la producción de alimentos proteicos, reduciendo el impacto ambiental asociado a la acumulación de estos desechos [3].

En la industria farmacéutica, ciertos metabolitos secundarios derivados de hongos han sido fundamentales en la síntesis de medicamentos. Un ejemplo representativo es la penicilina, un antibiótico obtenido a partir de *Penicillium notatum*, cuya actividad antibacteriana revolucionó el tratamiento de enfermedades infecciosas. Asimismo, diversas especies fúngicas han demostrado poseer propiedades inmunomoduladoras, antitumorales y antiinflamatorias, lo que ha impulsado su estudio en la medicina moderna. Se ha identificado que algunos compuestos extraídos de hongos pueden contribuir a la regulación de la presión arterial, los niveles de glucosa y lípidos en sangre, además de actuar como agentes inhibidores del crecimiento microbiano [4]. El mejoramiento genético y la ingeniería genómica han permitido el desarrollo de nuevas cepas optimizadas para la producción de metabolitos específicos con aplicaciones industriales. Entre las especies más utilizadas en biotecnología se encuentran *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Trichoderma reesei*, organismos que destacan por su elevada capacidad de secreción de proteínas y su procesamiento postraducciona complejo, facilitando la producción de enzimas y otras proteínas de interés comercial. Los mismos han sido clasificados como seguros por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), lo que respalda su uso en la industria alimentaria y farmacéutica [5-6].

Por otra parte, su uso en procesos ecológicos ha cobrado relevancia en los últimos años, especialmente en la estabilización y remediación de ecosistemas. En este contexto, los hongos micorrízicos han sido empleados en la inoculación de plantas para mejorar su resistencia al estrés ambiental y a enfermedades, promoviendo así un crecimiento más eficiente en suelos degradados. Adicionalmente, se han explorado estrategias basadas en la inoculación en pilas de

compost, lo que favorece la descomposición de residuos y la generación de productos orgánicos útiles para la agricultura [7].

En conclusión, los hongos han demostrado ser organismos versátiles con una amplia gama de aplicaciones en la industria, la salud y la sostenibilidad ambiental. Su relevancia en la producción de biomoléculas de interés, su contribución a la seguridad alimentaria y su impacto positivo en la conservación del medioambiente resaltan la importancia de continuar con su estudio y optimización mediante herramientas biotecnológicas avanzadas.

1.3- Hongos Macroscópicos

Los hongos macroscópicos comprenden un grupo de especies cuya principal característica es la formación de cuerpos fructíferos visibles a simple vista, comúnmente conocidos como setas. Estos hongos pertenecen mayoritariamente a los filos Basidiomycota y, en menor medida, Ascomycota, y cumplen un rol fundamental en los ecosistemas como descomponedores, simbioses o patógenos.

1.3.1- Filo Ascomycota

El filo Ascomycota abarca aproximadamente dos tercios de todas las especies, siendo el grupo de hongos más extenso. Los ascomicetos presentan una amplia gama de formas, que incluyen desde levaduras, unicelulares, hasta hongos con cuerpos fructíferos macroscópicos complejos. Se caracterizan por la formación de ascos, estructuras en forma de saco donde se generan las esporas sexuales llamadas ascosporas.

1.3.2- Filo Basidiomycota

El filo Basidiomycota agrupa a un amplio conjunto de hongos que se caracterizan por producir esporas sexuales denominadas basidiosporas, las cuales se originan en células especializadas llamadas basidios. Este filo incluye a la mayoría de los hongos macroscópicos. Los Basidiomycota forman micelios altamente organizados, que en condiciones favorables dan lugar a cuerpos fructíferos complejos (basidiocarpos), visibles a simple vista. Biológicamente, se destacan por su sistema de apareamiento, que frecuentemente es tetrapolar, y por la presencia de estructuras típicas como las fíbulas (*clamp connections*), que ayudan a mantener la condición dicariótica [8]. Este grupo tiene gran relevancia ecológica como descomponedores de materia

lignocelulósica y formadores de simbiosis (micorrizas), así como potencial en la industria alimentaria, médica y biotecnológica.

1.3.2.1- Clase Agaricomycetes y su impacto en la ecología, agricultura y biotecnología

Los Agaricomycetes son una clase de hongos dentro del filo Basidiomycota, ampliamente reconocido por sus llamativas estructuras reproductoras, las setas. Esta clase, una de las más recientes en surgir dentro del reino Fungi, abarca 17 órdenes y más de 21,000 especies. Se encuentran distribuidos en todo el mundo, entre la materia orgánica superficial o entre las fibras de la madera de los árboles. Desempeñan un papel fundamental en la preservación de selvas y bosques, ya que contribuyen a la descomposición de materia orgánica, liberando minerales esenciales que las plantas pueden absorber. Además, la mayoría de las plantas que forman bosques se benefician de su asociación simbiótica con estos hongos, quienes protegen sus raíces de patógenos y facilitan la absorción de minerales de baja solubilidad, como el fósforo [9]. Los formadores de setas desempeñan un rol importante en la agricultura contribuyendo al control de plagas y enfermedades, ecología, y en la medicina utilizados en la producción de antibióticos, además de ser una fuente de alimento con cada vez mayor relevancia [10]. Las setas, no solo protegen las células reproductivas, sino que también facilitan la dispersión de esporas, alcanzando grandes niveles de complejidad celular, con hasta 30 tipos de células morfológicamente distinguibles. El desarrollo del cuerpo fructífero se desencadena por factores ambientales cambiantes por ejemplo la disponibilidad de nutrientes, y conlleva una transición del micelio vegetativo a un cuerpo fructífero multicelular complejo. El micelio vegetativo, compuesto de hifas dispuestas de manera laxa se lo considera como un grado de multicelularidad simple. Por el contrario, la generación del cuerpo fructífero requiere una reprogramación de los patrones de ramificación de las hifas, formando una estructura tridimensional compacta donde estas se adhieren estrechamente [11].

1.4- Mecanismos de reproducción en basidiomicetos

1.4.1- Ciclo reproductivo en basidiomicetos

La reproducción es la formación de nuevos individuos con características típicas de la especie. Comienza a partir de una espora, que se libera al abrirse el píleo permitiendo la propagación. La misma germina cuando se encuentra en un ambiente favorable, formando hileras ramificadas de células denominadas hifas, encargadas de absorber las sustancias nutritivas del medio. Las

enzimas liberadas al exterior permiten la descomposición del material vegetal. El conjunto de hifas forma el micelio, una extensa red de células que conforman la parte vegetativa del organismo, a su vez, estas pueden ser fragmentadas y formar nuevos micelios, o encontrarse con otro grupo de hifas mononucleadas compatibles, lo que da lugar a un intercambio de núcleos y formación de células binucleadas (dicarionte) obteniendo así una mezcla genética. A partir de este momento, el micelio tendrá todas sus nuevas células con dos núcleos, es decir, ocurre una migración recíproca de núcleos, donde los núcleos de la célula fusionada actúan como "donantes" y se trasladan hacia las células del monocarionte compatible que actúa como "receptor". Las células dentro de un filamento hifal están separadas por tabiques que contienen un complejo de poros conocido como dolíporo, el cual generalmente bloquea el movimiento de núcleos entre las células. Una vez que dos núcleos compatibles se encuentran dentro de la célula apical de la hifa, el crecimiento posterior ocurre en forma de un micelio dicariótico en lugar de diploide. Esta fase dicariótica prolongada es una característica distintiva de los hongos basidiomicetos y puede mantenerse de manera indefinida. En contraste, en los ascomicetos (tanto unicelulares como filamentosos), la fusión celular entre pares compatibles es seguida rápidamente por la fusión de los núcleos [12].

Luego dado el desarrollo del micelio y las condiciones ambientales favorables, este puede formar estructuras reproductoras conocidas como cuerpos fructíferos o setas, características de zonas húmedas. La morfología de las setas puede variar mucho, desde simples esferas hasta estructuras planas sin pie o formas arbustivas, pero siendo la forma más típica la de un sombrero soportado por un pie. En estas setas todas sus células son binucleadas. Sin embargo, en el tejido fértil, conocido como himenio, que generalmente se encuentra entre las laminillas o poros del sombrero, los dos núcleos se fusionan en uno solo. Luego, este núcleo se divide en cuatro, generando esporas que contienen una combinación genética de los dos núcleos parentales. Las cuatro esporas permanecen unidas por una fina conexión en la superficie de la célula que las originó, formando el basidio. Finalmente, las esporas se liberan, se dispersan y el ciclo se repite [9].

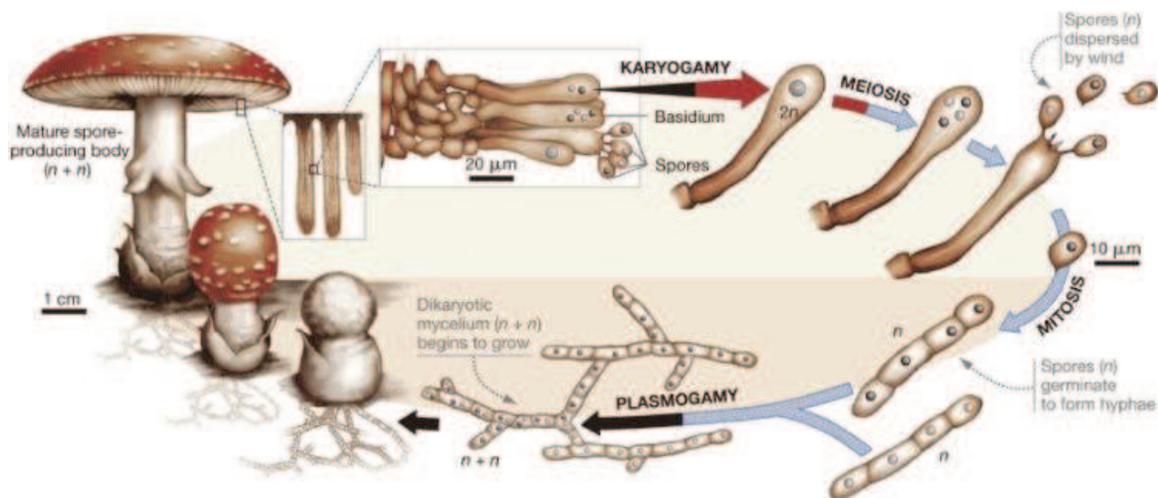


Figura 1.- Ciclo reproductivo. Esquemización del ciclo reproductivo de los hongos basidiomicetos. Se observó la germinación de las esporas, el crecimiento del micelio monocariótico, la formación del micelio dicariótico tras la fusión de hifas compatibles y el desarrollo del cuerpo fructífero. En el himenio, ocurre la cariogamia y posterior meiosis, dando origen a nuevas esporas que completan el ciclo.

1.4.2- Genética del apareamiento

Los basidiomicetos, a diferencia de otros eucariotas como mamíferos, no desarrollaron dos sexos definidos, sino que poseen múltiples tipos de apareamiento. Este sistema, característico en hongos con forma de seta está regulado por genes ubicados en dos loci no ligados, denominados A y B, que regulan las interacciones de apareamiento entre cepas haploides. Para que el apareamiento sea compatible, los organismos deben poseer alelos diferentes en ambos loci, como en el caso de A1B1 con A2B2. Solo un tipo de interacción entre los micelios monocariote es compatible, dando un micelio dicariote que es capaz de formar cuerpos fructíferos. Cuando las células de la punta dicariótica se establecen, se generan conexiones en forma de pinza en cada nueva célula, las cuales se fusionarán posteriormente con la penúltima célula. Las tres combinaciones restantes no resultan fértiles, en otras palabras, el 75% de las combinaciones posibles no pueden generar esporas tras el apareamiento [7]. Estos hongos se clasifican como tetrapolares, ya que, como consecuencia de la meiosis, la descendencia sexual puede presentar cuatro tipos diferentes de patrones de apareamiento. Por el contrario, si ambos organismos comparten los mismos alelos en los loci A y B, no se produce intercambio nuclear, y los hongos retoman su crecimiento en estado monocariote haploides [12].

1.4.3- Fíbulas: Estructuras clave en la morfología del dicarionte.

La morfología del dicarionte presenta diferencias notables con respecto al monocarionte, siendo su característica más distintiva una forma compleja de división celular. Este proceso incluye la formación de estructuras conocidas como conexiones de pinza, *clamps* o fíbulas, que aseguran que cada célula dicarionte retenga una copia de cada núcleo haploide. Durante la división, uno de los núcleos migra hacia una protrusión (fíbula) desde la célula apical, mientras que el otro permanece cercano a esta región. Posteriormente, ambos núcleos se dividen de manera coordinada. Se forman septos que dividen los núcleos en diferentes compartimentos. Uno de los núcleos queda inicialmente atrapado en la fíbula, mientras el otro permanece en la célula subapical. Posteriormente, la célula de la pinza se fusiona con la célula subapical, permitiendo que el núcleo atrapado en la pinza regrese y restablezca el estado dicarionte [12].

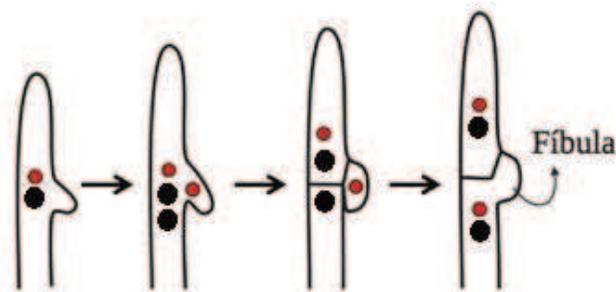


Figura 2.- Formación de la fíbula. A partir de una célula dicarionte, se produce la división mitótica, donde la célula madre se divide en dos células hijas, ambas con el mismo material genético. Esto da lugar a la formación de un septo, que encierra uno de los núcleos (rojo) en la fíbula. Posteriormente, la célula de la pinza se fusiona con la célula subapical, permitiendo que el núcleo de la pinza se libere en la célula subapical, restaurando el estado dicarionte.

1.5- Pared celular fúngica: composición, estructura y función protectora

La pared celular de los hongos desempeña un papel fundamental como barrera protectora, actuando como límite entre ambientes hostiles, brindando protección de los protoplastos siendo la parte más externa de la célula. Su ausencia puede provocar la muerte del organismo, a menos que se encuentre en presencia de un estabilizador osmótico. Alrededor del 80-90% de la materia seca de la pared celular está compuesta por aminoazúcares, hexosas, ácidos hexurónicos,

metilpentosas y pentosas que contribuyen a su estructura y función. Los polisacáridos cristalinos, quitina y β -glucanos, constituyen la porción esquelética de la pared, mientras que los polisacáridos amorfos y los complejos proteína-polisacárido son componentes de la matriz de la pared [13].

Debido a la necesidad de ser fuerte y flexible, esta se encuentra formada por una mezcla de fibras reticuladas y componentes de la matriz, siendo el principal el glucano, polímero de glucosa, que puede encontrarse como cadenas largas con enlaces β -1,3 las cuales le confieren elasticidad y resistencia, o cortas β -1,6. En la mayoría de los organismos del reino fungi, el núcleo central de la pared celular es un β -1,3/1,6-glucano ramificado que está unido a quitina a través de un enlace β -1,4. Además, la pared contiene proteínas, mananos, polímeros que se entrecruzan y quitina, un polímero de cadena larga con enlaces β -1,4 de N-acetilglucosamina, un derivado de la glucosa, proporcionando resistencia, constituyendo entre el 10 y el 15% del peso seco total de la pared celular en hongos filamentosos [14].

1.6- Protoplastos fúngicos

Un protoplasto se define como la estructura que deriva de una célula vegetativa, la cual sufrió la lisis de la pared celular. La fragilidad osmótica, la pérdida de rigidez, forma esférica, heterogeneidad en cuanto a su bioquímica y fisiología son algunos de los criterios que definen y caracterizan a estas células [15]. La edad fisiológica del cultivo influye notablemente en el rendimiento de la obtención de protoplastos en donde las paredes de cultivos en la fase temprana y media exponencial de crecimiento son más susceptibles a la lisis enzimática que las paredes derivadas de cultivos más antiguos del hongo, como así también en menor medida la naturaleza del medio de cultivo [16].

Estas células son herramientas útiles para la manipulación genética en hongos, como así también en otro tipo de organismos como plantas.

1.6.1- Tratamiento enzimático para la obtención de protoplastos

Para la obtención de protoplastos se requiere la eliminación de la pared celular, lo que se logra principalmente a través del tratamiento enzimático. Existen también métodos no enzimáticos para preparar protoplastos, como técnicas físicas-mecánicas. Sin embargo, estos métodos no se emplean de manera generalizada debido a sus limitaciones prácticas y el bajo rendimiento de los protoplastos obtenidos. La pared celular de los hongos es altamente dinámica y cambia durante

la división celular, el crecimiento, la germinación de las esporas, la ramificación de las hifas y la formación del diafragma. Además, los componentes de la pared celular varían entre las distintas especies de hongos, lo que requiere el uso combinado de varias enzimas [10].

Las enzimas específicas utilizadas de manera aislada suelen ser ineficaces, lo cual es comprensible dada la complejidad y diversidad de la composición de la pared de las hifas. Sin embargo, muchos hongos de interés actual contienen quitina y glucano como principales componentes de la pared celular, y las enzimas que hidrolizan estos polímeros suelen estar presentes como actividades secundarias en preparaciones comerciales de enzimas, como las celulasas [17].

1.7- Optimización de cepas fúngicas para aplicaciones biotecnológicas

Los hongos filamentosos representan una herramienta fundamental en biotecnología debido a su capacidad para crecer rápidamente sobre sustratos económicos, secretar enzimas extracelulares y producir metabolitos secundarios de interés. Con el avance de la ingeniería genética, ha sido posible optimizar estas cepas para mejorar su rendimiento productivo, estudiar funciones génicas específicas o introducir características nuevas de valor industrial.

Una de las principales estrategias empleadas es la transformación genética, que consiste en introducir material genético exógeno en el genoma del hongo. Esto puede permitir la sobreexpresión de genes propios, la incorporación de genes heterólogos o la supresión de funciones no deseadas. Sin embargo, debido a la diversidad estructural de las paredes celulares fúngicas, los protocolos de transformación deben ser adaptados cuidadosamente para cada especie. Entre las metodologías más comunes se encuentran la transformación de protoplastos, la electroporación y el uso de vectores integrativos.

El desarrollo de herramientas de edición génica ha ampliado significativamente el potencial de manipulación en hongos. En particular, el sistema CRISPR/Cas9 ha permitido realizar modificaciones precisas en genes de interés. Este sistema se basa en el reconocimiento de secuencias específicas por un ARN guía (gRNA) que dirige la enzima Cas9 para cortar el ADN en un sitio definido. A partir de allí, la célula repara el daño mediante mecanismos naturales como la unión de extremos no homólogos (NHEJ), que suele inactivar el gen, o la reparación dirigida por homología (HDR), que permite insertar secuencias específicas. La eficiencia de esta técnica en hongos depende de la accesibilidad del sistema al núcleo, la capacidad de expresión del complejo CRISPR y el conocimiento de las secuencias genómicas.

Otra estrategia de mejoramiento es la fusión de protoplastos, que permite combinar el material genético de diferentes cepas, incluso entre especies o géneros que no serían sexualmente compatibles. Este proceso requiere la remoción de la pared celular, la inducción de la fusión mediante agentes químicos como el PEG o técnicas como la electrofusión, y la posterior regeneración del protoplasto en condiciones osmóticamente controladas. La fusión puede dar lugar a híbridos con características combinadas, como mayor tolerancia a condiciones ambientales adversas o perfiles metabólicos ampliados.

Estas tecnologías han impulsado la generación de cepas fúngicas más eficientes para la producción de enzimas industriales, antibióticos, pigmentos naturales, compuestos bioactivos y biomateriales. No obstante, la aplicación de estas herramientas requiere no solo de precisión técnica, sino también de un marco regulatorio claro y de una evaluación rigurosa del impacto ambiental y de bioseguridad, especialmente cuando se trata de organismos genéticamente modificados.

En resumen, la optimización genética de cepas fúngicas mediante transformación, edición génica y fusión de protoplastos constituye una de las áreas más prometedoras de la biotecnología moderna, con un alto potencial para el desarrollo de procesos sustentables e innovadores en múltiples industrias.

1.8- Hongos de interés comercial

1.8.1- *Ganoderma sp.*

Ganoderma sp. es un hongo perteneciente al orden Polyporales, ampliamente reconocido por sus aplicaciones en la medicina tradicional. Presenta una distribución geográfica extensa, abarcando regiones tropicales, subtropicales y templadas de Europa, América, África y Asia.

Su composición química incluye principalmente carbohidratos (21,83–27,78 %), fibras (59–65 %), proteínas (7–8 %), grasas (1,1–8,3 %) y cenizas (0,72–1,77 %). Además, contiene una amplia variedad de compuestos bioactivos, entre los que se destacan triterpenos, polisacáridos, esteroides, ácidos grasos, aminoácidos, alcaloides, proteínas y elementos inorgánicos.

Diversos estudios han demostrado que muchos de estos compuestos poseen efectos inmunomoduladores y propiedades antioxidantes, antitumorales, anticancerígenas, así como beneficios potenciales en el tratamiento de la diabetes, el síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, y en la modulación de la microbiota intestinal, entre otros.



Reino: Fungi
División: Basidiomycota
Clase: Agaricomycetes
Orden: Polyporales
Familia: Ganodermataceae
Género: *Ganoderma*
Especie: *G. lucidum*

Imagen tomada de *Mycelium Running* (Stamets, 2005, p. 231).

Figura 3.- *Ganoderma lucidum*. Imagen de *G. lucidum* basidiomiceto.

1.8.2- *Pleurotus* sp.

Es un hongo comestible perteneciente al orden Agaricales, conocido comúnmente como hongo ostra o gírgola. Se cultiva ampliamente en diversas regiones del mundo, especialmente en el sudeste asiático, India, Europa y África, debido a su valor nutricional, facilidad de cultivo y aplicaciones culinarias. Los hongos ostra ocupan el tercer lugar en cuanto a producción comercial de hongos a nivel mundial, aunque, *P. ostreatus* es el segundo más cultivado a nivel mundial. Esta especie crece de manera natural en madera en descomposición, saprofito, y su creciente interés por su cultivo y consumo se debe principalmente a su sabor, como así también a propiedades medicinales y nutricionales. *P. ostreatus* puede cultivarse de forma simple y económica, ya que sus setas presentan una baja susceptibilidad a plagas y enfermedades, lo que hace que su cultivo sea más conveniente en comparación con otras especies. Presentan la capacidad de usar como sustrato una gran variedad de residuos lignocelulósicos, descomponiéndolos en poco tiempo, pudiéndose aprovechar así grandes cantidades de residuos agroindustriales. Los cuerpos fructíferos se caracterizan por poseer gran cantidad de minerales asimilables como cobre, hierro, potasio, magnesio, fosforo y zinc [18].



Reino: Fungi
Filo: Basidomycota
Clase: Agaricomycetes
Orden: Agaricales
Familia: Pleurotaceae
Género: *Pleurotus*
Especie: *Ostreatus*

Imagen tomada de *Mycelium Running* (Stamets, 2005, p. 280).

Figura 4.- *Pleurotus ostreatus*. Imagen de *P. ostreatus* hongo gírgola.

02

OBJETIVOS

2- Objetivos

El objetivo general del trabajo es desarrollar y optimizar un protocolo eficiente para la obtención de protoplastos viables a partir de micelio de hongos agaricomycetes. Este protocolo se ajustará para maximizar tanto el rendimiento como la viabilidad de los protoplastos, con el fin de utilizarlos en posteriores experimentos como fusión celular para la generación de híbridos, transformación genética para la inserción de genes de interés, u otros estudios celulares.

Para poder cumplir con lo mencionado anteriormente, se elaboraron los siguientes objetivos específicos:

1. Confirmar molecularmente la identidad de distintas cepas fúngicas mediante el uso de técnicas de biología molecular.
2. Obtener y caracterizar cultivos monospóricos.
3. **Obtener protoplastos fúngicos utilizando una mezcla enzimática comercial de grado técnico y posterior regeneración micelial.**
4. Realizar ensayos de transformación genética en protoplastos fúngicos como base para futuros desarrollos metodológicos.
5. Evaluar la sensibilidad de los protoplastos frente a carboxina.

03

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

3.1- Materiales y reactivos químicos

Los componentes de los medios bacteriológicos fueron obtenidos de Laboratorios Britania (Argentina). Los reactivos para biología molecular fueron adquiridos de los representantes en Argentina de las firmas: Promega, Invitrogen y Thermo Scientific. Todos los demás reactivos químicos empleados fueron de la más alta calidad comercialmente disponible (Sigma-Aldrich, Merck, BD o similares).

3.2- Especies fúngicas

Las cepas utilizadas en este estudio fueron obtenidas del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales (CERZOS - UNS/CONICET) y de un productor local de setas.

3.3.1- Cepas bacterianas y procedimientos de cultivos

3.3.2- Cepas de *Escherichia coli*

La cepa de *E. coli* Top10 (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina), se utilizó para propagar el plásmido pGEM®-T Easy. Vector en el que se insertaron los distintos fragmentos de ADN amplificados por PCR. Esta cepa está modificada genéticamente presentando mutaciones en los genes *recA*, *endA* y *hsd*. La mutación en la endonucleasa (*endA*-) mejora la calidad del ADN obtenido, ya que se elimina la actividad endonucleasa inespecífica, mientras que la mutación de *recA* provoca una deficiencia en la recombinación, mejorándose así la estabilidad del inserto. La mutación *hsdR17*, protege de la digestión al ADN clonado por un sistema endógeno de endonucleasas (*EcoK*). Estas características genéticas le confieren ciertas ventajas para su utilización en técnicas moleculares de clonaje y propagación básicas. Además, es portadora del gen *lacIqZΔM15*, que permite la selección de plásmidos recombinantes por el método de selección de colonias azules y blancas.

3.3.3- Cultivo de *Escherichia coli*

Las células de *E. coli* TOP10 fueron utilizadas para mantenimiento y replicación de plásmidos. Las células fueron cultivadas a 37^o C en medio Lysogeny broth de Luria-Bertani (LB), con agitación a 180 rpm. Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos, se utilizó ampicilina

100 µg/ml. Para conservar las cepas de *E. coli* Top 10 portadoras de plásmidos, se sembraron por aislamiento en medio LB sólido con ampicilina y se incubaron a 37° C durante 18 h. A partir del aislamiento, se seleccionó una colonia que se inoculó en 3 ml de medio LB ampicilina líquido, incubándose en agitación (150 rpm) a 37° C durante 18 h. Se alicuotaron distintos tubos con 400 µl del cultivo y 400 µl de glicerol estéril, y se almacenaron a -80° C.

La composición de los medios de cultivo empleados se detalla a continuación:

- Lysogeny broth de Luria-Bertani (LB).

Tripteína Bacteriológica	1,0 g
Extracto de Levadura	0,5 g
Cloruro de sodio	0,5 g
Agua destilada	100 ml
pH	7,0
- LB-Glucosa (LB-Glc): medio LB se le adicionó glucosa al 2% (p/v).
- LB-Agar: medio LB más agar a una concentración final de 2% (p/v).

Esterilizar en autoclave (1 atm de presión) durante 20 min.

3.3.4- Transformación de *E. coli* por método de shock térmico

- Preparación de células competentes:

Las células de *E. coli* TOP10 se hicieron crecer en medio LB líquido a 37° C, con agitación de 180 rpm durante 18 hs. Una vez conseguido un cultivo saturado, se realizó una dilución 1/20 del mismo en medio LB fresco y se incubó en iguales condiciones hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,5 - 0,6$ característica de la fase de crecimiento logarítmica. Se tomaron alícuotas de 1 ml de estas células, las cuales fueron cosechadas por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y posteriormente resuspendidas en 500 µl de solución de transformación ST1 (MOPS-NaOH 100 mM, KCl 10 mM, pH 7,0). Se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 500 µl de solución de transformación ST2 (MOPS-NaOH 100 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM, pH 6,5). Se incubaron en hielo durante 15 min, se centrifugaron 5 min a 5000 rpm y se resuspendieron en 100 µl de ST2.

- Transformación de células competentes:

A 100 µl de una suspensión de bacterias competentes se le adicionaron 7 µl de la mezcla de ligación o 3 µl de ADN plasmídico 30 ng/µl en su forma circular. La mezcla se incubó 1 hora en

hielo, posteriormente se realizó un choque térmico por 45 seg a 42° C y nuevamente se incubó 2 min en hielo. Inmediatamente se agregó 1 ml de medio LB-glucosa y se incubó a 37° C durante 1 hora. Finalmente, las células se centrifugaron durante 5 min a 4800 rpm, se resuspendieron en 100 µl de medio LB y se sembraron en placas de LB-agar suplementado con ampicilina (100 µg/ml) utilizado para la selección de transformantes. Las placas se incubaron en estufa a 37° C hasta la visualización de colonias.

3.3.5- Extracción de ADN plasmídico.

Este protocolo se usó para obtener ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli*. Los clones seleccionados en medio LB con ampicilina (5 ml con 5 µl de ampicilina 100 µg/ml) se cultivaron durante toda la noche a 37° C en agitación (180 rpm). Estos inóculos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 250 µl de solución A (Tris pH 8 50 mM; EDTA pH 8 10 mM). Luego se adicionó 1 µl RNAsa 25 mg/ml, seguido de 250 µl de solución B (NaOH 200 mM; SDS 1%), se mezcló gentilmente e incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se agregó 350 µl de solución C (CH₆CIN₃ 4 M; CH₃CO₂K 0,5 M; pH 4,2 con CH₃COOH) y se mezcló hasta la formación de un precipitado blanco. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 min y se tomaron 600 µl del sobrenadante transfiriéndolo a una columna de sílica. Se dejó reposar por 2 min y se centrifugó a 13000 rpm por 30 s, se descartó el “*flow through*”. Se adicionaron 700 µl de solución D (NaCl 16 mM; Tris pH 7,5 1,6 mM) y se centrifugó a 13000 rpm por 30 s, se descarta el “*flow through*”. Este paso se repitió una vez más y luego se centrifugó la columna vacía por 2 min a 13000 rpm. Finalmente se transfirió la columna a un tubo limpio de 1,5 ml y se adicionaron entre 50 -100 µl de solución E (Tris pH 8 10 mM). Se incubó a temperatura ambiente 5 min y se centrifugó a 13000 rpm por 30 s para eluir el ADN plasmídico. Los plásmidos obtenidos se examinaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y se midieron sus concentraciones en NanoDrop™ para su posterior almacenamiento a - 20° C.

3.3.6- MIDI preparación de ADN plasmídico

Este protocolo se usó para obtener cantidades entre 2-4 µg/µl de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli*. El cultivo bacteriano se lleva a cabo en las mismas condiciones que el protocolo de minipreparación de ADN plasmídico, ampliando el volumen inicial a 100 ml. Los inóculos se centrifugaron por 10 min a 8000 rpm, el pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de buffer TEG (100 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, 20% glucosa). Posteriormente se añadió 4 ml de solución NS (0.2 M NaOH, 1% p/v SDS) mezclando por inversión. A continuación se agregó

El vector pOMRP2 permite la expresión del gen reportero fuGFP en *Ganoderma lucidum*, bajo el control de un promotor constitutivo GPD (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) compatible con hongos filamentosos. Es un vector que se utiliza para una transformación transitoria ya que no posee marcador de selección para hongos. Posee un origen de replicación para *E. coli* con ampicilina como antibiótico de selección para las colonias transformantes. Mientras que el pOMRP4 β es un vector que presenta el mismo promotor GPD con la diferencia que posee resistencia a los antifúngicos higromicina y carboxina, permitiendo una selección de las colonias transformantes, y por lo tanto una transformación estable. Estos dos últimos vectores fueron provistos desde la iniciativa de distribución de plásmidos **FreeGenes Project** de la Universidad de Stanford (recientemente discontinuado).

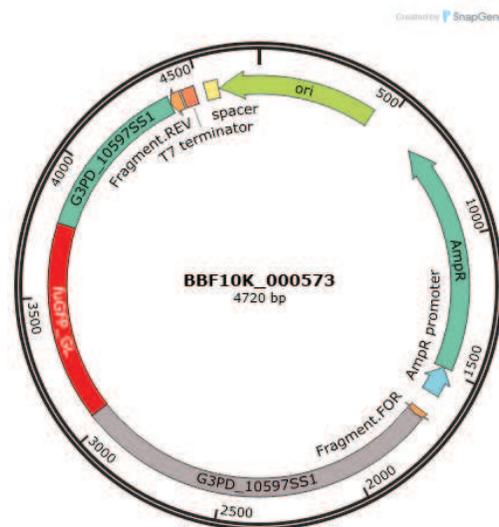


Figura 6.- pOMRP2 BBF10K_000573. Imagen recuperada de SnapGene.

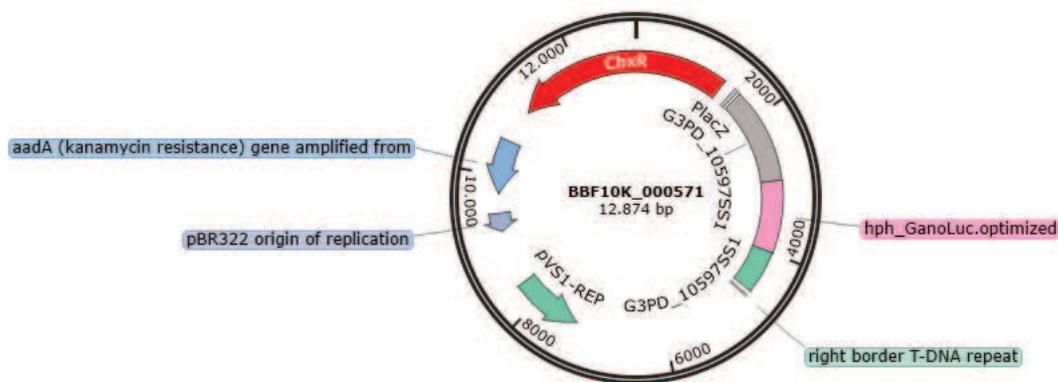


Figura 7.- pOMRP4 β BBF10K_000571. Imagen recuperada de SnapGene.

3.5- Extracción de ADN de hongos filamentosos

El ADN genómico fue extraído por el método de Fenol-Cloroformo adaptado para hongos filamentosos. Las cepas fueron crecidas en medio MEA líquido a 28° C hasta observar desarrollo de micelio (24-48 h según la cepa). Con la ayuda de una punta de pipeta de plástico se recogió el micelio y se dejó secar sobre papel Whatman. El micelio seco se transfirió a un microtubo de 1,5 ml con 0,4 ml de buffer de lisis (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 100 mM EDTA pH 8, 1% SDS) y un volumen de perlas de vidrio. Se procedió a vortexear a máxima velocidad por 1 min, intercalando con incubaciones en hielo de 1 min, repitiendo esta operación 3 veces. A este tubo se le agregó 0,4 ml de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (FCI) 25:24:1 (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina), se agitó suavemente y se centrifugó 15 min a 13000 rpm, recogiendo el sobrenadante. Al mismo se le añadió cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vortex y se centrifugó 5 min a 13000 rpm. Para precipitar el ADN se agregó 0,1 vol. de acetato de sodio 3 M (pH 4,8) y 2 vol. de etanol absoluto, se mezclaron suavemente y se incubaron a -20° C por 30 min. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm a 4° C por 15 min. El ADN precipitado se resuspendió en agua destilada estéril.

- Agar Extracto de Malta (MEA)

Extracto de Malta	3 g
Pluripeptona	0,5 g
Agar	1,5 g
Agua destilada	100 ml

3.6- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó la amplificación de los genes de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se emplearon los siguientes reactivos: 1,5 U ADN Polimerasa Taq, 2,5 mM de MgCl₂, PCR buffer 1X, 0,4 mM de dNTPs (Promega), 1 µM de primer, 5-50 ng totales de ADN genómico o ADN plasmídico y agua grado PCR, para completar un volumen de reacción de 20-25 µl finales. El termociclador (BIO-RAD T100 Thermal Cycler) fue programado para el caso de Taq Pegasus con un ciclo de 5 min a 94° C, luego 30 ciclos de 1 min a 94° C, 45 seg a la temperatura de *annealing* adecuada para cada reacción en particular y entre 1 y 2 min a 72° C dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar (1 min por kb), seguidos por un ciclo final de 5 min a 72° C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa.

3.6.1- PCR empleando colonias bacterianas como molde (*colony-PCR*)

La amplificación de la secuencia nucleotídica se llevó a cabo en un volumen final de 15 μ L. Utilizando los siguientes reactivos: 0,5 U ADN Polimerasa Taq Pegasus, 0,9 mM de MgCl₂, PCR buffer 1X, 0,3 mM de dNTPs (Promega), 0,3 μ M de primer, como molde se utilizaron las colonias obtenidas de una transformación, tomando con una punta estéril una pincelada y agregándola al fondo del tubo de reacción. El termociclador (BIO-RAD T100 Thermal Cycler) fue programado para el caso de Taq Pegasus con un ciclo de 5 min a 94° C, luego 30 ciclos de 1 min a 94° C, 45 seg a la temperatura de *annealing* adecuada para cada reacción en particular y entre 1 y 2 min a 72° C dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar (1 min por kb), seguidos por un ciclo final de 5 min a 72° C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa.

3.7- Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para el análisis de fragmentos de ADN en geles de agarosa se empleó el sistema horizontal submarino. La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,8 y 2 % p/v, según el tamaño de los fragmentos a separar. Los geles se prepararon en buffer TAE 1x con gel-Green Biotium® (Genbiotech, Argentina) a una concentración final de 0,3 μ g/ml. Al volumen de muestra, se le añadió una dilución de 1/3 de solución de siembra. La separación electroforética se llevó a cabo en solución TAE 1x, empleando voltaje constante entre 80-100 V. Para la visualización del ADN en el gel se empleó un transiluminador de luz azul (470 nm).

Composición de las soluciones utilizadas:

- **Buffer de electroforesis: tris acetato EDTA (TAE)**

Tris	40 mM
Ácido Acético	40 mM
EDTA	1 mM
pH	8,0

- **Buffer de siembra de ADN**

Azul de bromofenol	0,25 %
Glicerol	30 %
Agua destilada	69,75 %

3.8- Purificación de DNA desde geles de agarosa.

Los fragmentos de DNA obtenidos a partir de las reacciones de PCR o de las digestiones enzimáticas se corrieron en geles de agarosa al 1 - 1,5%. Una vez identificado cada segmento de interés, se recortó la porción del gel que lo contenía con bisturí, y se purificó con el sistema comercial *Wizard*[®] SV Gel and PCR CleanUp System (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.8.1- Cuantificación de ácidos nucleicos

La calidad y cantidad de ADN fueron evaluadas con el Espectrofotómetro NanoDrop[™] Lite (Thermo Scientific[™]) midiendo la absorbancia a 260 nm, en el que un valor de A260 de 1 corresponde, aproximadamente, a 50 mg/ml de ADN doble hebra. Para cada medición se utilizó un volumen de 1 μ l. La posible contaminación por proteínas fue determinada mediante el cociente A260/A280. Las muestras consideradas aceptables presentaron un valor para dichas relaciones comprendido entre 1,8 y 2.

3.9- Determinación de la secuencia nucleotídica de ADN

Para determinar la secuencia de ADN de los distintos fragmentos clonados se utilizó el servicio provisto por Macrogen Sequencing System, Corea. Para el cual se enviaron 20 μ l de plásmido 100 ng/ μ l y 10 μ l de un oligonucleótido específico (5 μ M). Las muestras fueron procesadas en un secuenciador automático y los datos de las secuencias con sus respectivos cromatogramas nos fueron enviados digitalmente.

3.9.1- Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Genbiotech (GBT, Buenos Aires, Argentina), se recibieron liofilizados y se resuspendieron en agua milliQ. El volumen de agua a agregar, se calculó siguiendo las instrucciones del fabricante para obtener una concentración de 100 μ M en la solución madre de los cebadores. A partir de esta solución madre se prepararon diluciones de 10 μ M o 5 μ M en función de si los oligonucleótidos iban a ser utilizados en PCR o para secuenciación, respectivamente. Estas soluciones se conservaron a – 20° C.

Tabla 1. Cebadores para amplificación de la región ITS y Tm.

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Ta ° C	Referencia
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	65	(White, Bruns, Lee & Taylor, 1990)
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	58	(White, Bruns, Lee & Taylor, 1990)

Se estableció la temperatura Ta, temperatura de *annealing* o anillado, de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados. $Ta = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) - 5^\circ C$.

3.9.2- Análisis de las secuencias

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, se analizaron con programas informáticos. Para las búsquedas de homología, se consultaron las bases de datos EMBL, GenBank utilizando el programa BLAST, accesible a través del servidor del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.10- Digestión enzimática de ADN

Las enzimas de restricción, también conocidas como endonucleasas, son enzimas que reconocen secuencias específicas del DNA doble cadena y cortan los enlaces fosfodiéster del mismo. Las enzimas más utilizadas para clonado reconocen sitios de corte de entre 4 a 8 nucleótidos, que tienen un eje de simetría (secuencias palindrómicas). Estas enzimas se utilizaron para generar fragmentos y su posterior clonado en vectores (DNA recombinante). Las reacciones de digestión del ADN se realizaron a 37° C, durante 2 hs en un volumen final de 20 µl utilizando enzimas de restricción Promega, según las indicaciones del fabricante. Los productos obtenidos se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se identificaron por comparación con un marcador de peso molecular de referencia.

3.10.1- Ligación de fragmentos de ADN

Para realizar las reacciones de ligación se mezclaron inserto y vector en una relación molar de 3:1 respectivamente, utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega), en un volumen de reacción de 15 µl. La reacción se mezcló y se incubó a 4° C durante toda la noche para aumentar el rendimiento de la ligación.

3.11- VinoTaste Pro

Preparación enzimática utilizada en una variedad de procesos de la industria alimenticia con actividad (1,3)-beta-D-glucanasa que hidroliza sucesivamente (1,3)-beta-D-glucanos a partir del extremo no reductor que libera alfa-glucosa y poligalacturonasa que hidroliza los vínculos de (1,4)-alfa-D-galactosidurónico en pectato y otros galacturonanos. Obtenida comercialmente de la compañía Novozymes.

3.11.1- Soluciones para la obtención y transformación de protoplastos fúngicos

- Citrato de sodio: 1 M
- Ácido cítrico: 1 M
- Manitol 0,6 M

Tabla 2. Rangos de pH 3-6,2

Se mezclan las soluciones de ácido cítrico y citrato de sodio en las proporciones indicadas y se ajusta el volumen final a 100 ml con agua desionizada.

Solución	A	B	C	D	E	F	G	H	I
ml Ácido Cítrico 0,1 M	46,5	40	35	31,5	25,5	20,5	16	11,8	7,2
ml Citrato de Sodio 0,1 M	3,5	10	15	18,5	24,5	29,5	34	38,2	42,8
pH	3	3,4	3,8	4,2	4,6	5	5,4	5,8	6,2

Tabla 3. Soluciones empleadas para la obtención de protoplastos

Todas las soluciones se esterilizaron en autoclave, durante 20 min a 1 atm de presión.

Solución	Composición
CAM	Manitol 0,6 M (5,47 g/50 ml); 1,18 ml Ácido Cítrico 1 M; 3,82 ml Citrato de sodio 1 M; pH 5,8.
Solución de lisis	Enzima VinoTaste Pro 10% p/v, llevar a volumen en buffer CAM. Esterilizar por filtración con membrana 0,22 µM.

Tabla 4. Medios empleados para la obtención y transformación de protoplastos

Todas las soluciones se esterilizaron en autoclave, durante 20 min a 1 atm de presión.

Solución	Composición
MEA Manitol	3 g/100 ml Extracto de malta; 0,5 g/100 ml Pluripeptona; 10,9 g/100 ml Manitol 0,6 M. Para MEA sólido agregar 1,5 g/100 ml de Agar.
MEA Manitol 0,7%	3 g/100 ml Extracto de malta; 0,5 g/100 ml Pluripeptona; 10,9 g/100 ml Manitol 0,6 M; 0,7 g/100 ml de Agar.
YPD	20 g/l Pluripeptona; 10 g/l Extracto de levadura; 20 g/l Glucosa; H ₂ O destilada.

3.12 Protocolo de ensayo: Transformación de protoplastos mediante PEG

Materiales:

- Buffer CAM pH 5,8.
 - PEG 4000 30%: Para 100 ml de solución PEG, pesar 30 g de PEG y llevar a volumen con buffer CAM pH 5,8. Se recomienda alicuotar en volúmenes pequeños para evitar contaminación a la hora de su uso, esterilizar por autoclave y conservar a temperatura ambiente.
 - Medio 0,7 % p/v agar MEA manitol 0,6 M: Antes de su uso deberá fundir el agar y mantener en baño de agua a 42° C para evitar su solidificación.
 - Medio MEA manitol 0,6 M tanto en medio sólido (placas de Petri) como líquido, se recomienda agregar cloranfenicol debido a que el tiempo de regeneración de los protoplastos es mayor que cualquier desarrollo por contaminación bacteriana:
 - Control de viabilidad, sin el agente selector.
 - Control negativo, con la presencia de agente de selección, en este estudio se usó carboxina.
 - Transformantes, se recomienda hacer varias placas de transformación debido a la baja eficiencia.
1. En un microtubo de 1,5 ml colocar 12,5 µl de 30% PEG 4000 (El PEG es viscoso, por eso se coloca en estufa a 60° C durante un tiempo y antes de usar se enfría a temperatura ambiente), 1 µg de DNA plasmídico y 50 µl de la suspensión de protoplastos 10⁷ / 10⁸ protoplastos/ml. Mezclar con micropipeta, pipeteando entre 4-6 veces.

Además incluir los controles: "Negativo" y "De viabilidad": ambos sin DNA, reemplazando el volumen del DNA por buffer CAM.

2. Incubar la mezcla PEG / DNA / protoplastos en hielo durante 10 minutos.
3. Cumplida la incubación en hielo, agregar a cada microtubo conteniendo la mezcla 500 μ L de 30% PEG 4000 y mezclar gentilmente. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Pasados los 30 minutos, agregar a la mezcla buffer CAM frío (gota a gota, un volumen aproximado de 1 ml, nótese que llegara a la capacidad máxima del microtubo).
5. Para el plaqueo, mezclar 3 ml de medio MEA con agar al 0,7 % p/v y manitol 0,6 M con 100 μ l de la suspensión de protoplastos. El agar debe mantenerse a 60 °C para evitar su solidificación.
6. Verter la totalidad del volumen del paso anterior sobre una placa con medio MEA previamente solidificado y distribuir homogéneamente.

04

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados y discusión

4.1- Cepas fúngicas: origen, cultivo y conservación.

Las cepas utilizadas en este estudio fueron obtenidas del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales (CERZOS - UNS/CONICET) y de un productor local de setas. Las especies estudiadas incluyen *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* y *Trametes versicolor*. Cabe destacar que estas cepas también están siendo utilizadas en otros proyectos desarrollados dentro del LMDM, lo que subraya su importancia para diversas líneas de investigación.

La identificación inicial de las especies se realizó en su lugar de origen mediante caracterización fenotípica, considerando rasgos morfológicos y fisiológicos. Sin embargo, con el fin de asegurar una correcta asignación taxonómica, se decidió complementar este análisis con técnicas de identificación molecular. Esta aproximación no solo permite confirmar la identidad de las cepas, sino también optimizar de manera más específica sus requerimientos nutricionales, evaluar sus potenciales aplicaciones biotecnológicas y compararlas con cepas de referencia.

Se realizaron ensayos para evaluar el crecimiento y la densidad del micelio en distintos medios de cultivo: YPD, PDA y SB. En líneas generales, para todas las cepas analizadas, se observó que el crecimiento micelial varió según el medio utilizado. En PDA se registró una expansión radial más rápida, mientras que en YPD y SB, aunque la expansión fue menor, el micelio presentó una mayor densidad y compactación. Estos resultados evidencian que la composición del medio no solo influye en la velocidad de crecimiento, sino también en la morfología y la densidad del micelio.

Para el mantenimiento de las cepas, se realizaron repiques semanales, inoculando un fragmento de micelio en el centro de placas con medio YPD y cultivando a 28 °C durante 5 a 7 días. Para su conservación a largo plazo, las cepas fueron almacenadas en glicerol al 50 % (v/v). El glicerol actúa como crioprotector, previniendo la formación de cristales de hielo que podrían dañar las células durante la congelación, y permitiendo así mantener su viabilidad a -80 °C.

4.2- Identificación molecular de cepas fúngicas mediante secuenciación de la región ITS.

Se realizó la identificación de las cuatro cepas de trabajo mediante técnicas de biología molecular. Para ello, las cepas fueron cultivadas en medio MEA a 28 °C durante 5 a 7 días.

Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de ADN genómico utilizando el método Fenol-Cloroformo, basado en el protocolo descrito por Sambrook y colaboradores [19]. La obtención de biomasa se realizó a partir del crecimiento del micelio sobre papel celofán dulce. En este método, el micelio se desarrolla sobre la superficie del celofán, absorbiendo los nutrientes por difusión desde el medio subyacente. Esta estrategia permite una separación sencilla del micelio, sin arrastre de agar, lo que facilita un secado más rápido y una extracción de ADN más eficiente, reduciendo así los tiempos del proceso.

Posteriormente, se llevó a cabo una amplificación por PCR de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal, utilizando los cebadores universales ITS1 e ITS4.

4.2.1- Sobre la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*).

Los hongos representan el grupo de eucariotas más diverso, con estimaciones que oscilan entre 1,5 y más de 5 millones de especies. Tradicionalmente, su identificación se ha dado en base a características fenotípicas y fisiológicas, enfoque que presenta limitaciones debido a la complejidad de los organismos. En este contexto, el código de barras de ADN se ha convertido en una herramienta clave para su identificación. Se basa en una región corta, estandarizada y altamente variable que permite diferenciar organismos con especificidad. Para ser útil, esta región debe ser uniforme dentro de una especie y única entre especies, incluso en aquellas estrechamente relacionadas. La región del espaciador interno transcrito (ITS) del ADN ribosómico nuclear (ADNr) se convierte en la región más secuenciada para identificar la taxonomía fúngica a nivel de especie, e incluso dentro de la especie. La región ITS muestra un mayor grado de variación en comparación con las otras regiones del ADNr (SSU y LSU).

El ITS es una región no codificante altamente polimórfica, con una longitud que varía entre 450 y 750 pb, formada por dos subregiones, ITS1 e ITS2, que están divididas por el ADNr 5.8S. La amplificación de dicha secuencia está dada por cebadores específicos, siendo los más utilizados a nivel investigación el ITS1 e ITS4 [20].

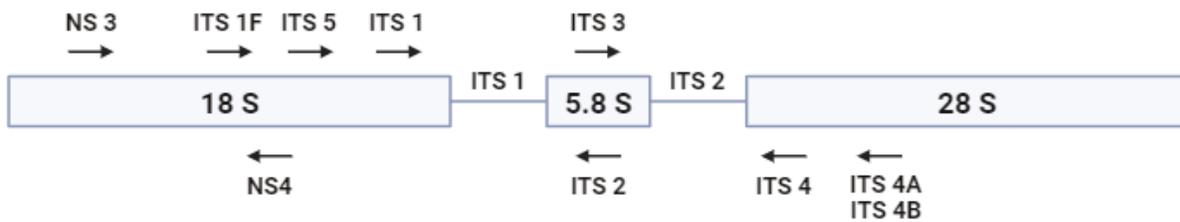


Figura 8.- Esquema de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosómico en hongos. Se representan las subunidades 18S, 5.8S y 28S del ARN ribosómico, junto con las regiones ITS1 e ITS4. Se indican los sitios de unión de distintos cebadores utilizados en la amplificación y secuenciación de estas regiones.

4.2.2- Secuenciación directa de los productos de PCR de las regiones ITS.

La secuenciación de la región ITS fue realizada por la compañía Macrogen (Corea). Al analizar los resultados, se observó en la cepa *Ganoderma sp.* una superposición de señales a partir de una determinada posición del cromatograma, lo que sugiere la presencia de una inserción o deleción (indel) (figura 9). Este desplazamiento en la lectura secuencial indica la posible coexistencia de dos variantes distintas de la región ITS dentro de la misma muestra, lo cual podría explicarse por la presencia de dos núcleos haploides diferentes en una célula dicariótica. En este caso, uno de los núcleos contendría un indel en la región ITS, mientras que el otro no, generando una superposición de secuencias que da lugar a un cromatograma ambiguo. En contraste, los cromatogramas correspondientes al resto de las cepas no presentaron este tipo de variaciones, permitiendo una lectura clara y continua de la secuencia. No obstante, para asegurar la precisión de los resultados y evitar posibles errores de interpretación, se procedió a la secuenciación de clones individuales, como se detalla en la figura 10.

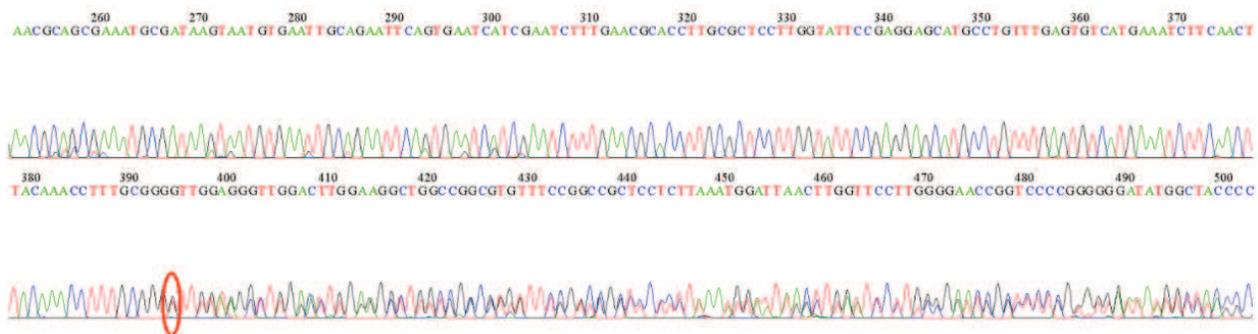


Figura 9.- Cromatograma producto de PCR. Secuenciación del producto de PCR en donde se ve el solapamiento de los nucleótidos.

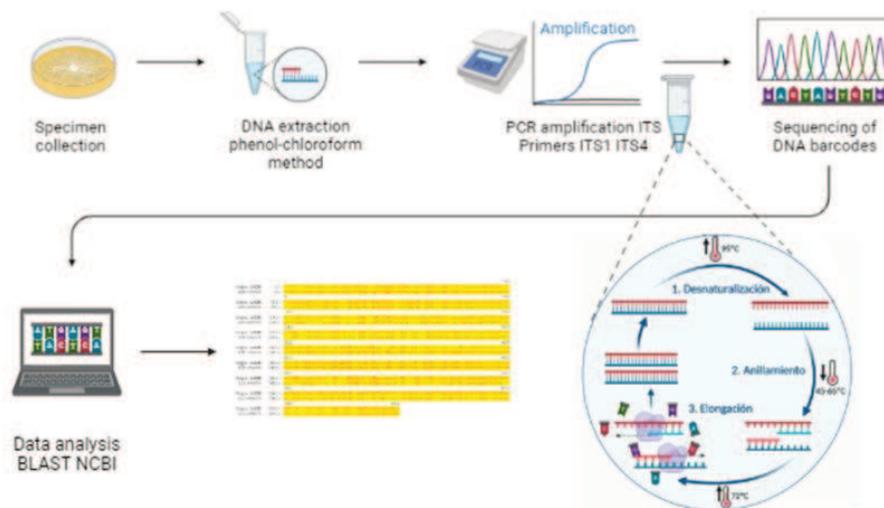


Figura 10.- Esquemática de la identidad de cepas fúngicas. Imagen generada en Biorender.

4.2.3- Secuenciación de las regiones ITS clonadas en pGEM-T Easy

Con el objetivo de obtener secuencias individuales representativas de cada núcleo, se optó por clonar el producto de PCR en el vector pGEM-T Easy, el cual fue posteriormente utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* cepa TOP10. Para verificar la incorporación del fragmento deseado, se realizó una *colony PCR*, y luego se llevaron a cabo minipreparaciones de ADN plasmídico para cuatro clones de *Ganoderma sp.* y para las tres cepas restantes. Las concentraciones de ADN extraído fueron medidas utilizando un espectrofotómetro NanoDrop.

Para confirmar la inserción de los fragmentos ITS en el vector pGEM®-T Easy, se optó por la técnica de *colony PCR* en lugar de una digestión enzimática. Esta decisión se basó en que los fragmentos amplificados con los cebadores ITS1 e ITS4 provenían de cuatro cepas fúngicas diferentes, y sus secuencias exactas - incluyendo la posible presencia de sitios de restricción - no eran conocidas de antemano. La utilización de enzimas de restricción requiere conocer previamente un patrón predecible de corte para seleccionar las endonucleasas apropiadas y anticipar el tamaño esperado de los fragmentos.

Una vez confirmada la inserción de la región ITS en los vectores, los plásmidos correspondientes fueron enviados a secuenciar.

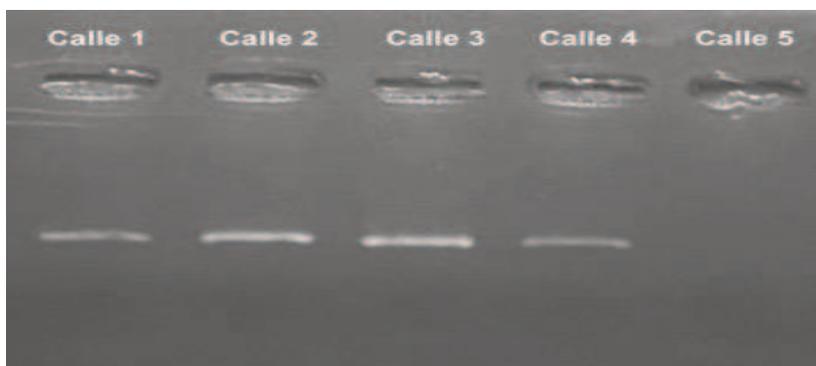


Figura 11.- Chequeo colony-PCR. Corrida electroforética en gel de agarosa colony-PCR chequeando el clonado. Calle 1: *Ganoderma sp. Clon1*. Calle 2: *Pleurotus ostreatus*. Calle 3: *Pleurotus djamor*. Calle 4: *Grifola frondosa*. Calle 5: Control negativo (colonia azul).

Tabla 5. Concentraciones ADN plasmídico $\mu\text{g/ml}$

	Calle 1	Calle 2	Calle 3	Calle 4
Concentración	88,2	95,3	102	100
R	1,85	1,83	1,83	1,86

4.2.4- Criterios para identificación molecular

Para la identificación de especies fúngicas mediante el análisis de la región ITS, se establecieron los siguientes criterios [21]. En todos los casos, se requiere una cobertura mínima del 90 % de la secuencia alineada para considerar válida la comparación:

- Una secuencia se asigna a una especie cuando la mejor coincidencia muestra una identidad $\geq 98\%$ y el siguiente mejor resultado (hit) presenta al menos un 0,8 % menos de identidad.
- La asignación a género se considera válida cuando la identidad se encuentra entre el 95 % y 98 %, o cuando se observa una identidad del 98 % con varias especies pertenecientes al mismo género.
- Se considera sin identificación cuando la identidad es $< 95\%$, o si el valor es del 95 % pero coincide con especies de diferentes géneros.

4.2.4.1- Identificación de la región ITS de la cepa *Ganoderma sp.*

Durante mucho tiempo, la identificación y, por ende, la clasificación de las especies del género *Ganoderma* se basaron principalmente en características morfológicas de los basidiomas y basidiosporas. Sin embargo, esta metodología ha demostrado ser limitada debido a la alta plasticidad fenotípica que presentan estas estructuras. Actualmente, el enfoque más confiable para la delimitación de especies dentro del género es el análisis filogenético basado en secuencias moleculares [22].

La taxonomía de *Ganoderma* ha sido objeto de numerosas revisiones y controversias. Diversos autores han planteado que *G. lucidum*, *G. sessile* y *G. resinaceum* podrían representar una misma especie o estar estrechamente relacionadas. Por ejemplo, Haddow (1931) consideró a *G. sessile* como sinónimo de *G. resinaceum*, mientras que Overholts (1953) sostuvo que *G. lucidum* era el nombre correcto para ejemplares identificados como *G. sessile*. A su vez, Nobles (1965) observó que muchos de los especímenes clasificados como *G. lucidum* en Estados Unidos correspondían en realidad a *G. sessile*, y propuso su reclasificación bajo ese nombre. En la misma línea, Steyaert (1972) también trató a *G. sessile* como sinónimo de *G. resinaceum* [23]. Al analizar las secuencias obtenidas de los cuatro clones correspondientes a la cepa de *Ganoderma* en estudio, se observó que dos de ellas presentaban un indel, mientras que las otras dos no. Esto permitió confirmar que las secuencias clonadas representan variantes correspondientes a los dos núcleos haploides coexistentes en la célula, validando así la hipótesis de dicarionte planteada previamente. Debido al origen americano de la cepa optamos por adoptar la taxonomía de *G. sessile* para nuestra cepa.

4.2.4.2- Identificación de la región ITS de la cepa de *P. djamor*.

En este caso, al no observarse una diferencia significativa ($\geq 0,8\%$) entre los primeros hits, y tratándose de coincidencias con distintas especies dentro del mismo género *Pleurotus*, se considera que la secuencia puede asignarse con mayor certeza únicamente a nivel de género, y no de especie. No obstante, dado que los cuerpos fructíferos presentan el característico color rosado, se optó por validar la asignación original de la cepa como *Pleurotus djamor*.

4.2.4.3- Identificación de la región ITS de la cepa de *P. ostreatus*.

En este caso la secuencia puede ser validada como correspondiente a *Pleurotus ostreatus*. La mejor coincidencia (hit) muestra una identidad del 98,98 % con una cobertura del 92 %, mientras que el siguiente mejor resultado, *P. ferulaginis*, presenta una identidad considerablemente menor (94,18 %) a pesar de una mayor cobertura (97 %). Esta diferencia supera el umbral establecido del 0,8 %, lo que respalda la asignación a nivel de especie.

4.2.4.4- Identificación de la región ITS de la cepa de *Trametes versicolor*.

Una de las cepas utilizadas en este estudio fue adquirida comercialmente como *Trametes versicolor*, según la identificación morfológica provista por el productor. Sin embargo, el análisis molecular de la región ITS mediante la herramienta BLAST reveló que la secuencia presenta mayor similitud con *Grifola frondosa*, una especie perteneciente a un género distinto, aunque dentro del mismo orden (Polyporales). Ambas especies comparten ciertas características fenotípicas, lo que podría haber llevado a una identificación errónea basada únicamente en criterios morfológicos. Este caso resalta la importancia del análisis molecular para una correcta asignación taxonómica.

Tabla 6. Blast NCBI

	<i>E Value</i>	% Identidad	% <i>Query Cover</i>
<i>G. frondosa</i>	0.0	97,75%	91%
<i>E. virescens</i>	0.0	95,74%	100%

4.3- Obtención de monocariontes a partir de esporas de *Ganoderma sessile*.

Las esporas fúngicas se originan a partir de la meiosis, un proceso en el que ocurre la recombinación de los cromosomas parentales, generando así variabilidad genética. Debido a este mecanismo, la probabilidad de que una spora conserve exactamente el mismo genotipo que sus progenitores es extremadamente baja o prácticamente nula. Por lo tanto, aunque las esporas mantienen el perfil genético general de la cepa, presentan nuevas combinaciones génicas.

En cambio, cuando se obtienen monocariontes a partir de la generación de protoplastos, la situación es diferente. En este caso, los núcleos parentales de una cepa dicariótica pueden separarse sin que ocurra recombinación, lo que permite aislar directamente cada uno de los genotipos originales. Esta estrategia puede ser beneficiosa en determinadas circunstancias, como en el caso de cepas de alto valor, aunque también puede representar una desventaja significativa [3].

Las basidiosporas de *Ganoderma sessile* (figura 12) se obtuvieron a partir de la fructificación de basidiocarpos maduros. Durante este proceso, las esporas se formaron en los basidios ubicados en la superficie del himenóforo, en la cara inferior de la estructura reproductiva, y fueron liberadas de forma mecánica sobre placas de Petri estériles.

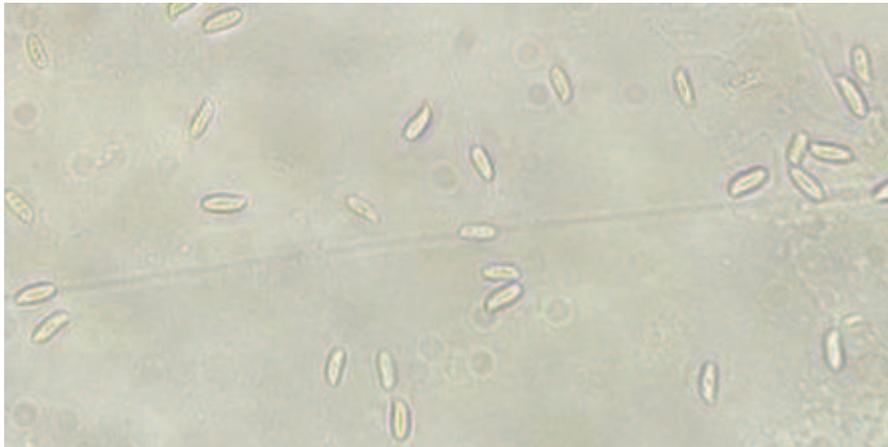


Figura 12.- Esporas de *G. sessile* al microscopio.

A continuación, se realizaron los recuentos correspondientes utilizando una cámara de Neubauer, seguidos de diluciones en agua destilada estéril. Las suspensiones resultantes se sembraron en medio MEA y las placas fueron incubadas a 28 °C hasta la aparición de colonias individuales, las cuales fueron posteriormente repicadas para su aislamiento.

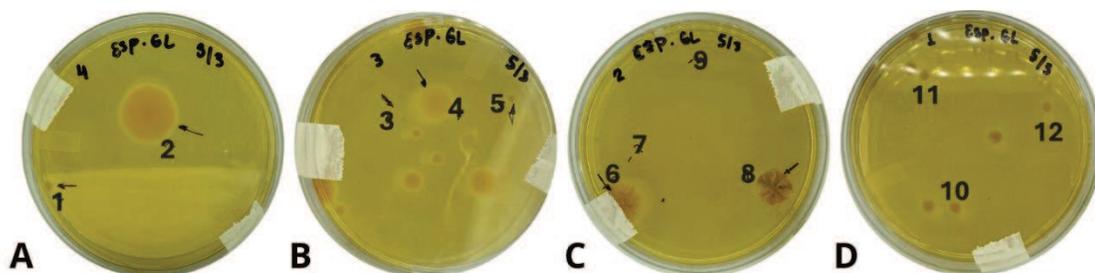


Figura 13.- Crecimiento de esporas *G. sessile*.

En la imagen 13 se observa el plaqueo de las diluciones de esporas en medio MEA, a partir del cual se realizó el repique y la obtención de los distintos aislados monocarióticos. El repique se efectuó seleccionando colonias que mostraban la mayor variabilidad fenotípica, con el objetivo de obtener un espectro representativo más amplio para su posterior caracterización.

En la placa C se identificaron las colonias 6 y 8, correspondientes a *Trichoderma sp.*, las cuales probablemente se originaron a partir de esporas ambientales presentes en la seta al momento de su recolección o desarrollo. Si bien la esporulación del hongo principal se llevó a cabo en condiciones asépticas, es habitual que, durante las etapas de crecimiento o fructificación, esporas de otros hongos presentes en el ambiente se depositen sobre el cuerpo fructífero y puedan germinar al ser sembradas.

Para confirmar la presencia de micelio monospórico (monocarionte), se realizó un preparado del micelio teñido con azul de lactofenol, con el objetivo de observar las estructuras fúngicas al microscopio. La evaluación se centró en la búsqueda de ausencia de fíbulas (*clamp connections*), cuya presencia es característica del micelio dicariótico.

Las fíbulas son estructuras que aseguran la distribución equitativa de los núcleos durante la división celular en hongos dicariontes, permitiendo que cada célula hija reciba un núcleo de cada progenitor. Este mecanismo es esencial para mantener la condición dicariótica a lo largo del crecimiento del micelio. En términos funcionales, las fíbulas actúan como canales que conectan células adyacentes, facilitando el paso nuclear y garantizando la continuidad genética característica de este tipo de micelio.

4.3.1- Medición velocidad de crecimiento en monocariontes

La obtención de monocariontes a partir de esporas presenta un interés particular debido a la variabilidad genotípica y fenotípica que pueden manifestar. Esta diversidad puede reflejarse en diferencias en la velocidad de crecimiento, así como en el tipo y morfología del micelio, características que podrían resultar valiosas en aplicaciones industriales. En este contexto, una mayor velocidad de crecimiento micelial, por ejemplo, podría traducirse en una reducción de los tiempos de cultivo y un aumento en la producción de biomasa o metabolitos secundarios.

Con el objetivo de evaluar estas diferencias, se realizaron ensayos de crecimiento en 10 monocariontes derivados de esporas, junto con un control tipo silvestre (*wild type*). Se inoculó un fragmento de agar (1 cm × 1 cm) en el centro de placas de Petri con medio de cultivo, y se incubaron a 28 °C. Las mediciones del crecimiento radial se realizaron por triplicado, iniciando a partir del tercer día de incubación y continuando durante cinco días dentro de la fase de

crecimiento exponencial. La medición se efectuó siempre desde el centro del inóculo hacia el mismo borde, con el fin de mantener la consistencia en los registros.

Para construir la gráfica de crecimiento, se calcularon los incrementos diarios (deltas), lo que permitió minimizar el impacto de posibles errores asociados al tamaño del inóculo, asegurando así que las diferencias observadas fueran atribuibles a características intrínsecas de cada cepa. Los resultados obtenidos revelaron que los monocariontes 1, 4, 7, 10 y 11 presentaron una mayor velocidad de crecimiento (figura 14). Al analizar las colonias obtenidas a partir de esporas, también se observaron diferencias marcadas tanto en la velocidad de germinación como en el crecimiento posterior del micelio. En particular, las colonias 1, 7 y 10 exhibieron un menor desarrollo inicial en el plaqueo, lo que sugiere una tasa de germinación más lenta. Sin embargo, posteriormente mostraron un crecimiento micelial más acelerado en comparación con otras colonias.

Este comportamiento sugiere que la velocidad de germinación y la velocidad de crecimiento micelial pueden estar reguladas por mecanismos distintos y no necesariamente correlacionados. Es posible que algunas esporas requieran más tiempo para activar su metabolismo antes de germinar, lo que no impide que posteriormente desarrollen un micelio más eficiente. En contraste, otras esporas podrían germinar rápidamente, pero mostrar un crecimiento micelial más lento, posiblemente debido al agotamiento temprano de sus reservas energéticas o a diferencias en la eficiencia de aprovechamiento de los nutrientes disponibles.

Un ejemplo claro de esta discrepancia fue el monocarionte 2, que presentó una germinación rápida, pero posteriormente evidenció un crecimiento más lento. Esto refuerza la idea de que la rapidez en la germinación no necesariamente se traduce en una mayor velocidad de crecimiento micelial en etapas posteriores. Por lo tanto, resulta fundamental evaluar ambos parámetros - germinación y crecimiento - de forma independiente para comprender mejor el comportamiento de cada monocarionte y su potencial aplicación biotecnológica.

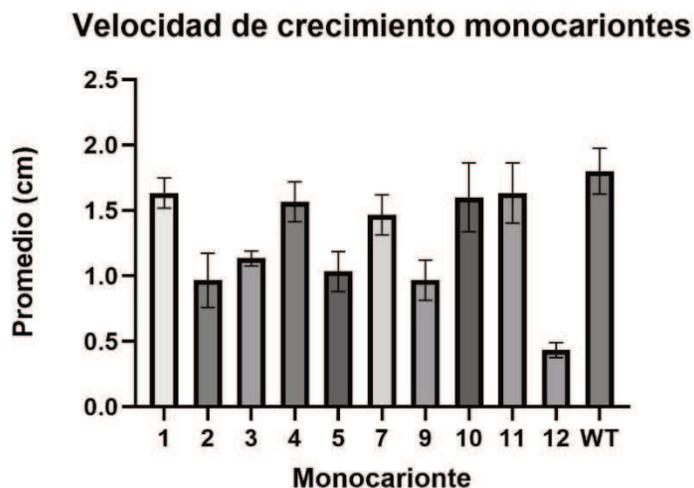


Figura 14.- Velocidad de crecimiento Monocariontes. Grafica velocidad de crecimiento de los distintos monocariontes de *Ganoderma sessile* y su control wild type en etapa exponencial.

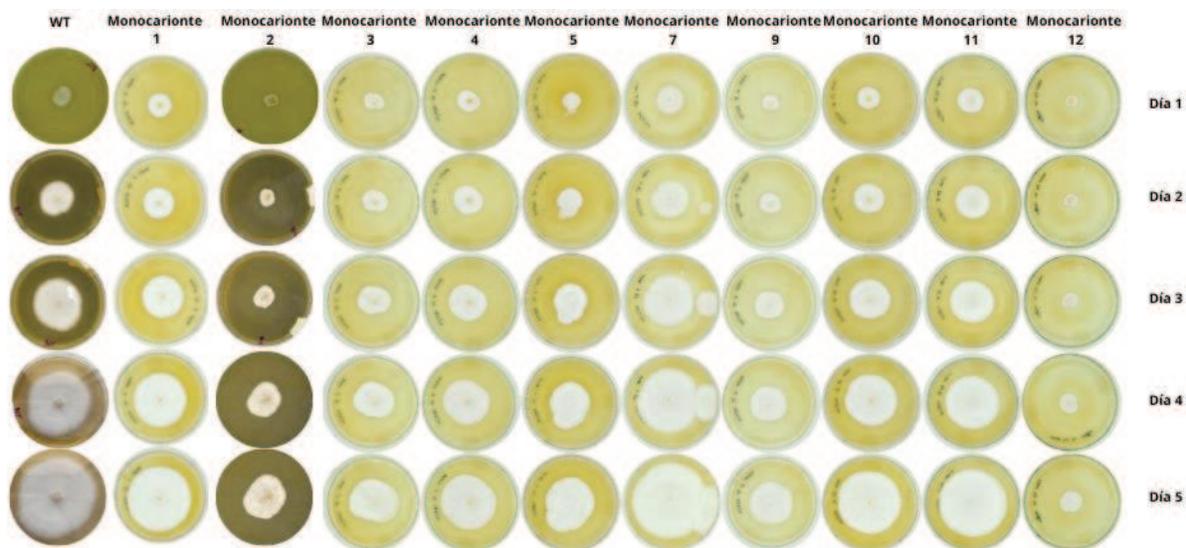


Figura 15.- Crecimiento de Monocariontes de *Ganoderma sessile* obtenidos de esporas.

4.3.2- Cruzamiento de monocariontes

Los cruzamientos controlados se realizaron enfrentando pares de monocariontes en cajas de Petri, colocando dos fragmentos de micelio (plugs) a una distancia de 1 cm entre sí. Tras un período de incubación, se evaluó la zona de contacto entre los micelios: si los monocariontes eran compatibles, se producía un micelio dicariótico en esa región. La formación del micelio

dicariótico se confirmó mediante observación microscópica de fíbulas (*clamp connections*), estructuras típicas de la dicarionización en la mayoría de los basidiomicetos (figura 16).

Para la observación de fíbulas, se tomó un fragmento de micelio previamente repicado desde el área de contacto, el cual fue teñido con azul de lactofenol. Posteriormente, se preparó un montaje entre porta y cubreobjetos, y se examinó al microscopio óptico con aumento de 40x. La presencia de fíbulas indicó un cruzamiento compatible, mientras que su ausencia sugirió incompatibilidad entre los monocariontes enfrentados.

La compatibilidad en los basidiomicetos está determinada por un sistema de apareamiento tetrapolar, en el cual deben diferir ambos loci de compatibilidad (designados como A y B) entre los dos monocariontes involucrados. Es decir, solo cuando los monocariontes poseen alelos distintos en ambos loci se establece la compatibilidad sexual. Cada locus tiene dos alelos diferentes por cepa, por lo que, tras la meiosis, se generan cuatro combinaciones genéticas posibles en la descendencia. Este sistema representa una estrategia evolutiva eficiente para maximizar la variabilidad genética en la población, ya que restringe los cruzamientos a combinaciones verdaderamente distintas.

En este ensayo se evaluaron 28 combinaciones posibles de apareamientos, de las cuales solo cuatro resultaron compatibles. El monocarionte 7 se destacó por ser el más compatible, ya que formó micelio dicariótico con los monocariontes 1, 4, 5 y 11, lo que sugiere que sus alelos A y B difieren de los presentes en estos otros aislados. Por otro lado, los monocariontes 2, 10 y 12 no mostraron compatibilidad con ninguno de los evaluados, lo que indica que comparten al menos un alelo en común en uno de los dos loci con todos los demás monocariontes, impidiendo así la formación de micelio dicariótico.

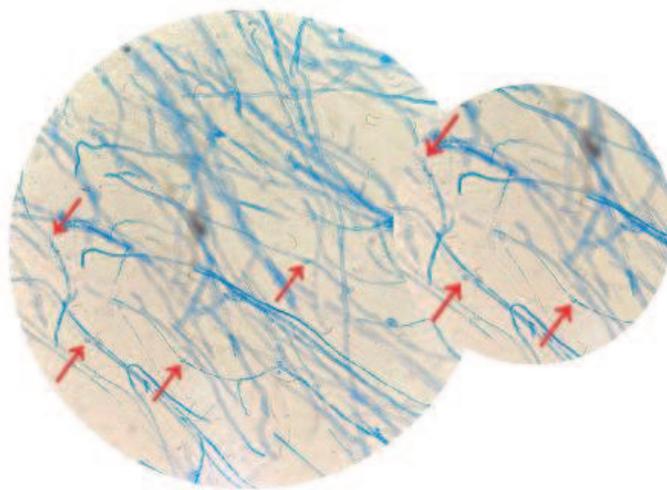


Figura 16.- Visualización de fíbulas. Presencia de fíbulas, indicando dicarionización en *Ganoderma sessile* mediante tinción con azul de lactofenol en microscopio 40x.

Tabla 7. Cruzamiento de monocariontes, compatibilidad*

Monocarionte	1	2	4	5	7	10	11	12
1	No	No	No	No	Si	No	No	No
2	No							
4	No	No	No	No	Si	No	No	No
5	No	No	No	No	Si	No	No	No
7	Si	No	Si	Si	No	No	Si	No
10	No							
11	No	No	No	No	Si	No	No	No
12	No							

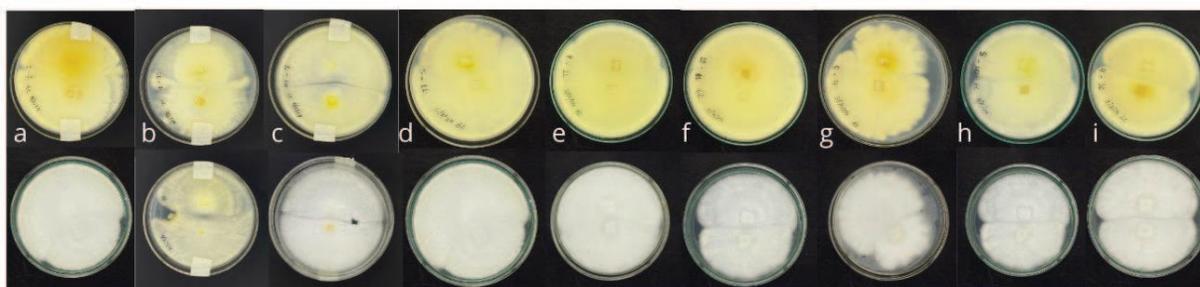


Figura 17.- Búsqueda de compatibilidad en Monocariontes. Cruzamiento de monocariontes *G. sessile*, placas de Petri en medio MEA. a) monocarionte 1-7 anverso-reverso; b) monocarionte 11-7 anverso-reverso; c) monocarionte 1-10 anverso-reverso; d) monocarionte 5-11 anverso-reverso; e) monocarionte 4-11 anverso-reverso; f) monocarionte 10-11 anverso-reverso; g) monocarionte 5-4 anverso-reverso; h) monocarionte 5-10 anverso-reverso; i) monocarionte 4-10 anverso-reverso.

4.4- Obtención de Protoplastos

La obtención de protoplastos es un procedimiento que difícilmente puede estandarizarse, en parte debido al conocimiento limitado sobre las enzimas hidrolasas implicadas en la degradación de la pared celular. Además, los protoplastos son altamente sensibles a la presión osmótica, por lo que es fundamental mantener condiciones osmóticamente estables durante el proceso enzimático. Para evitar la ruptura celular, es necesario incluir agentes estabilizadores - como sorbitol, manitol, cloruro de sodio o cloruro de potasio - en todos los tampones utilizados [10].

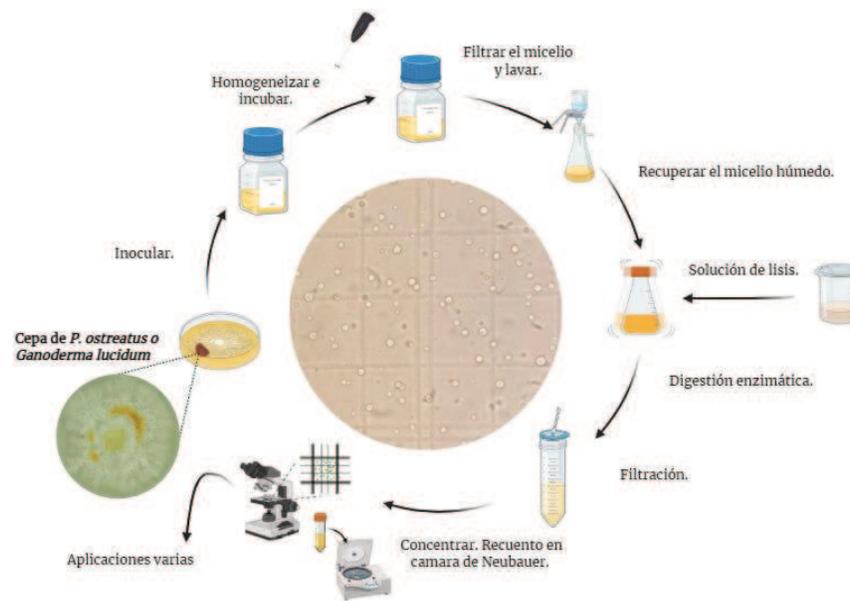


Figura 18.- Esquemización de la obtención de protoplastos fúngicos. Esquema gráfico para el desarrollo de protoplastos *Ganoderma sessile* y *Pleurotus ostreatus* desde el desarrollo de la cepa hasta el conteo en cámara de Neubauer.

4.4.1- Protocolo obtención de protoplastos *Pleurotus ostreatus*

El cultivo de la cepa de *Pleurotus* se llevó a cabo en medio YPD bajo condiciones controladas de agitación y temperatura (160 rpm, 28°C) durante un período de 96 hs. Se observó que el micelio crecía en su forma característica de pellets fúngicos (figura 19), estructuras esféricas formadas por la agregación de hifas. Dado que este tipo de organización celular podría dificultar el acceso de las enzimas líticas a las paredes celulares, se decidió someter el cultivo a una disrupción mecánica utilizando un homogeneizador eléctrico. Este procedimiento tiene como objetivo aumentar el número de zonas de crecimiento activo (extremos de las hifas/tips). Tras la homogeneización, el cultivo fue incubado por 24 hs más. Una vez finalizado este período, el micelio fue separado del medio de cultivo y lavado con agua estéril mediante filtración, en condiciones asépticas, con un *cell strainer* de 40 μm estéril. En el paso siguiente se evaluó la eficiencia de la digestión enzimática mediante la variación de diferentes parámetros, incluyendo la cantidad de micelio (en masa húmeda), tipo y concentración de enzima, el tiempo de incubación, el pH y el tipo y concentración de osmoprotector.

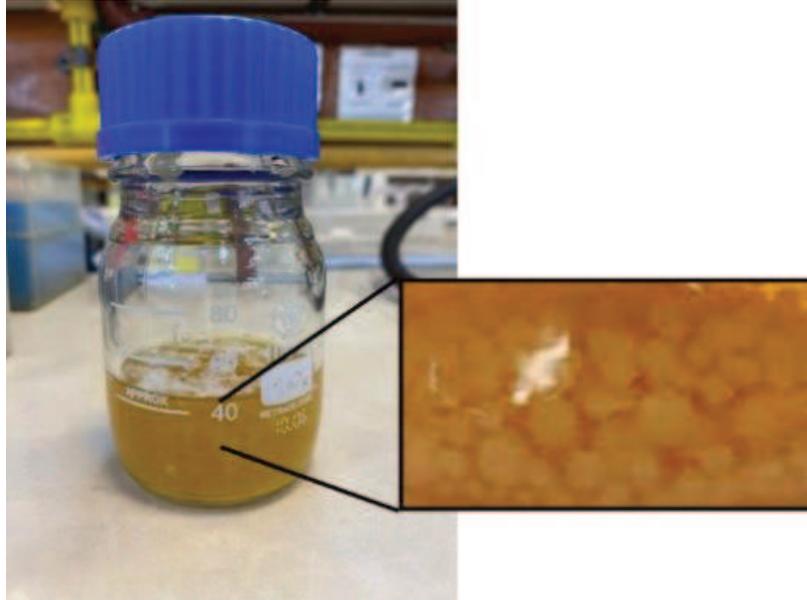


Figura 19.- Crecimiento de micelio. Micelio *P. ostreatus* crecido en medio YPD en condiciones de agitación (160 rpm a 28°C) con formación de pellets fúngicos.

En primer lugar, se evaluó la eficacia de un preparado enzimático derivado de *Trichoderma harzianum* conocido comercialmente como Glucanex (Sigma) y ampliamente utilizado para la obtención de protoplastos en distintas especies fúngicas, tanto en hongos filamentosos como en levaduras. Por su uso frecuente en la bibliografía especializada, se decidió realizar una prueba en las condiciones más habituales. En este ensayo, se empleó una concentración de enzima del 2%, disuelta en un buffer pH 5.8, compuesto por KCl 1,1 M / ácido cítrico 0,1 M, esterilizado por filtración. La digestión se llevó a cabo en microtubos de 1,5 ml, donde se incubaron 100 mg de micelio en 1 ml de la solución enzimática, a 28 °C y 160 rpm. Durante un seguimiento de 3 horas de la reacción se observó que la producción de protoplastos era escasa y no alcanzó el umbral mínimo necesario para un recuento confiable mediante cámara de Neubauer.

Si bien un aumento en la concentración de Glucanex podría mejorar el rendimiento, ello implicaría un mayor consumo del reactivo, lo cual presenta una limitación práctica debido a su elevado costo. Por este motivo, se optó evaluar en un ensayo posterior una preparación enzimática alternativa más económica (VinoTaste). En el mismo se aumentó la concentración de Glucanex al 3% p/v en buffer KCl 1,1 M / ácido cítrico 0,1 M y se evaluó VinoTaste a una concentración del 10% p/v (1 g en 10 ml de agua destilada). Se ensayaron dos condiciones experimentales: en primer lugar, 100 mg de micelio fueron incubados con 1000 µl de VinoTaste y en la segunda condición, se evaluó el uso de 100 mg de micelio con 1000 µl de Glucanex, conservando las

mismas condiciones de temperatura, agitación y tiempo de lisis que en el primer ensayo. A pesar de haberse utilizado una concentración enzimática de Glucanex superior a la empleada en el ensayo previo, no se observó un incremento significativo en la cantidad de protoplastos liberados. Por su parte, el tratamiento con VinoTaste tampoco permitió la obtención de protoplastos, lo cual podría atribuirse, al menos en parte, a la ausencia de un agente osmoprotector en la solución empleada. Asimismo, no puede descartarse que la cantidad de biomasa utilizada (100 mg) haya sido insuficiente para evidenciar resultados cuantificables, especialmente en condiciones en las que la eficiencia del tratamiento enzimático es limitada.

En base a esto, se decidió introducir modificaciones tanto en la formulación del buffer de reacción como en el formato experimental, con el objetivo de mejorar la eficiencia del proceso de lisis. En particular, se reemplazó el tampón KCl/ácido cítrico por buffer CAM, y se incrementó la biomasa utilizada. Estas modificaciones condujeron a resultados positivos en la generación de protoplastos. El ensayo se llevó a cabo en un Erlenmeyer estéril de 250 ml, utilizando 10 ml de una solución enzimática VinoTaste al 10 % p/v disuelta en buffer CAM a pH 5,8 con 1 gr de micelio. La digestión enzimática se llevó a cabo durante 1:30 hs, 160 rpm a 28° C, logrando obtener una concentración de protoplastos de aproximadamente 2×10^6 células/ml. Si bien este número continuaba siendo bajo en comparación con los valores requeridos para lograr una transformación eficiente ($10^7 - 10^8$), el objetivo de esta etapa fue poner en evidencia una condición inicial sobre la cual seguir trabajando.

En etapas posteriores, se llevaron a cabo ensayos orientados a optimizar la obtención de los protoplastos mediante la variación tanto de la concentración de la enzima lítica como del tiempo de contacto. La masa de micelio (1g) y el volumen de la solución enzimática (10 ml) se dejaron constantes. Se ensayaron tres concentraciones de enzima: 10 %, 6 % y 3 % p/v (figura 20) y se contaron a dos tiempos de incubación: 1:30 hs y 3:00 hs. Cada condición se realizó por triplicado. A la 1:30 hs la concentración enzimática del 10 % permitió obtener un promedio de $2,2 \times 10^7$ células/ml. Las concentraciones de 6 % y 3 % a este tiempo arrojaron resultados menores, en el rango de $1,50 \times 10^7$ a $1,83 \times 10^7$ células/ml. Luego de 3 hs de incubación, la condición con 10 % de enzima mostró un incremento significativo, alcanzando $1,1 \times 10^8$ células/ml. En cambio, con el 6 % de enzima se obtuvieron valores intermedios, cercanos a $4,00 \times 10^7$ células/ml, mientras que con el 3 % de enzima los resultados se mantuvieron más bajos.

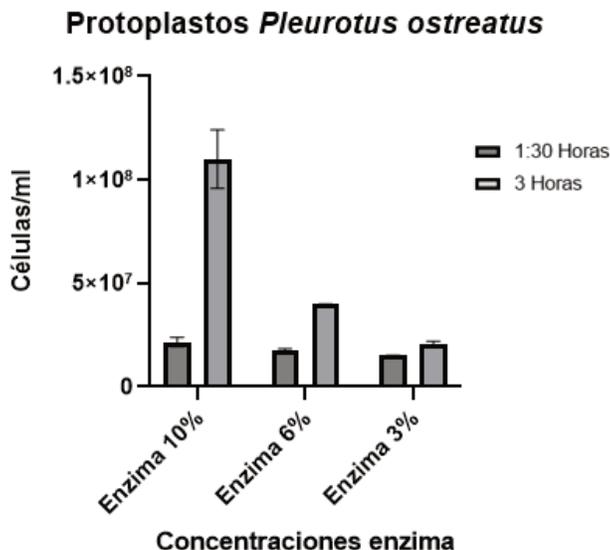


Figura 20.- Protoplastos *P. ostreatus*. Ensayo para la obtención de protoplastos variando las concentraciones enzimáticas y tiempos de lisis.

Una vez definida una condición base capaz de generar protoplastos en concentraciones cuantificables y transformables, se avanzó en la evaluación de variables adicionales que pudieran influir en la eficiencia del proceso. El objetivo fue analizar si la sustitución del manitol por otro compuesto osmoprotector (sorbitol) podía mejorar la eficiencia. Ambos compuestos fueron incorporados en un buffer formado por ácido cítrico y citrato de sodio a pH 5,8. Es decir, se comparó el buffer CAM con otro buffer en las mismas condiciones en donde se reemplazó el manitol por sorbitol (buffer CAS) en una concentración de 0,6 M. La enzima utilizada fue VinoTaste empleada al 10 % p/v. Se realizaron incubaciones durante 3 hs, cuantificándose los protoplastos obtenidos en cada condición (figura 21).

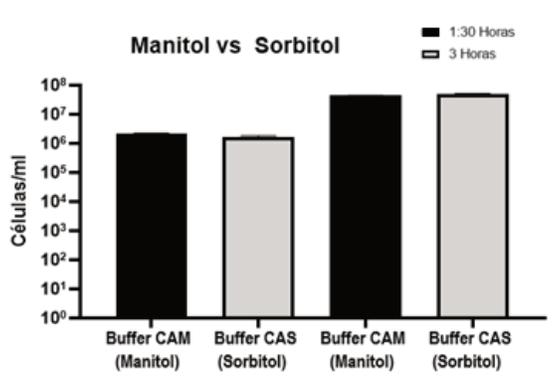


Figura 21.- Protectores osmóticos. Variación de Manitol vs Sorbitol en la obtención y mantenimiento de las células.

A partir de los datos obtenidos se observó que, tanto con sorbitol como con manitol, a las 3 horas se alcanza una producción similar de protoplastos, en el orden de 10^7 células/ml. Sin embargo, luego de la centrifugación y el lavado con los buffers CAM y CAS (para eliminar la solución enzimática), se pudo ver que los protoplastos incubados en sorbitol tienden a lisarse más rápidamente, mientras que en manitol se mantienen íntegros durante el tiempo observado (figura 22).

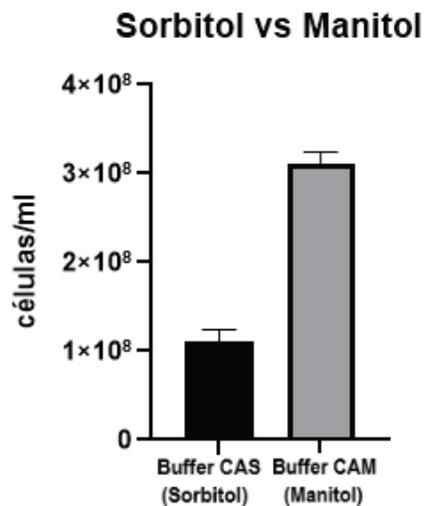


Figura 22.- Estabilidad post lavado. Estudio posterior a la centrifugación, lavado y concentración de los protoplastos.

Tras múltiples ensayos, se determinó que la mejor condición para la obtención de protoplastos fue de 3 hs de contacto de 1 g de micelio con 10 ml de enzima VinoTaste Pro al 10% p/v en buffer CAM (pH 5,8). Todas las pruebas se realizaron bajo condiciones controladas de agitación y temperatura (160 rpm, 28°C), para asegurar la homogeneidad y reproducibilidad en la exposición del micelio a la acción enzimática. Los protoplastos obtenidos fueron monitoreados en el tiempo mediante observación en cámara de Neubauer, lo que permitió evaluar su morfología y el rendimiento de cada experimento.

Para continuar con la siguiente etapa, fue necesario implementar un proceso de filtración para separar los protoplastos de los fragmentos de hifas no digeridas. Inicialmente, se utilizó un *cell strainer* estéril de 40 μ m, sin embargo, se observó que una cantidad significativa de hifas remanentes atravesaba el filtro. Ante esta limitación, se decidió optimizar el método de separación implementando una columna de filtrado en profundidad, la cual permitió mejorar la eficiencia del proceso. Para su construcción, se utilizó una jeringa de 60 ml como soporte, en la cual se colocaron 2 cm de lana de vidrio y se esterilizó por autoclave, garantizando así

condiciones adecuadas de esterilidad (figura 23). Como se evidencia en la figura 24b la utilización de este implemento mejoró significativamente la pureza de los protoplastos obtenidos.

La siguiente tarea fue la concentración de las células liberadas. Se llevó a cabo un proceso de centrifugación evaluando diversas velocidades y tiempos para optimizar la recuperación celular sin afectar su viabilidad. La condición seleccionada fue 1000 x g durante 10 minutos, establecida después de múltiples pruebas para lograr un equilibrio entre la formación de un pellet consistente, fácil de resuspender, y minimizar la pérdida de protoplastos en el sobrenadante. Para evaluar la eficiencia también se realizaron observaciones microscópicas, ya que, en algunas condiciones ensayadas, a simple vista, la muestra parecía correctamente disgregada. Sin embargo, a nivel microscópico se observó que los protoplastos se encontraban en forma de agregados, lo cual podría interferir con los procedimientos posteriores.

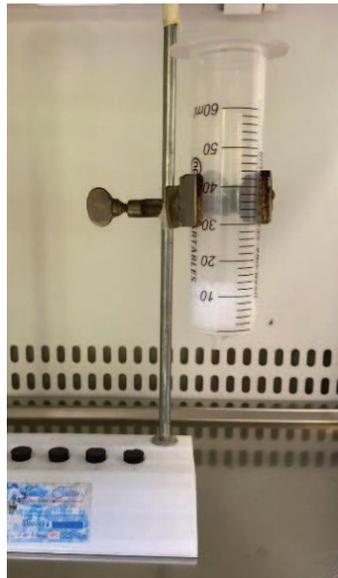


Figura 23.- Columna de filtración. Columna de filtración de lana de vidrio, en condiciones de esterilidad.

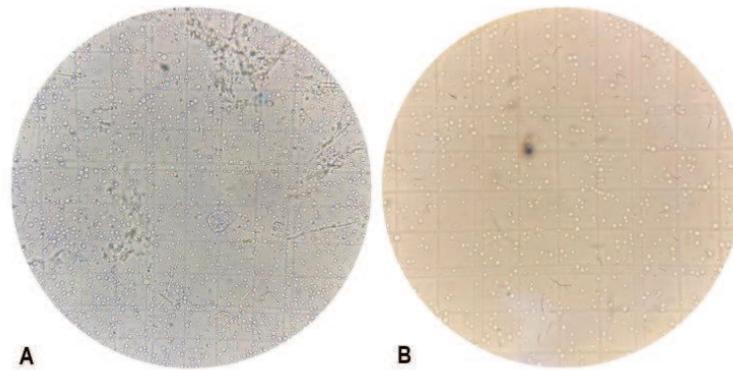


Figura 24.- Protoplastos al microscopio. A) Protoplastos en cámara de Neubauer al microscopio 40X sin filtrar, en donde se observa menor cantidad y la presencia de hifas remanentes, mientras que en la imagen B se realizó el proceso de filtración por columna con lana de vidrio y posterior centrifugación 10 min a 1000 xg.

Finalmente se ensayó un cambio de buffer debido a que en la mayoría de la bibliografía disponible las transformaciones se llevan a cabo en un rango de pH cercano a la neutralidad. Para ello, se utilizó el buffer STC, compuesto por 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM CaCl₂ y sorbitol como agente osmótico en dos concentraciones diferentes: 0,6 M y 1,2 M. Los protoplastos se obtuvieron según los ensayos anteriores y fueron recuperados por centrifugación a 1000 xg durante 10 min. El pellet resultante se resuspendió en 1 ml de cada buffer STC. Además, se incluyó una condición control en la que los protoplastos fueron mantenidos en el buffer CAM utilizado previamente durante la reacción enzimática. Al microscopio se observó que, en STC 0,6 M y 1,2 M, los protoplastos mostraron signos de ruptura y/o aglomeración, acompañados por la presencia de detritos celulares, lo cual indica que las condiciones del nuevo buffer no resultaron adecuadas para su estabilidad (figura 25).

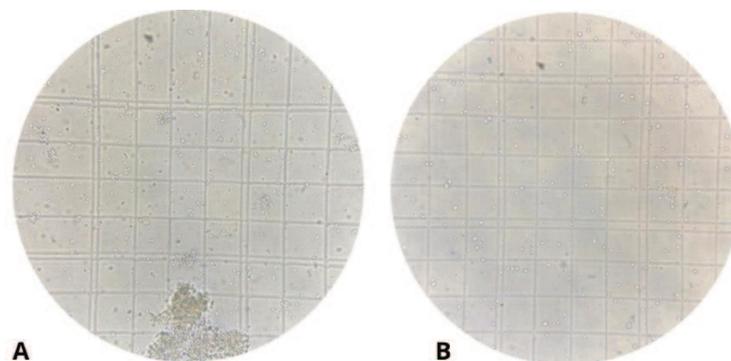


Figura 25.- A) Buffer STC. Presencia de detritos celulares. B) Buffer CAM.

4.4.2- Protocolo obtención de protoplastos *Ganoderma sessile*

Los procedimientos necesarios para obtener protoplastos de *G. sessile* son similares a los utilizados para *P. ostreatus*. Sin embargo, al tratar de aplicar el protocolo optimizado, se observó que, incluso en las condiciones más favorables, los rendimientos en la obtención de protoplastos fueron menores, alcanzando valores del orden de 10^6 células/ml. El resultado indicó que la opción más adecuada era incrementar la cantidad de micelio, por lo que se utilizó 2 g de este por cada 10 ml de enzima (VinoTaste) al 10%. Esta relación se mantuvo constante, escalándola proporcionalmente cuando fue necesario obtener un mayor número de protoplastos. Debido al aumento en las cantidades de micelio y enzima utilizadas, fue necesario realizar ajustes adicionales en otras etapas operacionales del proceso. Uno de los cambios más significativos se presentó en la etapa de filtración y lavado inicial del micelio, donde el mayor volumen a procesar incrementó los tiempos de filtrado. Para optimizar este paso, se reemplazó el *cell strainer* por un tamizador autoclavable de polipropileno, el cual proporcionó una mayor área de filtración, permitiendo reducir el tiempo necesario para separar el micelio del medio de cultivo. La esterilización por filtración de la enzima, inicialmente realizada con filtros de jeringa Minisart de $0,2 \mu\text{m}$, presentó complicaciones debido al gran volumen a filtrar, ya que los excipientes presentes en la enzima obstruían el filtro. Por ello, se decidió implementar un sistema de filtración al vacío utilizando una carcasa de 250 ml con membrana PES de $0,22 \mu\text{m}$, lo que facilitó el procesamiento de mayores volúmenes. No obstante, pese a esta modificación, los tiempos de filtrado continuaron siendo elevados, alcanzando aproximadamente las 2 horas. Para abordar esta limitación, se realizó un ensayo comparativo donde se evaluó la actividad de la enzima preparada y filtrada el día previo, almacenada a 4°C , frente a la enzima filtrada y utilizada en el momento. En ambos casos, la concentración final de protoplastos obtenida fue del orden de 10^7 células/ml, lo que indicó que el filtrado preliminar y conservación a 4°C no afectaba la actividad enzimática, permitiendo así una mejor gestión de los tiempos de ensayo.

De igual manera que se llevaron a cabo pruebas con *P. ostreatus*, también se realizaron ensayos con *Ganoderma sessile*, variando los buffers responsables del mantenimiento del pH, evaluando un nuevo buffer fosfato en comparación con el buffer CAM utilizado como parámetro de control. En ambos experimentos se utilizaron 10 ml de enzima VinoTaste al 10 % p/v. En una de las condiciones se empleó buffer CAM, mientras que en la otra se utilizó manitol 0,6 M disuelto en un sistema tampón fosfato (Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 1 M) ajustado al mismo pH 5,8. Los dos ensayos permitieron la obtención de protoplastos; no obstante, se observó que en el buffer fosfato los

protoplastos se fueron lisando progresivamente con el transcurso del tiempo, mientras que en el buffer citrato se mantuvieron estables.

Finalmente, se realizaron ensayos comparativos entre el monocarionte 7 y la cepa salvaje. En estos estudios, se determinó la concentración de protoplastos a las 3 horas y a las 16 horas de contacto con la enzima, obteniendo una producción aproximada de 3×10^7 células/ml y 6×10^7 células/ml, respectivamente. Estos valores fueron consistentes tanto para la cepa salvaje como para el monocarionte 7.

4.4.2.1- Eficiencia regenerativa de protoplastos de *G. sessile*

La regeneración de protoplastos comprende una serie de etapas, incluyendo la síntesis de la pared celular y la formación de nuevas células, las cuales dependen de la activación de rutas metabólicas específicas y la disponibilidad de factores de crecimiento. La regeneración se pone en evidencia cuando se observa la formación de colonias en un medio sólido adecuado.

Inicialmente, el plaqueo se realizó sobre placas con el medio de cultivo previamente solidificado, distribuyendo los protoplastos sobre la superficie con la ayuda de perlas de vidrio estériles. Posteriormente, se desarrolló una alternativa bifásica de plaqueo utilizando MEA con agar al 0,7 %, mezclando 3 ml de este medio con 100 μ l de la suspensión de protoplastos. El agar es mantenido a 60 °C para evitar su solidificación, luego inoculado y finalmente distribuido sobre la placa con el medio base previamente solidificado y atemperado. Esta técnica permite una distribución uniforme del inóculo directamente sobre la superficie de la placa sin necesidad de usar una espátula de *Drigalsky* o perlas de vidrio. Esta estrategia busca minimizar el riesgo de lisis celular asociada al estrés mecánico, favoreciendo una dispersión homogénea de los protoplastos.

Cuando los protoplastos se cultivan en medio MEA, no generan colonias (figura 26a), mientras que en MEA-Manitol las colonias comienzan a ser visibles después de 5 días de incubación (figura 26b). Este resultado sugiere que, en ausencia de un osmoprotector, los protoplastos experimentan un shock osmótico, lo cual provoca la lisis celular debido a la diferencia de presión entre el interior y el exterior de la célula. Además, la ausencia de estructuras fúngicas residuales (hifas sin digerir) indica que el filtrado fue eficiente, eliminando artefactos que podrían interferir en la evaluación de los resultados.

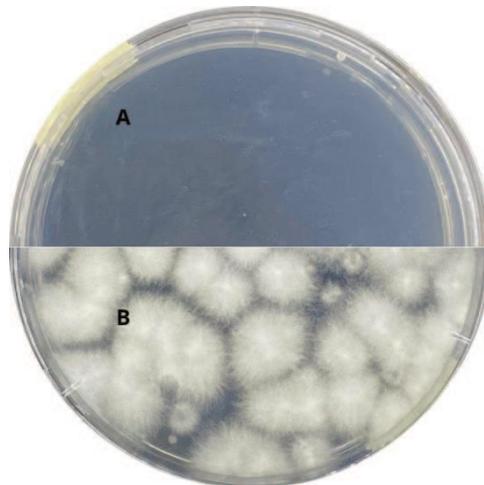


Figura 26.- Protoplastos en MEA vs MEA-Manitol. A) Protoplastos de *G. sessile* medio MEA. B) Protoplastos de *G. sessile* en medio MEA-Manitol.

Con el propósito de determinar la eficiencia en la regeneración de la pared celular, se sembraron 100 μ l de diluciones seriadas de la suspensión inicial. En la figura 27 se presenta la siembra de dos de estas diluciones como ejemplo. Al contar las colonias formadas, se estableció que la eficiencia de regeneración de los protoplastos de *G. sessile* está entre el 1% y el 5%.

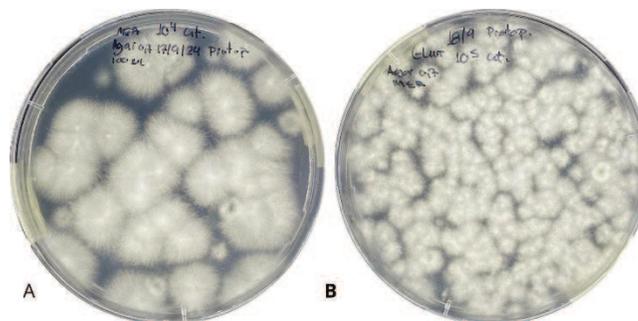


Figura 27.- Condiciones de plaqueo. A) 100 μ l de protoplastos 10^4 cel/ml *G. sessile* en buffer CAM, sembrados en medio MEA-Manitol. B) 100 μ l de protoplastos 10^5 cel/ml *G. sessile* en buffer CAM, sembrados en medio MEA-Manitol.

4.5- Ensayo de sensibilidad antifúngica

Con el propósito de establecer una concentración adecuada del compuesto selector para los ensayos de transformación, se llevó a cabo la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a carboxina en protoplastos de *G. sessile*. Establecer la CIM es esencial para asegurar la identificación precisa de transformantes verdaderos y evitar resultados falsos

positivos. La carboxina utilizada fue obtenida del formulado comercial Vitavax, empleado en el control de hongos patógenos en semillas y cultivos. Vitavax contiene dos ingredientes activos: carboxina y captan. En estudios previos realizados en el laboratorio, estos componentes fueron separados mediante solubilidad diferencial en solventes orgánicos. La pureza de la carboxina obtenida, determinada por cromatografía gaseosa, superó el 95%.

La carboxina es un fungicida sistémico que actúa inhibiendo la succinato deshidrogenasa, una enzima clave en la cadena respiratoria mitocondrial de los hongos. Esta inhibición interfiere en la fosforilación oxidativa, proceso esencial para la producción de ATP, lo que conduce a la interrupción de la respiración celular y, en última instancia, a la muerte del hongo.

Para el ensayo la droga se disolvió en DMSO a una concentración de 10 mg/ml, y se hicieron diluciones seriadas en un rango de 100 µg/ml a 0,09 µg/ml, llevando a cabo también los controles de blanco, blanco + DMSO, como así también un control de esterilidad. Cada pocillo se inoculó con 10 µl de protoplastos de una suspensión de 10⁷ cel/ml (10⁵ células por pocillo). Como medio de crecimiento se utilizó MEA líquido + Manitol 0,6 M. Como se puede observar en la figura 28 la CIM se da en el pocillo B3 (0,39 µg/ml). Este dato se utilizó para definir la concentración de trabajo para los ensayos de transformación con el plásmido pOMRP4β que expresa una succinato deshidrogenasa mutante como factor de resistencia.

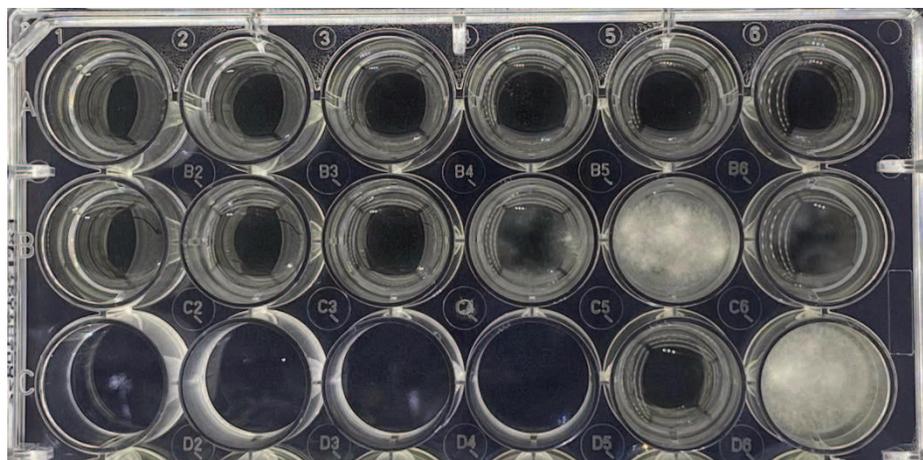


Figura 28.- Concentración inhibitoria mínima. CIM protoplastos *Ganoderma sessile*, comenzando desde el pocillo **A1** con una concentración de carboxina de 100 µg/ml, **A2** (50 µg/ml), **A3** (25 µg/ml), **A4** (12,5 µg/ml), **A5** (6,25 µg/ml), **A6** (3,125 µg/ml), **B1** (1,56 µg/ml), **B2** (0,78 µg/ml), **B3** (0,39 µg/ml), **B4** (0,19 µg/ml), mientras que para los pocillos **B5** se realizó un control de crecimiento, **B6** un control de blanco, en el pocillo **C6** se corroboró que el DMSO en el cual se encuentra disuelta la carboxina no interfiere en el crecimiento del micelio y por último en la posición **C5** se realizó un control de esterilidad confirmando que el crecimiento viene dado por el desarrollo y regeneración de los protoplastos inoculados.

4.6- Ensayos de transformación

4.6.1- Obtención de ADN Plasmídico

Para la amplificación de los vectores pOMRP2 y pOMRP4 β , se transformaron células de *E. coli* Top10 con 3 μ l de cada vector, de forma independiente. Posteriormente, se realizó una midipreparación de ADN plasmídico y se determinaron sus concentraciones mediante medición en NanoDrop y corrida electroforética en un gel de agarosa.

4.6.2- Transformación estable con PEG

Para llevar a cabo el ensayo de transformación se utilizó un protocolo que emplea PEG 4000 para promover la absorción de ADN exógeno. Para evaluar la técnica se utilizó el plásmido pOMRP4 β (resistencia a higromicina / carboxina) y se realizaron los controles habituales (negativo y de viabilidad). Los protoplastos transformados se plaquearon en medio MEA Manitol Agar Carboxina, salvo el control de viabilidad donde se omite el antifúngico.

En las distintas pruebas se mantuvo este esquema general:

- Prueba de interés: Reacciones con DNA a transformar (pOMRP4 β). Placa en medio MEA Manitol + carboxina
- Control Negativo: Sin DNA. Placa con medio MEA Manitol + carboxina
- Control de viabilidad: Sin DNA. Placa con medio MEA Manitol

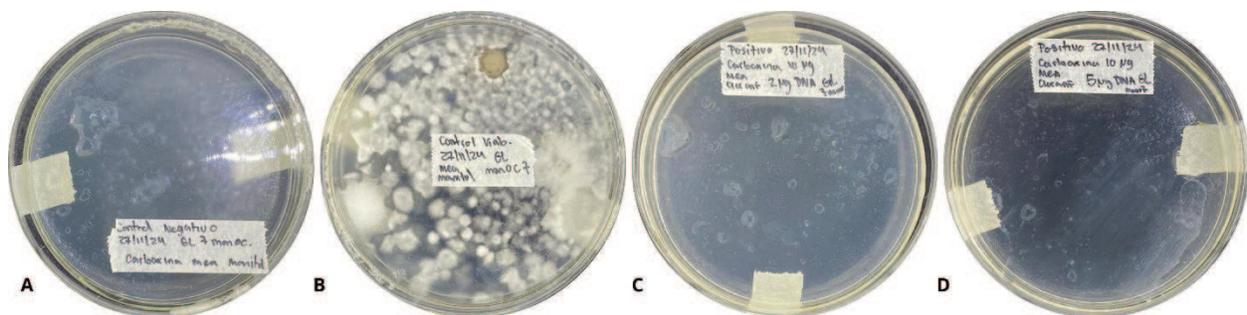


Figura 29.- Placas de transformación *G. sessile* vector pOMRP4 β con PEG 4000 30%. A) Control negativo (sin DNA + Carboxina). B) Control de viabilidad (sin DNA) C) Placa transformante (2 μ g DNA + Carboxina) D) Placa transformante (5 μ g DNA + Carboxina).

Los resultados obtenidos indicaron que no se logró recuperar transformantes resistentes a carboxina en ninguna de las placas (2 μ g DNA, 5 μ g DNA). Sin embargo, la viabilidad de los

protoplastos no se vio afectada por el procedimiento. Esto demuestra que el proceso de obtención y manipulación de protoplastos y la exposición al PEG 4000 no generó un daño letal ni afectó significativamente su capacidad de regeneración (figura 29b). La ausencia de transformantes podría deberse a múltiples factores, como una concentración subóptima de ADN plasmídico, características del plásmido inadecuadas para la especie utilizada o la presencia de compuestos tóxicos residuales (trazas de captan). Otra posibilidad es que la proteína de resistencia a carboxina no se haya expresado adecuadamente en los protoplastos por falta de tiempo.

En un segundo ensayo, se repitió el protocolo de transformación con PEG 4000, utilizando las mismas condiciones, pero introduciendo una modificación: los protoplastos, luego del proceso de transformación, fueron incubados durante 24 horas en 1 ml de medio MEA antes de ser plaqueados en medio selectivo con carboxina. Esta estrategia buscaba permitir la expresión del gen de resistencia antes de la exposición al agente de selección. A pesar de esta modificación, no se logró recuperar colonias transformantes, aunque se mantuvo la viabilidad celular en las condiciones de control.

4.6.3- Transformación transiente con PEG

Se utilizó el plásmido pOMRP2 que codifica para el gen reportero fuGFP bajo el control de un promotor endógeno de *Ganoderma*. Este plásmido no tiene marcador de selección, por lo que debe trabajarse de forma transiente y las células transformantes se observan por la presencia de fluorescencia al microscopio. La GFP emite luz verde cuando es excitada por una longitud de onda de 395 nm. Posterior a la transformación, las células fueron incubadas en MEA Manitol y entre las 48-72 hs se realizaron observaciones al microscopio 40x para comprobar si había fluorescencia. Se detectó la presencia de algunas células transformantes (figura 30), confirmando la incorporación del plásmido. Aunque la eficiencia de transformación observada fue muy baja y varios parámetros necesitan ser optimizados, este resultado confirma que es posible expresar en esta cepa de *G. sessile* una proteína heteróloga utilizando los elementos de control presentes en este plásmido.

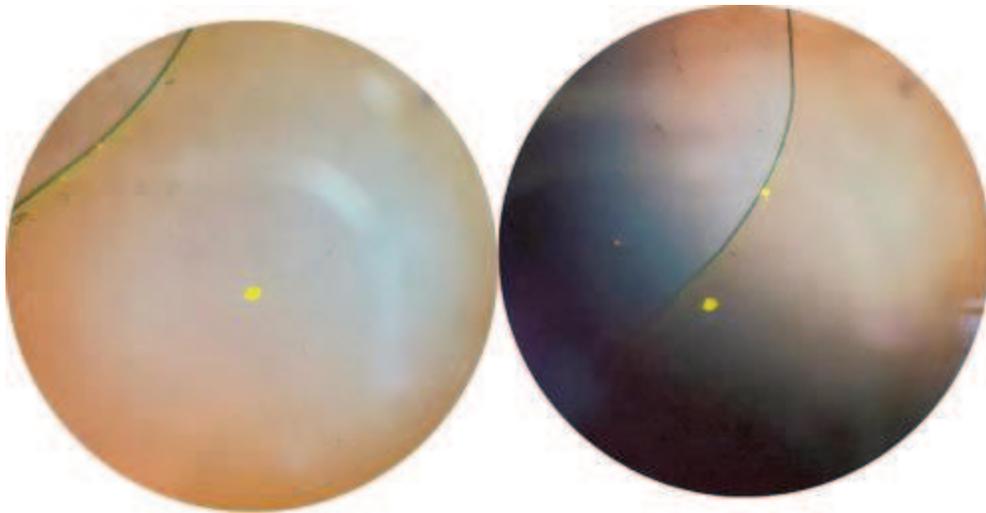


Figura 30.- Transformación *G. sessile* vector pOMRP2 con PEG 4000 30%. Protoplastos al microscopio de fluorescencia, expresando fuGFP luego de ser transformados.

4.6.4- Transformación por Electroporación

Se realizaron ensayos de transformación de protoplastos mediante electroporación. Los protoplastos fueron obtenidos según lo descrito previamente, utilizando la enzima VinoTaste al 10 % p/v en buffer CAM (pH 5,8), y luego fueron lavados y concentrados en el mismo buffer. Se llevaron a cabo transformaciones utilizando 5 μ g y 2 μ g de ADN plasmídico, incluyéndose los controles correspondientes. En cada ensayo se utilizaron 10^7 protoplastos.

Los parámetros de electroporación empleados fueron: una intensidad de campo de 10 kV/cm, una capacitancia de 25 μ F y una resistencia de 400 Ω , utilizando cubetas de 2 mm.

Se incubaron a 28 °C las siguientes condiciones en medio MEA suplementado con manitol:

- Ensayo de transformación: protoplastos con ADN plasmídico (pOMRP4 β) en medio MEA-Manitol + carboxina.
- Control negativo: protoplastos sin ADN en medio MEA-Manitol + carboxina.
- Control de viabilidad: protoplastos sin ADN en medio MEA-Manitol.

En ninguno de los casos se observaron colonias, lo que sugiere que las condiciones de electroporación podrían haber sido excesivamente severas. Los parámetros utilizados fueron tomados de un artículo en el que no se especifica claramente si se trabajó con protoplastos [24]. Los autores mencionan haber electroporado "fragmentos de micelio tratados con enzimas líticas", lo

cual sugiere que estas estructuras podrían ser más robustas que los protoplastos empleados en nuestros ensayos. Por lo tanto, sería necesario optimizar las condiciones de electroporación mediante nuevas pruebas con parámetros ajustados.

05

CONCLUSIONES

Conclusiones

El presente trabajo abordó de manera integral distintas etapas clave en el estudio de hongos basidiomicetos de interés biotecnológico, combinando herramientas clásicas y moleculares para su identificación, caracterización y manipulación. A través del aislamiento de monocariontes, el análisis de compatibilidad sexual, la obtención de protoplastos y los ensayos preliminares de transformación genética, se generó una plataforma experimental incipiente que permite explorar y aprovechar el potencial genético y metabólico de estas especies. A continuación, se presentan las principales conclusiones derivadas del desarrollo de este estudio.

1. Validación taxonómica mediante análisis molecular.

La identificación molecular de las cepas a través de la región ITS permitió confirmar o corregir la asignación taxonómica inicial realizada por criterios morfológicos. Este enfoque resultó particularmente valioso en casos donde la morfología puede inducir a errores, como ocurrió con una cepa inicialmente identificada como *Trametes versicolor*, pero que resultó corresponder a *Grifola frondosa*. Asimismo, el caso de *Ganoderma sessile* mostró la complejidad taxonómica del género y la utilidad de la secuenciación para aportar claridad en contextos de controversia nomenclatural. Estos resultados refuerzan la necesidad de utilizar herramientas moleculares como parte del proceso rutinario de identificación en estudios micológicos.

2. Diversidad fenotípica en monocariontes derivados de esporas

Se logró con éxito la obtención de cultivos monospóricos viables a partir de esporas basidiales, lo que permitió evidenciar una considerable diversidad fenotípica entre los distintos monocariontes. Las diferencias observadas en la velocidad de crecimiento revelan el potencial de esta estrategia para seleccionar cepas con características particulares, útiles tanto en investigación básica como en aplicaciones industriales. Este enfoque puede ser clave para optimizar procesos productivos que requieran crecimiento micelial rápido o tipos específicos de micelio, por ejemplo, en la producción de biocompuestos o metabolitos secundarios.

3. Cruzamientos controlados y sistema de apareamiento tetrapolar

Los ensayos de compatibilidad sexual entre monocariontes, evaluados mediante observación microscópica de fíbulas, permitieron confirmar la presencia de un sistema de apareamiento probablemente tetrapolar en la especie *Ganoderma sessile*. Solo 4 de las 28 combinaciones ensayadas resultaron compatibles, lo que se aproxima con lo esperado en este tipo de sistemas genéticos. La capacidad de realizar cruzamientos dirigidos y la identificación de monocariontes compatibles representan herramientas valiosas para futuros programas de mejora genética, ya que permiten combinar características deseables presentes en diferentes líneas parentales.

4. Obtención y manejo de protoplastos fúngicos

Se desarrolló un protocolo eficiente para la obtención de protoplastos viables a partir de micelio joven, utilizando una enzima comercial de grado técnico en condiciones controladas de presión osmótica. La recuperación de protoplastos regenerativos en especies como *Ganoderma sessile* y *Pleurotus ostreatus* constituye un avance importante, ya que permite ampliar las posibilidades experimentales en genética fúngica, particularmente en técnicas como la transformación genética o la fusión somática. La sensibilidad de los protoplastos a factores físicos y químicos destaca la importancia de continuar optimizando este protocolo para distintas cepas y condiciones.

5. Exploración de métodos de transformación genética

Se realizaron ensayos preliminares de transformación utilizando dos enfoques: PEG y electroporación. Si bien no se obtuvieron colonias transformadas estables bajo las condiciones evaluadas, estos ensayos permitieron identificar posibles limitaciones en los parámetros aplicados, especialmente en lo referido a la intensidad del campo eléctrico y la viabilidad del protoplasto tras la electroporación. Los resultados señalan la necesidad de adaptar cuidadosamente las condiciones experimentales a las características biológicas de cada especie y cepa. A pesar de las dificultades, estos ensayos constituyen un primer paso hacia la implementación de herramientas de edición genética en estos hongos.

6. Relevancia y potencial del sistema experimental

En conjunto, los procedimientos desarrollados y ensayados en esta tesina - identificación molecular, aislamiento de monocariontes, análisis de compatibilidad, obtención de protoplastos y ensayos de transformación - conforman una plataforma experimental robusta y versátil. Este sistema permite abordar de manera integrada distintos aspectos de la biología fúngica, con aplicaciones tanto en investigación como en biotecnología. A futuro, esta plataforma podrá utilizarse para generar híbridos, estudiar funciones génicas específicas, o desarrollar cepas mejoradas con fines industriales, consolidando así el valor de estos hongos como recursos biotecnológicos.

06

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- [1] Gómez Daza, F. (2015). Características generales de los hongos e infecciones sistémicas y oportunistas de las micosis tropicales. *Micología*, 5, 1–20. http://aula.campuspanamericana.com/_Cursos/Curso01417/Temario/Experto_Med_Tropical/M5T1-Texto.pdf
- [2] Sadler, M. (2003). Nutritional properties of edible fungi. *Nutrition Bulletin*, 28(3), 305–308. <https://doi.org/10.1046/j.1467-3010.2003.00354.x>
- [3] Ardón López, C. E. (2007). La producción de los hongos comestibles. [Tesis de maestría, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Humanidades].
- [4] Kuè, U., & Liu, Y. (n.d.). *MINI-REVIEW Fruiting body production in basidiomycetes*. <http://apps.fao.org/>
- [5] Schuster, M., & Kahmann, R. (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. In *Fungal Genetics and Biology* (Vol. 130, pp. 43–53). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.04.016>
- [6] Shi, T. Q., Liu, G. N., Ji, R. Y., Shi, K., Song, P., Ren, L. J., Huang, H., & Ji, X. J. (2017). CRISPR/Cas9-based genome editing of the filamentous fungi: the state of the art. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 101, Issue 20, pp. 7435–7443). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8497-9>
- [7] Kothe, E. (2001). Mating-type genes for basidiomycete strain improvement in mushroom farming. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 56, Issues 5–6, pp. 602–612). <https://doi.org/10.1007/s002530100763>
- [8] Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101–2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
- [9] Taxateca. (s.f.). *Clase: Agaricomycetes*. Taxateca. Recuperado el 5/3/2025, de <https://taxateca.com/claseagaricomycetes.html>
- [10] Li, D., Tang, Y., Lin, J., & Cai, W. (2017). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0785-7>

- [11] Krizsán, K., Almási, É., Merényi, Z., Sahu, N., Virágh, M., Kószó, T., Mondo, S., Kiss, B., Bálint, B., Kües, U., Barry, K., Cseklye, J., Hegedüs, B., Henrissat, B., Johnson, J., Lipzen, A., Ohm, R. A., Nagy, I., Pangilinan, J., ... Nagy, L. G. (2019). Transcriptomic atlas of mushroom development reveals conserved genes behind complex multicellularity in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(15), 7409–7418. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817822116>
- [12] Casselton, L. A., & Olesnicky, N. S. (1998). Genética molecular del reconocimiento del apareamiento en hongos basidiomicetos. *Microbiología Molecular y Biología de Revisiones*, 62(1), 55-70. <https://doi.org/10.1128/mr.62.1.55-70.1998>
- [13] Rodriguez-Iglesias, A., & Schmoll, M. (2015). *Protoplast Transformation for Genome Manipulation in Fungi* (pp. 21–40). https://doi.org/10.1007/978-3-319-10142-2_2
- [14] Yarden, O., Borkovich, A., Ebbole, D. J., & Osherov, N. (2017). *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi Edited by K The Cell Wall of Filamentous Fungi*. www.asmscience.org
- [15] Villanueva, J. R., & Acha, I. G. (1971). Production and Use of Fungal Protoplasts. *Methods in Microbiology*, 4(C), 665–718. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(09\)70029-7](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(09)70029-7).
- [16] Peberdy, J. F. (1979). AND FUSION. In *Ann. Rev. Microbiol* (Vol. 33). www.annualreviews.org.
- [17] Ttamlyn, P. F., Bradshaw, R. E., Mellon, F. M., Santiago, C. M., Wilson, J. M., & Peberdy, J. F. (1981). *Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes*.
- [18] Mbassi Josiane E. G., Mobou Estelle Y., Ngome Francis A., & Sado Kamdem S. L. (2018). *Effect of substrates on nutritional composition and functional properties of Pleurotus ostreatus*. *Current Research in Agricultural Sciences*, 5(1), 15-22.
- [19] (Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2, pp. xxxviii+-1546).)
- [20] Fajarningsih, N. D. (2016). Internal Transcribed Spacer (ITS) as Dna Barcoding to Identify Fungal Species: a Review. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 11(2), 37. <https://doi.org/10.15578/squalen.v11i2.213>.

- [21] Ciardo, D. E., Lucke, K., Imhof, A., Bloemberg, G. V., & Böttger, E. C. (2010). Systematic internal transcribed spacer sequence analysis for identification of clinical mold isolates in diagnostic mycology: a 5-year study. *Journal of clinical microbiology*, 48(8), 2809-2813.
- [22] Viceconte, F. R., Diaz, M. L., Soresi, D. S., Lencinas, I. B., Carrera, A., Prat, M. I., & Gurovic, M. S. V. (2021). *Ganoderma sessile* is a fast polysaccharide producer among *Ganoderma* species. *Mycologia*, 113(3), 513-524.
- [23] Hapuarachchi, K. K., Wen, T. C., Deng, C. Y., Kang, J. C., & Hyde, K. D. (2015). Mycosphere essays 1: Taxonomic confusion in the *Ganoderma lucidum* species complex. *Mycosphere*, 6(5), 542-559.
- [24] Mu, D., Shi, L., Ren, A., Li, M., Wu, F., Jiang, A., & Zhao, M. (2012). The development and application of a multiple gene co-silencing system using endogenous URA3 as a reporter gene in *Ganoderma lucidum*.