



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAestrÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
UN GEN DE ENDO- β -(1,6)-D-GALACTANASA DE
*Colletotrichum lindemuthianum***

TESIS QUE PRESENTA

BIOL. MARIA GUADALUPE VILLA RIVERA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

ASESOR:

DR. HORACIO CANO CAMACHO

CO-ASESORA:

DRA. MARÍA GUADALUPE ZAVALA PÁRAMO

Morelia, Michoacán, Marzo de 2013



FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del Dr. Horacio Cano Camacho y la co-asesoría de la Dra. María Guadalupe Zavala Páramo, como parte del proyecto de investigación **“Caracterización bioquímico molecular de los complejos hemicelulolíticos de *colletotrichum lindemuthianum*”**

ÍNDICE

Resúmen	6
1. Introducción	7
2. Antecedentes	9
2.1 Patotipos de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	9
2.2 Proceso de infección de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	9
2.3 Estructura y composición de la pared celular	12
2.3.1 Polisacáridos	12
2.3.1.1 Arabinogalactanos (AGs)	14
2.3.2 Proteínas	15
2.3.2.1 Proteínas de arabinogalactano (AGPs)	16
2.3.2.2 Funciones de las AGPs	18
2.4 Degradación enzimática de arabinogalactanos tipo II	19
3. Justificación	21
4. Hipótesis	22
5. Objetivos	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos específicos	22
6. Materiales y métodos	23
6.1 Material biológico	23
6.2 Medios de cultivo	23
6.3 Purificación de pared celular vegetal	23
6.4 Ensayos de inducción	24
6.5 Purificación de ARN total	24
6.6 Síntesis de ADNc por 3´RACE	25
6.7 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	25
control	
6.8 Análisis de expresión por RT-PCR	26
6.9 Análisis de expresión por qPCR	27
6.10. Clonación de productos de amplificación	27
6.11.Purificación de plásmidos recombinantes	28

6.12.Limpieza de plásmidos con bromuro de etidio para secuenciación	29
6.13.Secuenciación y análisis	29
7. Resultados	31
7.1 Caracterización parcial del gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de <i>C. lindemuthianum</i>	31
7.2 Análisis <i>in silico</i> de la proteína deducida del gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de <i>C. lindemuthianum</i>	35
7.3 Análisis de expresión por RT-PCR	36
7.4 Análisis de expresión por qPCR	38
8. Discusiones	42
8.1 Caracterización del ADNc que codifica una Endo- β -(1,6)-D-galactanasa de <i>C. lindemuthianum</i>	42
8.2 Análisis <i>in silico</i> de la proteína deducida del gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de <i>C. lindemuthianum</i>	43
8.3 Expresión de <i>Clebg</i> en las razas patógena 1472 y no patógena 0 de <i>C. lindemuthianum</i> cultivado con diferentes sustratos	44
9. Conclusiones	48
10 Literatura citada	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Nombre	Página
Cuadro 1	Similitud e identidad de secuencias de aminoácidos deducidos de endo- β -(1,6)-galactanasas con el fragmento aislado de <i>C. lindemuthianum</i>	32
Cuadro 2	Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de amplificación por RT-PCR y qPCR	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
Figura 1	Proceso de infección hemibiotrófica de <i>C. lindemuthianum</i> .	11
Figura 2	Representación de las proteínas que constituyen la pared celular vegetal y la superficie de contacto con la membrana plasmática así como los carbohidratos extracelulares.	16
Figura 3	Estructura de una proteína de arabinogalactano (AGP).	17
Figura 4	Degradación enzimática de arabinogalactanos tipo II por α -L-arabinofuranosidasas, exo y endo β -galactanasas indicando los respectivos sitios de corte.	19
Figura 5	Secuencia de aminoácidos deducidos de un fragmento de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de <i>C. lindemuthianum</i> .	31
Figura 6	Alineamiento clustal de la secuencias deducidas de aminoácidos de endo- β -(1,6)-galactanasa de <i>C. lindemuthianum</i> , <i>C. gloesporoides</i> , <i>G. graminicola</i> , <i>C. higginsianum</i> , y <i>T. viride</i> .	34
Figura 7	Estructura tridimensional de <i>Clebg</i> de <i>C. lindemuthianum</i> .	35
Figura 8	Estimación local de la calidad del modelo tridimensional predicho para <i>Clebg</i> .	36
Figura 9	Análisis de expresión de la raza 1472 de <i>C. lindemuthianum</i> inducido con LWAG, pared celular ó xilana.	38
Figura 10	Cinética de expresión relativa de <i>Clebg</i> in la raza 0 y 1472 de <i>C. lindemuthianum</i> , por qPCR.	40
Figura 11	Expresión relativa de <i>Clebg</i> en medio de cultivo con pared celular, arabinogalactano (LWAG) y xilana.	41

RESUMEN

Como parte del sistema lítico de degradación de pared celular vegetal que emplea el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* en su interacción con frijol, se encuentra la enzima endo- β -(1-6)-galactanasa involucrada en la degradación de arabinogalactanos (AG). Los AG son polisacáridos compuestos por un esqueleto principal de D-galactosa unidos por enlaces β -(1-3), sustituidos en C(O)6 por cadenas laterales de β -(1-6)-D-galactosa y terminados generalmente en L-arabinosa. Los AG se localizan en la fracción soluble de la hemicelulosa y pectina o se pueden encontrar unidos vía hidroxiprolina a proteínas formando las denominadas proteínas de arabinogalactano (AGPs), una familia de proteoglicanos complejos que se encuentran en la pared celulares, membrana plasmática y en la matriz extracelular. La función reportada para la endo- β -(1-6)-D-galactanasa es degradar enlaces β -(1-6)-D-galactosídicos liberando galactosa y endo- β -(1-6)-galactobiosa.

Se identificó un fragmento de 1101 pb correspondiente a un transcrito con un marco de lectura de 367 aminoácidos deducidos con un codón de detención, un UTR en el extremo 3' de 118 pb y un poli(A) de 33 adeninas al que se denominó *Clebg*. La comparación con bases de datos mostró 80-85% de similitud con las secuencias de aminoácidos de β -(1,6)-D-galactanasas reportadas para *Glomerella graminicola*, *Colletotrichum gloesporoides* y *Colletotrichum higginsianum*. El análisis *in silico* basado en la proteína Man5A cristalizada no mostró interacciones estables.

Se evaluó la expresión del gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *Colletotrichum lindemuthianum* por qPCR crecido de xilana, arabinogalactano (LWAG) y pared celular por 0, 2, 6, 12, 24 y 48 horas. El gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *Colletotrichum lindemuthianum* presenta niveles basales de expresión en presencia de glucosa y se induce en la raza patógena (1472) en cultivo con pared celular vegetal pero no en la raza no patógena (0) siendo este sustrato el mejor inductor de la expresión del gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa.

Por los resultados anteriores se sugiere que la endo- β -(1,6)-D-galactanasa podría ser un factor de patogénesis de *Colletotrichum lindemuthianum*.

1. INTRODUCCIÓN

Colletotrichum lindemuthianum, es un hongo fitopatógeno causante de la antracnosis en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Esta enfermedad puede ocasionar hasta el 90% de pérdidas en cultivos de variedades de frijol susceptibles al patógeno bajo condiciones ambientales favorables para el desarrollo del mismo (Pastor-Corrales, 1994). La pared celular vegetal es la principal barrera física entre un organismo patógeno y la célula durante el proceso de infección, debido al elevado peso molecular de los polisacáridos que la conforman y a los enlaces iónicos y covalentes que se establecen entre estos formando una estructura estable y difícil de penetrar. Por esta razón, los patógenos de plantas producen un amplio rango de enzimas capaces de degradar polisacáridos importantes de la pared celular (Vorwerk, 2004, Riou, 1991).

Los polisacáridos presentes en la pared celular son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza y representan una fuente de carbono importante para los patógenos. En el caso de *C. lindemuthianum* y de otros organismos fitopatógenos, la despolimerización de la pared celular les provee de nutrientes necesarios para su crecimiento y metabolismo (Bauer, 2006, Münch, 2008).

Existe una gran cantidad de enzimas involucradas en la despolimerización de la pared celular, éstas juegan un papel clave el proceso infección del hongo y desarrollo de síntomas (Wijesundera, 1989). En la caracterización del sistema lítico de *Aspergillus* por ejemplo, se encontró una gran variedad de enzimas: endoglucanasas, celobiohidrolasas, endoxilanasas, pectin liasas y enzimas accesorias como xilosidasas, arabinofuranosidasas, galactosidasas y endogalactanasas que llevan a cabo ésta función (P. de Vries, 2001).

Los hongos pueden utilizar distintos conjuntos de genes que codifican enzimas líticas (Tian, 2009). De acuerdo con lo reportado por Kahmann y col. (2001), la identificación de genes expresados específicamente por hongos durante la enfermedad, proporciona marcadores que pueden ser utilizados para controlar con precisión la progresión de la enfermedad, es por este motivo que la caracterización previa de los genes involucrados en dicha expresión es fundamental. Así mismo, se ha determinado en sistemas líticos de hongos ya caracterizados que la expresión de genes específicos de enzimas líticas puede responder a varios inductores (Foreman, 2003).

En el presente proyecto se aisló y analizó el ADNc que codifica para la enzima endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum*. Ésta enzima ha sido reportada anteriormente como integrante del sistema de degradación de pared celular en hongos como *Aspergillus* (P. de Vries, 2001), y *Sclerotinia sclerotiorum* (Riou, 1991).

En estudios previos se ha logrado la purificación de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de varios hongos, sin embargo, la secuencia y expresión heteróloga de cDNA sólo ha sido reportada para *Trichoderma viride* (Kotake, 2004), *Fusarium oxisporum* (Sakamoto, 2007) y *Neurospora crassa* (Takata, 2010).

Se ha reportado que la endo- β -(1,6)-D-galactanasa está involucrada en la degradación de arabinogalactanos (AG) que se encuentran en la fracción soluble de la hemicelulosa o unidos vía hidroxiprolina a proteínas formando las denominadas proteínas de arabinogalactano (AGPs), una familia de proteoglicanos complejos que se encuentran en las paredes celulares, membranas plasmáticas y en la matriz extracelular (Clarke, 1979, Showalter, 1993, Pérez Almeida, 2006). La mayoría de los AGPs se caracterizan por tener un contenido de proteínas menor del 10% y más de 90% de carbohidratos (Cassab, 1998). La función específica reportada para la endo- β -(1,6)-D-galactanasa es degradar enlaces β -(1,6)-D-galactosídicos liberando galactosa y endo- β -(1,6)-galactobiosa en las cadenas de arabinogalactanos (Brillouet, 1991).

2. ANTECEDENTES

2.1 Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum*

C. lindemuthianum es un hongo ascomiceto que causa la enfermedad de la antracnosis en cultivos de frijol (Sugiyama, 1998). El género *Colletotrichum* han sido recientemente considerado dentro de los diez hongos fitopatógenos más importantes de acuerdo a su relevancia económica y científica (Dean, 2012).

En *C. lindemuthianum*, distintas cepas de la especie infectan diferencialmente a un grupo de cultivares de una misma especie hospedera, estas cepas se agrupan en razas fisiológicas o patotipos, identificados con base en pruebas de interacción con doce cultivares diferenciales de *Phaseolus vulgaris*. Cuando un aislado es capaz de establecer una interacción de compatibilidad (el aislado es patógeno) con uno o más cultivares, entonces el aislado se identifica con base en la suma de los valores asignados de los cultivares que fueron susceptibles al aislado probado, si un aislado es incapaz de establecer una interacción de compatibilidad con los cultivares, se designará como patotipo 0 (Rodríguez-Guerra, 2006).

En México se ha reportado una gran diversidad patogénica de *C. lindemuthianum* (Balardin, 1997) y se han colectado 59 aislados de los estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas, Jalisco y Michoacán. Entre estos aislados se identificaron diez patotipos de los cuales la raza 1472 proveniente de Zacatecas se ha descrito como fuertemente patogénica y la raza 0 proveniente de Jalisco y Michoacán, se identificó como no patogénica (González, 1998).

2.2 Proceso de infección de *Colletotrichum lindemuthianum*

Durante el proceso de colonización de *C. lindemuthianum* se presentan dos formas de nutrición: biotrofia, cuando los nutrientes se obtienen de células vivas y necrotrofia que se caracteriza por el desarrollo de hifas secundarias que se ramifican a través de los tejidos del huésped provocando la muerte de las células (Perfect, 2001, Perfect, 1999).

Durante la fase biotrófica la espora del hongo se adhiere a la superficie de la planta, esta adhesión es posible gracias que ésta posee una cubierta fibrilar rica en carbohidratos que presenta en su superficie un número irregular de poros. La cubierta de la espora de *C. lindemuthianum* le permite adherirse a superficies hidrofóbicas de la planta y es la

superficie de contacto requerida para iniciar la diferenciación del tubo germinal y del apresorio (Rawlings, 2007). Se ha reportado en varias especies de *Colletotrichum* que las esporas censan señales físicas y químicas de la superficie de la planta capaces de disparar la germinación y formación de un tubo germinal pequeño, que posteriormente se diferencia en un apresorio (4-5 μm) inicialmente hialino pero que rápidamente se melaniza. El apresorio crea una alta presión de turgencia que proporciona fuerza mecánica para la perforación de la cutícula y la penetración de la pared celular de las células de la epidermis. Estas hifas de penetración se ensanchan dentro de las células epidermales formando vesículas de infección e hifas primarias intracelulares, las cuales colonizan algunas células del hospedero realizando su recorrido a través del lumen celular causando un daño mínimo a las paredes celulares. Tanto las vesículas de infección como las hifas primarias se encuentran rodeadas por una matriz extracitoplásmica de glicoproteínas secretadas que está conectada con los protoplastos vegetales y que separa la pared celular del hongo de la membrana plasmática de las células del huésped (Fig. 1) (Idnurm and Howlett, 2001, O'Connell, 1985, Mendgen, 2002).

Entre las 48 y 72 horas post inoculación, dependiendo de las condiciones ambientales, comienza la fase necrotrófica. Esta fase se caracteriza por el desarrollo de hifas secundarias que crecen tanto intracelularmente como intercelularmente y se ramifican dentro de los tejidos de la planta, son de un diámetro más pequeño que las hifas primarias y carecen de cubierta extracitoplasmática. Las hifas secundarias producen además, una gran cantidad de toxinas y enzimas hidrolíticas capaces de degradar pared celular y proteínas causando lisis y muerte celular al penetrar los protoplastos. Es durante éste periodo cuando se manifiestan los síntomas de antracnosis en la planta (Mendgen, 2002, O'Connell, 1985, Divon, 2007, Münch, 2008).

Las enzimas hidrolíticas secretadas por las hifas secundarias durante el periodo necrotrófico son fundamentales debido a que la despolimerización de la pared celular permite la liberación de una amplia variedad de azúcares monoméricos y oligoméricos que representan una fuente directa de carbono que provee de nutrientes al hongo (Münch, 2008). En un estudio previo realizado por Wijensudera y col. (1989), se encontró que en cultivos de *C. lindemuthianum* se produce la secreción de varias enzimas, principalmente

una endo-poligalacturonasa, dos pectin liasas, α y β galactopiranosidasas, α arabinofuranosidasa y proteasas durante la degradación de la pared celular.

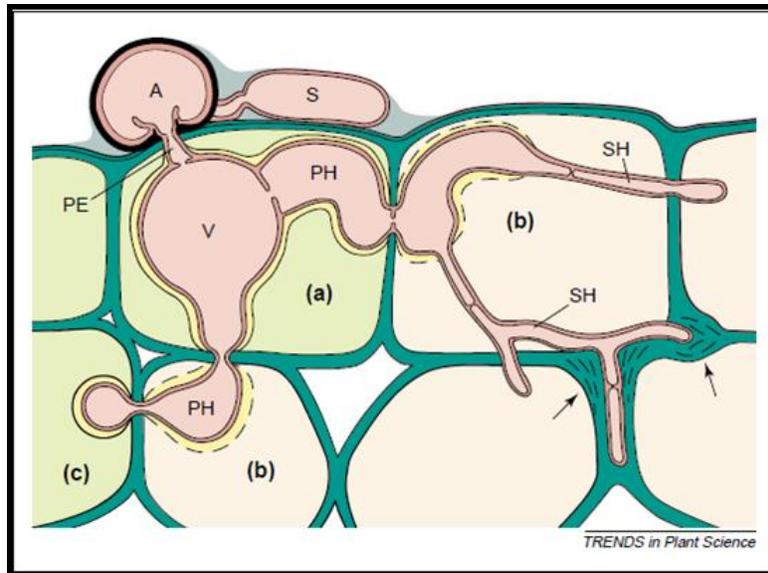


Figura 1. Proceso de infección hemibiotrófica de *C. lindemuthianum*. Una espora (S) ataca la superficie del hospedero y germina para formar un pequeño tubo germinal, que se diferencia en un domo, el apresorio melanizado (A). La hifa de penetración (PE) desarrollada en la base del apresorio, transforma la presión interna en una fuerza mecánica que penetra la cutícula y la pared celular. La hifa de penetración se hincha dentro de la célula epidermal y forma una vesícula (V) y una hifa primaria bien desarrollada (PH), la cual está rodeada por la invaginación de la membrana plasmática vegetal. El protoplasma del huésped permanece vivo durante el estado biotrófico (a) y una matriz interfacial separa el protoplasto del hongo y el del huésped (amarillo). Uno o dos días después de la penetración, comienza la desintegración de la membrana plasmática vegetal, generando la muerte de la célula huésped (b). Debido a que nuevas células son colonizadas por hifas primarias, la secuencia de una fase biotrófica seguida de muerte celular se repite progresivamente (c). Éste proceso termina tan pronto como se desarrolla una hifa secundaria (SH), la cual no se encuentra rodeada por la membrana del hospedero y carece de una matriz interfacial. Las paredes celulares del huésped son degradadas debido a la secreción de una gran cantidad de enzimas líticas que son secretadas por las hifas secundarias. (Tomado de Mendgen, 2002).

Adicionalmente, Dufresne y col en 2000 caracterizaron el gen *CLTA1* (*C. lindemuthianum* transcriptional activator 1) que codifica a un activador transcripcional putativo del tipo dedo de zinc que podría estar involucrado en la transición entre la fase biotrófica y necrotrófica. Demostraron que en plantas con silenciamiento de este gen, el hongo era capaz de desarrollar hifas primarias pero no hifas secundarias. Fenotípicamente se observó solo la aparición de lesiones necróticas típicas de una respuesta hipersensible (Dufresne, 2000).

2.3 Estructura y composición de la pared celular.

La pared celular vegetal es una delgada capa flexible de 0.1-1 μm que rodea el protoplasto. Está formada principalmente de polisacáridos y de algunas proteínas estructurales en menor cantidad (Keegstra, 2010). La pared celular, proporciona forma a los diferentes tipos celulares necesarios en la formación de tejidos y órganos de la planta, constituye la interfaz entre células adyacentes y tiene un papel importante en adhesión intercelular; permite la comunicación celular y hace posible el movimiento de agua y nutrientes, regula la presión osmótica manteniendo la integridad de la célula y de la planta misma, y tiene un papel fundamental en las interacciones planta-patógeno actuando como barrera física entre el patógeno y el interior de la célula e induciendo las reacciones de defensa de la planta (Somerville, 2004, Vorwerk, 2004, Keegstra, 2010, Burton, 2010).

Usualmente se ha dividido estructuralmente a la pared celular vegetal dos categorías: 1) Pared primaria la cual rodea células en crecimiento y 2) Pared secundaria que se deposita una vez que la célula dejó de crecer, entre sus características principales se encuentra su alto contenido de lignina. La lignina es una larga molécula polifenólica que hace resistentes a las paredes a la fuerza compresiva y restrictiva del tránsito de moléculas (Burton, 2010). A manera de interfaz entre la paredes secundarias de células adyacentes se encuentra una delgada capa adhesiva denominada lámina media formada principalmente por polisacáridos pécticos (Cosgrove, 2005, Keegstra, 2010, Kubicek, 2013).

Es difícil definir cuando la pared celular primaria es remplazada por pared celular secundaria. Las diferencias que han sido bien descritas entre una y otra refieren que los polisacáridos no celulósicos de las paredes secundarias generalmente presentan mayor grado de ramificaciones o presentan varias sustituciones en la cadena principal y se consideran menos solubles en un medio acuoso (Burton, 2010).

2.3.1 Polisacáridos

La pared celular primaria está formada químicamente por microfibrillas de celulosa. La celulosa es uno de los componentes principales tanto de la pared celular primaria como secundaria. Está constituida por moléculas de glucosa unidas por enlace β -(1-4) formando una red cristalina que se encuentra inmersa en una matriz de polisacáridos de dos tipos:

1) **Polisacáridos pécticos.** Constituyen el mayor componente de paredes celulares primarias de plantas dicotiledóneas. Incluyen homogalacturonano, xilogalacturonano, apigalacturonano, ramnogalacturonano, entre otros polisacáridos. La proporción entre estos componentes es variable pero típicamente el homogalacturonano es el polisacárido más abundante constituyendo aproximadamente el 65% de la pectina. El homogalacturonano está formado por residuos de ácido galacturónico unidos por enlaces α -D-(1-4) que pueden ser modificados por metil esterificación en el C-6 o por la presencia de grupos acetyl en el O-2 y O-3, la acetilación o metilación puede influenciar profundamente sus estructuras y las propiedades de los polisacáridos convirtiendo a la pectina en un polisacárido altamente heterogéneo. El contenido de pectina en las plantas varía dependiendo del ambiente, tejido y especie de planta (Lara-Marquez, 2011a, Harholt, 2010).

La pectina contribuye a la resistencia mecánica, porosidad, adhesión y rigidez de la pared celular y está involucrada en varios procesos incluyendo extensión y señalización intercelular. Adicionalmente, los polisacáridos pécticos son una fuente de moléculas de señalización (Harholt, 2010, Burton, 2010).

2) **Hemicelulosa:** un grupo heterogéneo de polisacáridos caracterizados por poseer moléculas de glucosa, manosa o xilosa unidos por enlaces β -(1-4). Los polisacáridos más importantes en la hemicelulosa son: xiloglucanos, xilana, mananos, glucomananos y glucanos β -(1-3, 1-4). En paredes celulares primarias el xiloglucano es el componente más abundante de las hemicelulosas, pero se pueden encontrar en menor cantidad algunos otros polisacáridos como son galactanos, arabinanos, y arabinogalactanos. Todas las hemicelulosas muestran diferencias estructurales entre especies de plantas e incluso entre los distintos tipos de células en un mismo organismo (Scheller, 2010). La estructura de la hemicelulosa permite que estos azúcares complejos se encuentren a lo largo de la superficie intercalados dentro de los paquetes de celulosa, formando una matriz (Kohorn, 2000). Esta matriz provee flexibilidad y soporte mecánico a la célula y su inherente porosidad permite que el agua y otras moléculas pequeñas difundan a través de la pared (Burton, 2010).

Fragmentos de polisacáridos no celulósicos de las paredes celulares están implicados en la regulación del crecimiento de la planta y están asociados a rutas de señalización relacionadas con la pérdida de integridad de la pared celular (Burton, 2010).

Se estima que una pared celular típica está constituida por un 40.6 a 51.2% de celulosa, 28.5 a 37.2 % hemicelulosa, 10 a 35% pectina, 13.6-28.1% lignina y 10% de proteínas. (Pauly, 2008).

2.3.1.1 Arabinogalactanos (AGs)

Los arabinogalactanos (AGs) son polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa. Éstos polisacáridos se han encontrado en tejidos de plantas de forma libre o asociados covalentemente con proteínas formando proteoglicanos (Clarke, 1979). Los AGs son agrupados de acuerdo a su estructura en dos tipos:

i) Arabinogalactanos tipo I.

Los Arabinogalactanos tipo I se caracterizan por tener un esqueleto de residuos lineares de galactopiranosos unidos por enlaces β -(1-4) sustituidos por cadenas α -(1-3)-arabinofuranosa, principalmente; aunque también pueden contener ramnosa, xilosa o ácido urónico (Clarke, 1979, de Vries, 2002).

Los AGs tipo I están presentes en los complejos pécticos de semillas, bulbos, hojas y en la madera de coníferas. Específicamente se han encontrado β -(1-4)-galactano y AGs tipo I en las cadenas del Ramnogalacturonano I en la pectina (Clarke, 1979 y Pérez Almeida, 2006,).

ii) Arabinogalactanos tipo II.

Los arabinogalactanos tipo II son conocidos también como Arabino-3,6-galactanos. Su estructura consiste en una cadena de aproximadamente 30 a 150 residuos de D-galactosa unidos por enlaces β -(1-3), sustituidos en C(O)6 por cadenas laterales de β -(1,6)-D-galactopiranosos terminados generalmente en arabinosa enlazado a la galactosa por enlaces α -(1-3) (Pérez Almeida, 2006, Gaspar, 2001). Algunos análisis químicos de AGs tipo II sugieren que la cadena principal contiene una estructura repetitiva de aproximadamente 7 residuos de β -(1-3)-D-galactosa interrumpidos por las cadenas laterales de β -(1,6)-D-galactosa o α -(1-5)-arabinofuranosa (Ellis, 2010). Se ha reportado que algunos AGs tipo II pueden estar modificados en menor cantidad por otros monosacáridos como son L-ramnosa, D-manosa, D-xilosa, D-glucosa, L-fucosa, D-glucosamina, ácido D-glucurónico, y ácido D-galacturónico (Showalter, 2001).

Los AGs tipo II se han encontrado en semillas, hojas, raíces, frutos y en el tejido xilemático. En las paredes celulares se encuentran en la fracción soluble de la hemicelulosa (Clarke, 1979).

2.3.2 Proteínas.

Aunque las proteínas presentes en la pared celular constituyen aproximadamente el 10% del total de la misma, son componentes esenciales ya que están involucradas en la modificación de otros componentes de la pared, estructura, señalización e interacciones con las proteínas de la membrana plasmática en la superficie celular (Figura 2) (Jamet, 2008). Anteriormente se creía que estas proteínas sólo se caracterizaban por ser ricas en uno o dos aminoácidos, poseer dominios con secuencias altamente repetitivas y podían estar pobre o altamente glicosiladas en base a esto se clasificaban en cuatro tipos: i) Extensinas. o proteínas ricas en hidroxiprolina. Se caracterizan por poseer un alto contenido de hidroxiprolina y serina. ii) Proteínas ricas en glicina las cuales contienen una estructura primaria conformada por más 70% de glicina ubicada en pequeñas unidades repetitivas. iii) Proteínas ricas en prolina caracterizadas por contener repeticiones de Prolina-Prolina contenidas en una variedad de unidades de repetición más extensas; y por último, iv) Proteínas de arabinogalactano (Showalter, 1993, Carpita, 1996, Cassab, 1998).

En los últimos años se ha intensificado el estudio referente a la proteómica de la pared especialmente en *Arabidopsis thaliana* donde se han descrito alrededor de 400 proteínas de pared celular de las cuales el 87% han sido categorizadas en base a predicciones bioquímicas y función biológicas mientras que el 13% restante consiste en proteínas cuya función no es conocida aún. Las principales categorías de proteínas de pared celular son las siguientes: proteínas que actúan en carbohidratos (26%), óxido reductasas (12.4%), proteasas (11.9%), proteínas con dominios de interacción (10.6%), Proteínas involucradas en señalización (7.4%), proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos (5.4%) y proteínas estructurales (11.9%) (Jamet, 2006 y Jamet, 2008,)

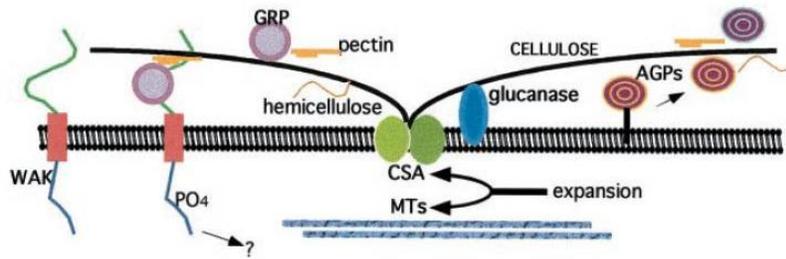


Figura 2. Representación de las proteínas que constituyen la pared celular vegetal y la superficie de contacto con la membrana plasmática así como los carbohidratos extracelulares. Celulosa sintasa (CSA), microtúbulos citoplásmicos (MTs), Proteínas de arabinogalactano (AGPs), Cinasas asociadas a la pared celular (WAK), Proteínas ricas en glicina (GRPs). (Tomado de Kohorn 2000)

2.3.2.1 Proteínas de arabinogalactano (AGPs)

Las proteínas de arabinogalactano (AGPs) son glicoproteínas constituidas por menos del 10% de proteínas (ricas en residuos de hidroxiprolina, alanina, serina y treonina) las cuales son O-glicosiladas por uno o más complejos de arabinogalactanos tipo II (descritos anteriormente) los cuales constituyen el 90% del peso total de las AGPs. El tamaño del complejo AG puede variar de 90 a 120 residuos de galactosa (Clarke, 1979 y Gaspar, 2001.). Estas proteínas han sido incluídas dentro de la superfamilia de proteínas ricas en hidroxiprolina las cuales se han agrupado de acuerdo al grado de glicosilación en las siguientes familias: Proteínas de arabinogalactano (AGPs) las cuales se encuentran altamente glicosiladas; Extensinas (EXTs) de glicosilación moderada y por último proteínas ricas en prolina (PRPs) cuyo grado de glicosilación es muy bajo. (Showalter, 2010)

Se ha especulado recientemente que el núcleo proteico de las AGPs puede tener varios sitios de glicosilación siendo estos la superficie de contacto con otras moléculas (Seifert, 2007). Las AGPs son encontradas en la membrana plasmática, en la pared celular, en el espacio apoplástico y en secreciones (superficie del estigma y exudados) (Fig. 2) (Ellis, 2010).

Los AGs tipo II se encuentran unidos al núcleo proteico vía Hidroxiprolina y posiblemente a través de Serina y Treonina o por medio de residuos de arabinosa unidos a hidroxiprolina, en algunos casos la región de la proteína rica en hidroxiprolina se encuentra interrumpida por una pequeña región básica (Fig 3), además de éste dominio rico en hidroxiprolina, el núcleo proteico se caracteriza por tener un dominio C-terminal hidrofóbico (Showalter, 2001 y Gaspar, 2001).

Cuando las AGPs se encuentran asociadas a la membrana plasmática, lo hacen a través de un anclador glicosil fosfatidil inositol (GPI), el C-terminal del dominio hidrofóbico es la señal para la adición del GPI el cual se acopla vía fosfoetanolamina a D-Manosa-(1-2)- α -D-Manosa-(1,6)- α -D-Manosa (1-4)- α -D-N-acetilglucosamina que es unido a un residuo de inositolfosfoceramida (Seifert, 2007).

Las AGPs se han dividido en dos clases en función de su núcleo proteico: AGPs Clásicas caracterizadas por poseer un núcleo proteico rico en hidroxiprolina, alanina, serina, treonina y glicina; y AGPs no clásicas las cuales poseen un núcleo proteico pobre en hidroxiprolina pero rico en cisteína o asparagina (Mau, 1995, Showalter, 2001). Las AGPs clásicas tienen además un dominio transmembranal hidrofóbico adherido a su C-terminal que actúa como señal para el anclaje del glicosil fosfatidil inositol (GPI) que es el punto de unión a la membrana plasmática. Tanto el N-terminal como el C-terminal son removidos de la proteína madura, a diferencia de estas, las AGPs no clásicas tienen estructuras más heterogéneas y es menos probable encontrar en ellas el GPI (Gaspar, 2001, Pérez Almeida, 2006 y Ellis, 2010,)

El análisis de diferentes tejidos y de varias especies de plantas sugiere que hay gran heterogeneidad tanto en el componente carbohidrato como proteína (Gaspar, 2001).

El núcleo proteico

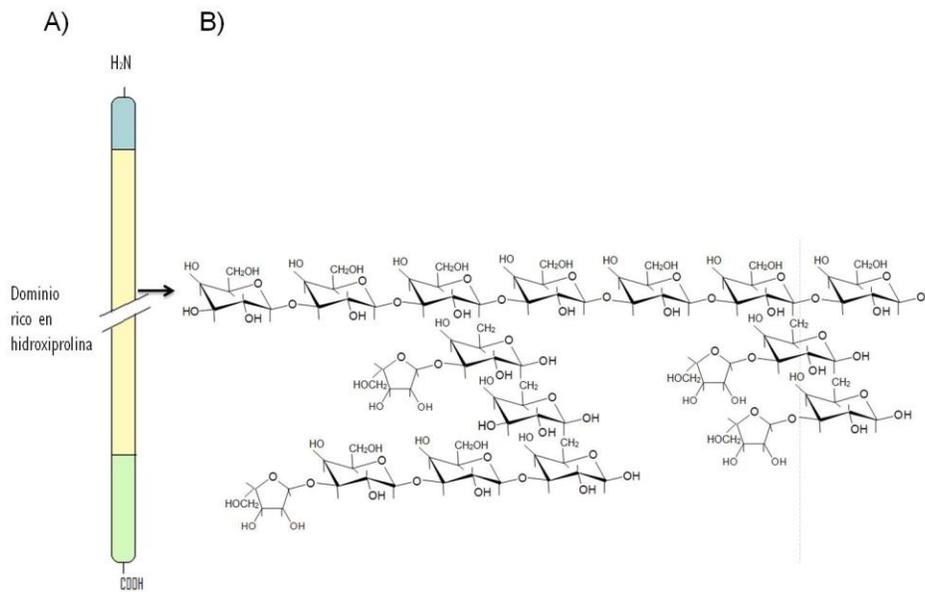


Figura 3. Estructura de una proteína de arabinogalactano (AGP). **A)** Diagrama del componente proteico indicando el dominio rico en hidroxiprolina donde se unen los Arabinogalactanos tipo II (AGs) **B)** Núcleo carbohidrato de Arabino-3,6-galactanos.

2.3.2.2 Función de las AGPs

Se ha reportado que las AGPs se presentan en la célula como secreciones al espacio intercelular o en cuerpos multivesiculares intracelulares. La mayoría de las AGPs están ancladas, a veces en forma transitoria, a la membrana plasmática mediante un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Varias líneas de evidencia sugieren que la función de las AGPs está relacionada con distintos aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta, debido a que estudios realizados acerca de los patrones de expresión en órganos, tejidos y tipos celulares específicos indican que las AGPs sirven como marcadores de identidad y destino celular (Showalter, 2001 y Seifert, 2007.)

Ciertas AGPs están involucradas también en el desarrollo del tejido xilemático en las plantas, en el ensanchamiento de la pared celular secundaria y en la muerte celular programada. Las AGPs poseen también la habilidad de controlar la embriogénesis en la planta según se ha demostrado en *Zinnia*, *Arabidopsis* y otras plantas.

Recientemente las AGPs han sido categorizadas dentro de las proteínas de señalización de la pared celular, Showalter en 2001 ya especulaba acerca de esta función de las AGPs basado en la estructura de las mismas proponiendo incluso algunos modelos de cómo podrían estar involucrados en la comunicación y/o adhesión celular (Jamet, 2008, Showalter, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que algunas AGPs presentan un dominio conservado de seis residuos de cisteína denominado dominio PAC (prolina, AGP, cisteína) con una pequeña glicoproteína LAT52 que se ha reportado interactúa con un receptor RLK (receptores de cinasas) llamado LePRK2. Se ha sugerido que el dominio PAC es el intermediario en la unión entre AGPs y RLKs y así mismo se plantea que RLKs y AGPs pueden ser el enlace entre la matriz de polisacáridos y la señalización celular (Seifert, 2007).

Adicionalmente a las funciones de las AGPs en plantas, se encuentra la importancia comercial. Las AGPs son componentes de exudados de un gran número de plantas ya que le confiere propiedades importantes como la viscosidad a los productos derivados de éstos exudados. Las AGPs y los arabinogalactanos de tipo II pueden tener también aplicación en la medicina. Se ha reportado que ambas moléculas estimulan el sistema inmune animal, en algunos casos activando un sistema complementario y en otros aumentando la actividad citotóxica en el proceso de muerte celular natural (Showalter, 2001).

2.4 Degradación enzimática de abinogalactanos tipo II.

Las AGPs y Ags tipo II son hidrolizados por tres enzimas diferentes (Brillouet, 1991). Las que se encargan de la degradación de la cadena principal de galactosa unidos por enlace β -(1-3) liberando residuos de D-galactosa (Tsumaraya, 1990). Las exo- β -(1-3)-D-galactanasas han mostrado alta especificidad a su sustrato independientemente del grado de polimerización, se ha demostrado incluso que estas enzimas pueden actuar sobre el sustrato ramificado (Ichinose, 2006a). Las α -L-arabinofuranosidasas que hidrolizan los enlaces que unen los residuos terminales de arabinosa y las endo- β -(1,6)-D-galactanasas encargadas de la degradación de enlaces β -(1,6) en las cadenas laterales de AGs actúan sinérgicamente (Fig. 3) (Takata, 2010).

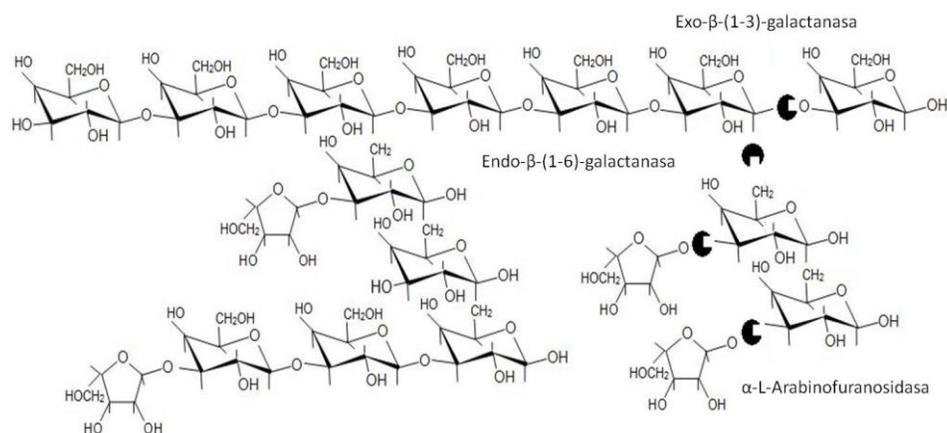


Figura 4. Degradación enzimática de arabinogalactanos tipo II por α -L-arabinofuranosidasas, exo y endo β -galactanasas indicando los respectivos sitios de corte.

El primer reporte de la caracterización de una endo- β -(1,6)-D-galactanasa ocurrió en 1991, cuando se purificó la enzima proveniente de *Aspergillus niger* y se señaló que la acción de ésta enzima consistía en hidrolizar específicamente las cadenas laterales β -(1,6)-galactosil de AGs desarabinosilados liberando galactosa y β -D-(1,6)-galactobiosa (Brillouet, 1991).

Posteriormente con la purificación y caracterización de las β -D-galactanasas de *A. niger* y *A. aculeatus* que actúan sobre β -(1-4) y β -3/6 arabinogalactanos, se confirmó la función de la endo- β -(1,6)-D-Galactanasa antes reportada por Brillouet (1991); demostraron además, que la enzima es activa sólo en enlaces β -(1,6) no detectándose hidrólisis sobre enlaces β -(1-3) en las cadenas de galactosa. En éste mismo estudio se probó que la primera endo- β -galactanasa purificada parcialmente de *Rhizopus niveus* y reportada en 1969 como endo- β -

(1-3)-galactanasa realmente actuaba sobre enlaces β -(1,6) y no β -(1-3) como se había presumido (Lounteri, 2003). También en 2003 se realizó la purificación y la caracterización de una endo- β -(1,6)-galactanasa procedente del hongo *Trichoderma viride*, donde se reportó que la enzima hidrolizaba específicamente β -(1,6) galactooligosacáridos con grado de polimeración mayor a tres, y demostraron en sus análisis que la enzima actuaba como una endo enzima (Okemoto, 2003). Un año después se clonó y expresó en *Escherichia coli* un gen codificante de una endo- β -(1,6)-galactanasa de *Trichoderma viride*, siendo ésta la primera secuencia de ADNc reportada para el gen que codifica a ésta enzima. Se encontró también que la secuencia de aminoácidos deducida tenía similitud con otras secuencias de glicosil hidrolasas antes reportadas (Kotake, 2004).

Posteriormente, se purificó y caracterizó una β -(1,6)-galactanasa procedente de *Fusarium oxysporum*, se aisló el ADNc correspondiente al gen que codifica la enzima y la secuencia de aminoácidos deducida mostró muy poca similitud con la secuencia antes reportada para *T. viride*, sin embargo, se encontró un alta similitud con enzimas glicosil hidrolasas de la familia 5 (Sakamoto 2007). Esta familia incluye varios tipos de enzimas como la β -manosidasa, celulasa, exo- β -(1-3)-glucanasa, endo- β -(1,6)-glucanasa, endo- β -(1-4)-mananasa, endo- β -(1-4)-xilanas y β -(1-4)-celobiosidasa, entre otras. Las enzimas que forman parte de la familia 5 de las glicosil hidrolasas se caracterizan por tener estructura β/α y son conocidas por operar por el mecanismo de retención vía doble desplazamiento (Sabini, 2000). Los sitios catalíticos de la endo- β -(1,6)-galactanasa de *T. viride* son dos residuos de ácido glutámico que actúan como un par ácido/base y un nucleófilo. En la predicción de la estructura terciaria de la endo- β -(1,6)-galactanasa de *T. viride* se confirmó que ésta enzima pertenecía a la familia 5, dado que mostró una alta similitud a la estructura terciaria de una β -mananasa de *T. reesei* (Kotake, 2004).

Posteriormente, se clonó y expresó en *E. coli* el gen putativo de la endo- β -(1,6)-galactanasa procedente del actinomicete *Streptomyces avermitilis*, siendo ésta la primera endo- β -(1,6)-galactanasa identificada en un organismo procarionte (Hitomi, 2008).

Recientemente, se caracterizó y expresó una endo- β -D-galactanasa purificada de *Neurospora crassa* en *Pichia pastoris*. En éste estudio se estableció que la actividad de ésta enzima incrementa significativamente cuando actúa sinérgicamente con α -L-arabinofuranosidasas (Takata, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

Las enzimas se han convertido en herramientas insustituibles para la obtención industrial de productos de muy diversa índole. Enzimas de distinta naturaleza y actividad son utilizadas por muchas industrias de alimentos, químicas o farmacéuticas. Determinadas especies de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Mucor*, se encuentran entre los principales organismos productores de enzimas industriales. Entre éstos hongos filamentosos se encuentra también *C. lindemuthianum* que produce una gran cantidad de enzimas líticas durante su interacción con la planta de frijol.

Las propiedades funcionales de una proteína derivan de su estructura, que en último término está determinada por la secuencia nucleotídica del gen que la codifica, por lo tanto la parte experimental de la ingeniería de proteínas comienza por el aislamiento del gen que codifica la proteína sobre la que queremos actuar por lo tanto la caracterización de éste gen es un paso fundamental para lograr dicho propósito.

El presente trabajo se aportó información acerca de la caracterización del gen que codifica la enzima endo- β (1,6)-D-galactanasa que forma parte del sistema lítico de *C. lindemuthianum*, ésta enzima forma parte del sistema de degradación de AGPs y AGs, componentes de la pared celular.

El potencial biotecnológico de la enzima reside en el sustrato que degradan, se ha reportado que los AGPs son componentes importantes de exudados y resinas. Otro ejemplo importante es la utilización de estas enzimas por las industrias lácteas que fabrican distintos productos en los que la lactosa ha sido hidrolizada a galactosa y glucosa mediante la adición de lactasas y galactanasas.

4. HIPÓTESIS

El sistema de degradación de la pared celular vegetal del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* contiene el gen de endo-galactanasa cuyo producto podría actuar como enzima accesoria en la degradación de arabinogalactanos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Identificar y caracterizar un gen de endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *Colletotrichum lindemuthianum* y establecer su respuesta a diferentes sustratos en dos razas del hongo con diferente grado de patogenicidad.

5.2. Objetivos específicos

- Caracterizar el ADNc de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum*.
- Realizar un análisis *in silico* de la proteína deducida del gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum*.
- Analizar la expresión del gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa en dos razas de *C. lindemuthianum* con diferente grado de patogenicidad.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Se utilizaron las cepas patógena (1472) y no patógena (0) del hongo filamentoso *C. lindemuthianum*, procedentes de una colección tipificada perteneciente al cepario del Laboratorio de Estudio de Enzimas Líticas de Pared Celular Vegetal del CMEB, UMSNH.

6.2. Medios de cultivo

El hongo se mantuvo de manera rutinaria en medio sólido de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (French, 1982) el cual se preparó de la siguiente manera: Se lavaron y cortaron en cuadros pequeños 250 g de papas, se cocieron en un litro de agua destilada y posteriormente se filtró con una gasa. Se agregó 15 g de dextrosa previamente disuelta en 100 ml de agua destilada y 20 g de agar. Finalmente se aforó a un L y se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras por pulgada cuadrada de presión (Sterilizer SM510, Yamato). El medio se distribuyó en cajas de petri de 10 cm de diámetro y se almacenó a 4°C. La preparación del medio Papa-Dextrosa (PD) se realizó siguiendo el método anterior pero sin agregar agar.

Para los ensayos de inducción, se cultivó micelio de *C. lindemuthianum* de ambas cepas patógena y no patógena en medio de Mathur modificado (MgSO₄·7H₂O 2.5 g/l, KH₂PO₄ 2.72 g/l y ácido L-glutámico 5.28 g/l como única fuente de nitrógeno, pH 5.2) con arabinogalactano (LWAG), xilana ó pared celular al 2.5% como única fuente de carbono respectivamente.

6.3. Purificación de pared celular vegetal.

Semillas de frijol variedad flor de junio previamente lavadas dos veces con hipoclorito de sodio al 4% y agua destilada, se germinaron durante 8 días en oscuridad, transcurrido este tiempo se colectaron los hipocotilos y se almacenaron a -80°C, posteriormente se procedió con la purificación de la siguiente manera: se pesaron 20 g de hipocotilos de frijol y se maceraron con nitrógeno líquido hasta lograr un fino polvo blanco, a cada 20 g se agregaron 200 ml de etanol al 70% frío y se sometió a agitación permanente, se realizaron tres lavados con etanol al 70 % en intervalos de dos horas y posteriormente dos lavados con

acetona. Se filtró la acetona y el precipitado se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente.

6.4. Ensayos de inducción

Se inocularon tres piezas de 0.6 cm de diámetro de micelio en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio PD y fueron incubados a 28°C durante diez días en una incubadora orbital a 150 revoluciones por minuto (rpm). Transcurrido este tiempo se filtró y lavó el micelio con H₂O destilada desionizada estéril (H₂O_{dde}) para eliminar residuos de PD y se transfirió a medio Mathur modificado para posteriormente ser recuperado a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 horas de inducción. A continuación, el micelio recuperado se almacenó a -80°C. Adicionalmente, se realizó una inducción utilizando glucosa como fuente de carbono pero únicamente a 8 horas.

6.5. Purificación de ARN total

Se tomó aproximadamente 1 g de micelio inducido congelado de *C. lindemuthianum* de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 horas de inducción y trituró en mortero con nitrógeno líquido y se colocó en un microtubo de 1.5 ml estéril previamente lavado con agua dietilpirocarbonada estéril (H₂O_{DEPC}), se adicionó 0.5 ml de NTES (NaCl 0.1M, Tris-HCl pH7.5 10 mM, EDTA 1mM, SDS 1%) y 0.5 ml de fenol cloroformo isoamílico (50:49:1). La muestra se agitó en vórtex por 10 minutos y posteriormente se centrifugó 10 minutos a 8000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 0.5 ml de fenol cloroformo isoamílico (50:49:1), se agitó en vórtex 10 minutos, se centrifugó 10 minutos a 8000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se adicionó dos volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 2 M, las muestras fueron incubadas 20 minutos a -20°C. Trascurrido este tiempo se centrifugó 10 minutos a 8000 rpm y se eliminó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 300 µl de H₂O_{DEPC} y se agregó 300 µl de cloruro de litio 4M, se agitó cuidadosamente y se incubó a 4°C durante toda la noche.

Trascurrido el periodo de incubación las muestras se centrifugaron 10 minutos a 8000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 300 µl de H₂O_{DEPC} y se agregó dos volúmenes de etanol absoluto y 100 µl de acetato de sodio 2M, se incubó por dos horas a -20°C y se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 8000 rpm. Se descartó el

sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente durante 20 minutos para posteriormente ser resuspendida en 30 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ y se almacenó a -80°C .

Para revisar la integridad del ARN se separó por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con sybr safe 1X (Invitrogen) en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8), buffer de carga tipo III 6X (Bromofenol 0.25%, xialencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook, 2001) con una corriente de 70 voltios (volts) durante 50 minutos. El gel fue visualizado en un fotodocumentador de luz UV (Logic 200, Imagin System) a 320 nm. Por último se midió la concentración dada en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del ARN purificado en un espectrofotómetro de luz UV (BioPhotometer plus Eppendorf).

6.6. Síntesis de ADNc por 3'RACE

Se agregó a un microtubo de 0.2 ml estéril y previamente lavado con $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ lo siguiente: 1 μg de ARN total, 1 μM de buffer de reacción 1X para DNasa I (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 2 mM MgCl_2 , 50 mM KCl), 0.2 U de DNasa I y $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ en un volumen total de 10 μl . Se mezcló brevemente la reacción, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, se inactivó adicionando 1 μM de EDTA 25 mM y se incubó a 65°C durante 10 minutos. Posteriormente se añadió 1 μM de adaptador 3'RACE (10 pmol/ μl), 400 μM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), se incubó a 65°C durante 5 minutos (Thermolyne Dry-Bath) y posteriormente se transfirió a hielo por dos minutos. Transcurrido éste tiempo se adicionó lo siguiente: buffer para PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), MgCl_2 2.5 mM, DTT 10 mM, RNasaOUT 40 U y SuperScript II RT 200 U (Invitrogen), se mezcló brevemente por pipeteo y se incubó a 50°C durante 50 minutos para posteriormente ser inactivada a 70°C por 15 minutos (Thermolyne Dry-Bath). Por último se adicionó 2 U de RNasa H y se incubó a 37°C durante 20 minutos (SEP LAB Incubator) para remover el ARN adicional.

6.7. Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) control

Para corroborar la integridad del ADNc después de la síntesis, se realizó una PCR control utilizando un par de oligonucleótidos específicos diseñados sobre un fragmento aislado y secuenciado del gen constitutivo de β -tubulina de *C. lindemuthianum*. (Cuadro 2). En un microtubo de 0.2 ml se preparó la siguiente mezcla: 2 μl de ADNc, 10 pmol de cada

oligonucleótido, Buffer para PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 U de Platinum *Taq* DNA polimerasa y H_2O_{dde} en un volumen final de 25 μ l. Se incubó la reacción en un termociclador (Gene Amp PCR System 2700/Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 94°C, 4 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 55°C durante 35 segundos y extensión a 72°C durante 40 segundos; y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

6.8. Análisis de expresión por RT-PCR

Se realizaron ensayos PCR utilizando ADNc de micelio inducido con LWAG, xilana y pared celular de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 horas de inducción y un par de oligonucleótidos específicos GALD y GALR (Cuadro 2) diseñados previamente a partir de un fragmento secuenciado de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum* para obtener un fragmento de 621 pb. En un microtubo de 0.2 ml estéril se colocó 2 μ l de cadena sencilla de ADNc, 10 pmol de cada oligonucleótido específico, Buffer para PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 U de Platinum *Taq* DNA polimerasa y H_2O_{dde} en un volumen final de 25 μ l. Se incubó la reacción en un termociclador (Gene Amp PCR System 2700/Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 94°C, 2 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 57°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto; y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8), buffer de carga tipo III 6X (Bromofenol 0.25%, xialencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook, 2001), teñido con Sybr Safe 1X (Invitrogen); marcador de tamaño molecular de 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogene) y con una corriente de 80 volts durante 45 minutos. El gel fue visualizado en un fotodocumentador de luz UV (Logic 200, Imagin System) a 254 nm utilizando el software Kodak Gel Logic 2000.

6.9. Análisis de expresión por qPCR

Los ensayos de expresión por qPCR se realizaron utilizando ADNc de micelio inducido con xilana y pared celular de 0, 2, 6, 12, 24 y 48 horas de inducción. Se utilizó como control el gen endógeno de la β -tubulina. Se diseñó un juego de oligonucleótidos (Btub2-D y Btub2-R) a partir de un fragmento secuenciado de éste gen proveniente de *C. lindemuthianum* que amplifica un fragmento de 94 pb (Cuadro 2). Para evaluar la expresión de *Clebg* se sintetizó un par de oligonucleótidos específicos Galq-D y Galq-R (Cuadro 2) diseñados a partir en un fragmento secuenciado del ADNc de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum* que amplifica un fragmento de 137 pb. En un microtubo de 0.2 ml estéril se colocó 200 ng de cadena sencilla de ADNc, 2 picomol de cada oligonucleótido específico, 5 μ l de EXPRESS SYBR GreenER qPCR Supermix Universal, 0.2 μ l de ROX Reference Dye (25 μ M) y agua ultrapura destilada libre de DNasas y RNasas en un volumen final de 10 μ l.

Se incubó la reacción en un termociclador (StepOnePlus Real-time PCR System/Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 40 segundos a 95°C, 40 segundos a 59°C y 40 segundos a 72°C. La expresión relativa de *Clebg* se cuantificó utilizando el método comparativo Ct ($\Delta\Delta$ Ct)

Los datos fueron obtenidos a partir de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

6.10. Clonación de productos de amplificación

Los productos de amplificación se ligaron en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen). En un tubo de 0.2 ml estéril se colocó 5 μ l de H₂O_{dde}, 10 ng del producto de PCR fresco, Buffer de Ligación 1X (0.6 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.6 mM MgCl₂, 0.5 mM NaCl, 0.01 mg/ml albumina de suero bovino, 0.7 mM β -mercaptoetanol, 0.01 ATP, 0.2 mM ditiotreititol, 0.1 mM espermidina), 25 ng/ μ l de vector pCR 2.1 y 4 u/ μ l de T4 DNA ligasa. Después de mezclar la reacción se incubó a 14°C durante toda la noche.

Para la transformación de *E. coli*, se adicionaron 2 μ l de la reacción de ligación a un microtubo de 1.5 ml con 50 μ l de células quimiocompetentes de la cepa Top 10 de *E. coli* y se mezcló. A continuación se incubó en hielo durante 30 minutos y transcurrido este tiempo se sometió a las células a un shock térmico a 42°C durante 30 segundos e inmediatamente

se transfirió a hielo. Se adicionaron 250 µl de medio S.O.C. (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.42 mM NaCl, 0.1 mM KCl, 0.42mM MgCl₂, 0.42 mM MgSO₄, 0.8 M dextrosa) y se incubó a 37°C durante una hora en termomixer (Eppendorf Thermomixer). Posteriormente se procedió a espatular las bacterias en placas de medio LBA-Amp adicionadas previamente con X-Gal (40mg/ml) para la posterior selección por color de colonias transformantes. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche (Incubator 1545 Shel Lab).

6.11. Purificación de plásmidos recombinantes

Se seleccionaron las colonias transformantes blancas y con un palillo estéril se transfirió a un tubo de ensaye de 15 ml con 2 ml de medio LB-Amp. Los cultivos se crecieron durante toda la noche en una incubadora orbital (Lab.line Incubator-Sharker Orbit) a 37°C y 150 rpm. La purificación de plásmidos recombinantes se realizó mediante el método Birnboim y Doly (1979) de la siguiente manera. Se centrifugó 1.5 ml del cultivo crecido de toda la noche por 10 segundos a 13 000 rpm y se descartó el sobrenadante conservando solo 50 µl para resuspender la pastilla. Se añadió 150 µl de solución Birnboim I (Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl pH 8 25 mM) y 300 µl de solución Birnboim II (NaOH 0.2 M, SDS 1%) y se agitó cuidadosamente. Posteriormente se adicionó 300 µl de solución Birnboim III (acetato de sodio 3 M pH 5.2), se mezcló por inversión y se añadió 300 µl de cloroformo mezclando en vórtex hasta observar la muestra color blanco. Se centrifugó a 13000 rpm durante tres minutos (Centrifuge 5415D, Eppendorf) y se transfirió la fase acuosa a un microtubo estéril de 1.5 ml, se agregó 700 µl de isopropanol frío (-20°C), se mezcló y se centrifugó por 15 minutos a 12 000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 750 µl de etanol al 70% frío, se centrifugó tres minutos a 12 000 rpm y se decantó el etanol para posteriormente secar la pastilla durante una hora a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se resuspendió en 50 µl de H₂O_{dde} y se agregó 1 µl de RNasa A (10 mg/ml) incubando por una hora a 37 °C. Se verificó la integridad de los plásmidos por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con sybr safe (1X).

Para liberar los insertos de los plásmidos se realizó digestión enzimática como se describe a continuación. Se agregó 1 µg de plásmido purificado, 1 µl de la enzima *EcoRI* 15 U/µl (Invitrogen), 10 X Buffer H (1mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2 mM MgCl₂, 0.02 mM DTT, 2 mM

NaCl) y H₂O_{dde} suficiente para un volumen final de 20 µl. Se incubó durante una hora a 37°C y los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñido con sybr safe (1X).

6.12. Limpieza de plásmidos con bromuro de etidio para secuenciación.

De acuerdo al tamaño de los insertos, se seleccionaron plásmidos recombinantes y se prepararon para secuenciación por purificación mediante el método de Br.Et/sales de Stemmer (Stemmer, 1991). Se ajustó el volumen de cada muestra a 250 µl con H₂O_{dde}. Se adicionaron 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se mezcló perfectamente. Se agregó 140 µl de acetato de amonio (7.5 M), y 420 µl de Fenol Cloroformo Isoamílico (25:24:1), se mezcló perfectamente y se centrifugó a 12000 rpm durante 2 minutos (Centrifuge 5415D, Eppendorf). Se removió cuidadosamente la fase acuosa y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml estéril, se adicionaron 800 µl de etanol absoluto frío (-20°C) y se incubó durante cinco minutos a -20°C. Se centrifugó cinco minutos a 12 000 rpm para precipitar el ADN y se lavó dos veces el precipitado con 300 µl de etanol al 70% frío (-20°C). Se decantó el sobrenadante conservando la pastilla y se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido este tiempo se resuspendió la muestra en 50 µl de H₂O_{dde}. Se verificó la integridad de los plásmidos en un gel de agarosa al 1% teñido con Sybr safe 1X (Invitrogen).

6.13. Secuenciación y análisis

La secuenciación de los plásmidos se realizó por el método de dideoxy (Sanger *et al.*, 1977), mediante el sistema comercial DNA Sequencing (BigDye v3.1 Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Applied Biosystems) a través de la empresa comercial Macrogen USA. Para la primera secuenciación se usó el juego de oligonucleótidos universales M13 entrando por los brazos del plásmido.

El análisis de las secuencias se llevó a cabo utilizando el programa en línea Basic Local Alignment Search Tool (Blast) para una identificación preliminar de las secuencias, el software Chromas-Pro y DNAsis para la edición y alineamiento de las mismas, y el banco de datos NCBI.

Para realizar el alineamiento clustal se utilizó el software en línea Clustal W y Transect del banco de datos EMBL Nucleotid Sequence Database.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización parcial del gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum*

Mediante el método de 3'RACE se aisló un fragmento del ADNc que codifica para una endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum* a partir de RNA de micelio inducido de 24 h con xilana como única fuente de carbono y ácido L-glutámico como fuente de nitrógeno. El fragmento de ADNc del transcrito denominado *Clebg*, tiene un tamaño de 1101 pb y un marco de lectura de 367 aminoácidos deducidos con un codón de paro (TAG) (Fig.5), un UTR en el extremo 3' de 118 pb y un poli(A) de 33 adeninas. La comparación con secuencias reportadas para β -(1,6)-galactanasas de hongos en las bases de datos del NCBI y EMBL mostró un 85% de similitud y 73% de identidad con la secuencia de aminoácidos reportada para *Glomerella graminicola* y un 80-81% de similitud y 66-71% de identidad para secuencias de aminoácidos reportadas para especies del género *Colletotrichum* (Cuadro 1).

```
VDWYSGDPTSTSWKWDVDTNQRDMLLKAKSRGANRFELFSNSP
MWWMTKNHNPSGSADGTENIQPWNLVNHAVYMATVAKYAKD
NWGITFESVEPFNEPSASWWTADGTQEGCHISVETQSTLIAALRT
EMNSRGLSNMSIAASDESYDQAVATFKGLGDAALKEVVKINV
HGYQYGNGARASLHELAAAGRGQRVWNSEYGENDATGERLVSN
MLLDFRWLQPQAWVYWQVLDGGGWVIDADNDAGTLGAANQ
KYFLLAQFARHIREAMRILDGGADNVVAAAYDEAKANLVIVAVN
GGSAQFFNFDLKGFSQAATDGANVPRWRTQIGSGARYVQAQDP
FVSGNKFWSYLETKMVQPLEVDNVKL
```

Figura 5. Secuencia de aminoácidos deducidos de un fragmento de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum*.

Cabe señalar que de las secuencias enlistadas en el Cuadro1, sólo para tres de ellas se ha reportado y caracterizado la secuencia de nucleótidos (*F. oxisporum*, *T. viride* y *N. crassa*). Dado que recientemente se ha reportado en bases de datos los genomas de *C. higginsianum*, *C. gloesporoides* y *G. graminicola* fue posible identificar dentro de estos la secuencia de nucleótidos que codifica a la endo- β -(1,6)-D-galactanasa. Los demás reportes corresponden únicamente a secuencias de aminoácidos deducidos.

Como era de esperarse, los porcentajes de similitud e identidad de *Clebg* comparado con las secuencias del gen dentro del mismo género, es mayor que los porcentajes que corresponden a otros géneros. Cabe señalar que el porcentaje de similitud del fragmento de *Clebg* con secuencias caracterizadas de *T. viride* y *N. crassa* (68 y 73% respectivamente) así como de identidad (53% y 62% respectivamente) son más altos en comparación a los porcentajes de similitud e identidad (21 y 12% respectivamente) de la secuencia caracterizada de *F. oxisporum*.

Cuadro 1. Similitud e identidad de secuencias de aminoácidos deducidos de endo-β-(1,6)-galactanasas con el fragmento aislado de *C. lindemuthianum*

ESPECIE		NO. AMINOÁCIDOS	SIMILITUD (%)	IDENTIDAD (%)	NO. DE ACCESO
<i>Glomerella graminicola</i>	Endo-beta-1,6-galactanasa	482	85	73	EFQ35891.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Endo-beta-galactanasa	431	80	71	ELA24383.1
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	Endo-beta-1,6-galactanasa	481	81	66	CCF37389.1
<i>Pyrenophora teres f. teres</i>	Proteína hipotética PTT_12518	480	75	63	XP_003301177.1
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Endo-beta-1,6-galactanasa	480	73	63	XP_001941255.1
<i>Podospora anserina</i>	Proteína Hipotética	487	74	63	XP_001904868.1
<i>Neurospora crassa</i>	Proteína hipotética	488	73	61	XP_958941.1
<i>Neurospora tetrasperma</i>	Proteína hipotética NEUTE1DRAF	488	73	62	EGO055303.1
<i>Talaromyces stipitatus</i>	Proteína hipotética conservada	487	75	61	XP_0023420391
<i>Penicillium marneffeii</i>	Proteína hipotética hipotética	519	75	53	XP_002148810.1
<i>Sordaria macrospora</i>	Proteína hipotética SMAC_06057	449	62	52	XP_003349362.1
<i>Trichoderma viride</i>	Endo-beta-1,6-galactanasa	456	68	53	AB104898.1
<i>Fusarium oxisporum</i>	Beta-1,6-galactanasa	421	21	12	BAF42338

El análisis de alineamiento *clustal* de las secuencias de aminoácidos deducidos de *C. gloeosporoides*, *G. graminicola*, *C. higginsianum* y el fragmento secuenciado de *C. lindemuthianum*, permitió la identificación de dominios conservados de acuerdo a la caracterización reportada para *T. viride* (Fig. 6). Como se puede observar, la secuencia de *C. gloeosporoides* muestra la carencia de dos regiones de aminoácidos en comparación con

las otras secuencias, presentando un total de 431 aminoácidos mientras que las otras secuencias poseen hasta 482 aminoácidos.

El análisis con el software en línea SignalP 4.1 Server permitió la predicción del péptido señal de las secuencias reportadas en bases de datos que corresponde a los primeros 18-21 aminoácidos de cada secuencia.

Cuatro de las cinco secuencias comparadas comparten el primero de los dos residuos de ácido glutámico (E) que se proponen como importantes dentro de los sitios catalíticos putativos de la familia 6 de las glicosil hidrolasas. Sin embargo, la secuencia de *C. gloesporoides* no cuenta con este residuo de ácido glutámico (E), debido a la carencia de la región. El segundo residuo de ácido glutámico (E) es conservado dentro de las cinco secuencias comparadas.

Con base en la caracterización de la endo- β -(1,6)-galactanasa de *T. viride* en la cual se señalan dos sitios putativos de N-glicosilación dentro de la secuencia, el alineamiento muestra que estas secuencias únicamente comparten un residuo de asparagina (N) en la primera región subrayada.

Finalmente, se observa que las secuencias analizadas muestran mayor similitud hacia el extremo amino y hacia la mitad de las mismas, mientras que la región carboxilo se muestra más variable así como la longitud de las secuencias.

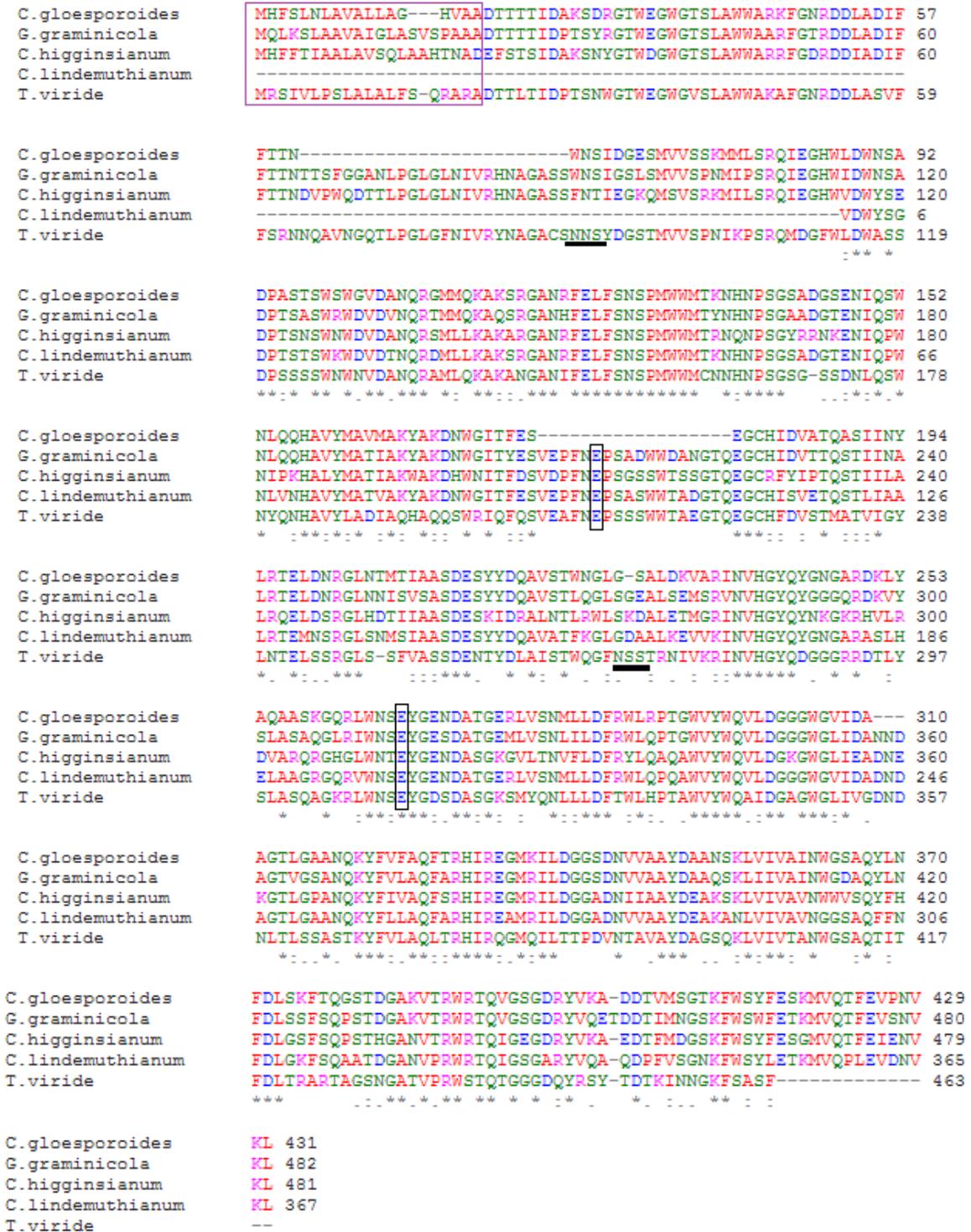


Fig. 6. Alineamiento *clustal* de la secuencias deducidas de aminoácidos de endo-β-(1,6)-galactanasa de *C. lindemuthianum*, *C. gloesporoides*, *G. graminicola*, *C. higginsianum*, y *T. viride*. Los aminoácidos subrayados en negro indican sitios de probables de N-glicosilación. En el recuadro morado se indican los residuos de aminoácidos que corresponden al péptido señal y en el recuadro en negro residuos de aminoácidos conservados para los sitios catalíticos putativos dentro de la familia 5 de las glicosil hidrolasas.

7.2. Análisis *in silico* de la proteína deducida del gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum*

Con la secuencia deducida de aminoácidos del gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum* se realizó la predicción de la estructura terciaria de la proteína por el modelo de homología y utilizando el software en línea Swiss-Model (Bardoli, 2009). Como templado se utilizó la proteína Man5A, una β -mananasa de *T. reesei* (PDB: 1qnoA), ya que es la proteína cristalizada de glicosil hidrolasas de la familia 5 (GH5) que se pudo usar, al no existir hasta ahora una endo- β -(1,6)-D-galactanasa cristalizada. En la figura 7A se muestra la predicción del modelo 3D de endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum*, así como la posición de los residuos Glu98 y Glu200 conservados para el sitio catalítico putativo de las glicosil hidrolasas GH5 (Fig.7B).

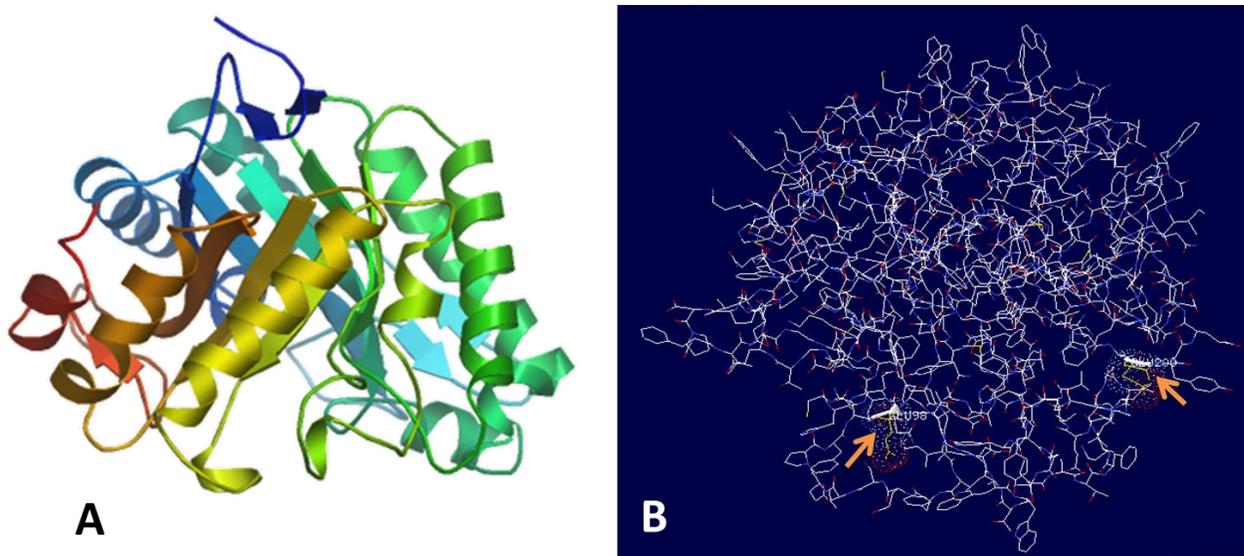


Figura 7. A. Estructura tridimensional de *Clebg* de *C. lindemuthianum*. B. Estructura tridimensional de *Clebg* con el software Swiss-PdbViewer 4.1.0. Las flechas indican los residuos Glu98 y Glu200, conservados para el sitio catalítico putativo de las glicosil hidrolasas GH5.

A continuación, se procedió a realizar la estimación de la calidad del modelo tridimensional predicho de la endo- β -galactanasa de *C. lindemuthianum*. Como se muestra en la figura 8 la mayoría de las interacciones de los aminoácidos se muestran en barras rojas, lo cual indica que la energía libre de las mismas es positiva y hay muy pocas interacciones con energía libre negativa, indicando que la estructura predicha es inestable y por lo tanto poco

probable que ocurra. A pesar de lo anterior, este resultado sugiere que la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum* pertenece a la familia GH5.

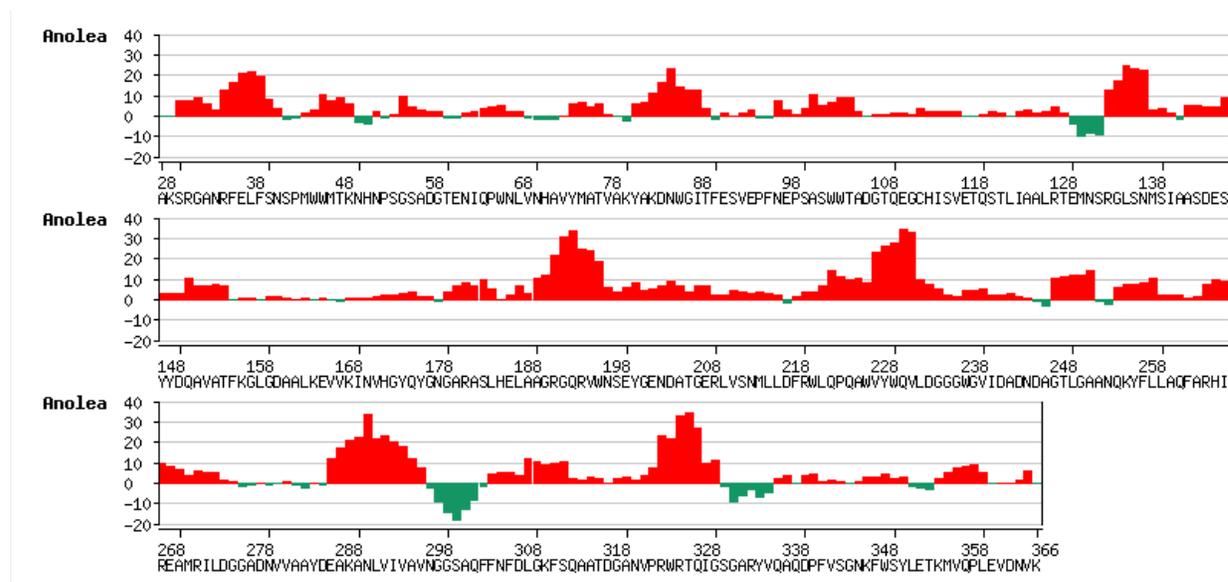


Figura 8. Estimación local de la calidad del modelo tridimensional predicho para *Clebg*.

7.3. Análisis de expresión por RT-PCR

Con el propósito de conocer cómo se expresa el gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa en respuesta a diferentes sustratos se realizaron ensayos de expresión por RT-PCR de micelio inducido con LWAG, xilana y pared celular a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 horas de inducción así como de micelio crecido con glucosa por 8 horas utilizando un par de oligonucleótidos específicos para *Clebg* (Gal-D y Gal-R) diseñados para amplificar un fragmento de 621 pb. Como control de carga utilizó un juego de oligonucleótidos para el gen constitutivo que codifica a la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GDPH), que amplifican un fragmento de 894 pb (Cuadro 2).

En la figura 9 se muestran los productos de amplificación obtenidos de micelio inducido con los tres sustratos probados, donde se observa una banda esperada de 621 pb correspondiente a un fragmento secuenciado de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa. Es relevante mencionar, que aun cuando el sustrato de la enzima es el arabinogalactano (LWAG), el fragmento de ADNc de 1101 pb de *Clebg* se aisló de micelio crecido con xilana como fuente de carbono, por lo tanto éste resultado confirma que el mensajero de *Clebg* se expresa en presencia de diferentes sustratos (Fig. 9).

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de amplificación por RT-PCR y qPCR.

	Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Fragmento esperado (pb)	Referencia
GPDH directo	CTK 052	5'CGG CCG TAT CGT CCT CCG TAA TGC 3'	55	894	(Kreuzinger, 1996)
GPDH reverso	CTK 032	5'GAG TAA CCG CAT TCG TTA TCG TAC C 3'	55	894	(Kreuzinger 1996)
Específico directo	GALD	5'GAC GGC ACC GAG AAC ATC CAG 3'	57	621	Diseñado para éste trabajo
Específico reverso	GALR	5' GCG CGA ACT GAG CAA GCA AAA AG 3'	57	621	Diseñado para éste trabajo
qPCR directo	Galq-D	5'GAC GGC GGT GGA TGG GGA GTT A 3'	59	137	Diseñado para éste trabajo
qPCR reverso	Galq-R	5'TCC GCA CCG CCG TCC AAG ATA C 3'	59	137	Diseñado para éste trabajo
GalRT	GalRT-D	5'CAG CCG TGG AAC CTT GTC A 3'	55	185	Diseñado para este trabajo
GalRT	GalRT-R	5'GCG ATA AGG GTG GAT TGT GTC T 3'	55	185	Diseñado para este trabajo
β-tubulina directo	BTub2-D	5'GAA TTC CCC GAC CGT ATG ATG 3'	57	94	Diseñado para éste trabajo
β-tubulina reverso	BTub2-R	5'CGG AGA GGG TGG CGT TGT A 3'	57	94	Diseñado para éste trabajo

Por otro lado, en los diferentes tiempos de inducción evaluados se detectó el transcrito de *Clebg*, excepto en el caso de inducción realizada con xilana por 48 horas; un resultado obtenido en cuatro repeticiones. Como se puede observar, la mayor concentración del transcrito se obtuvo en las primeras seis horas para los tres sustratos, a las dos horas en LWAG, a las seis horas en pared celular y desde las cero horas en xilana. Este resultado sugiere que la expresión del gen es mayor en las primeras horas de inducción con los sustratos, donde la xilana es el principal inductor seguido de LWAG. Sin embargo, a pesar de que estos datos nos proporcionan cierta información acerca de la expresión de la enzima, son cualitativos, por lo cual se realizó qPCR para corroborar estos resultados.

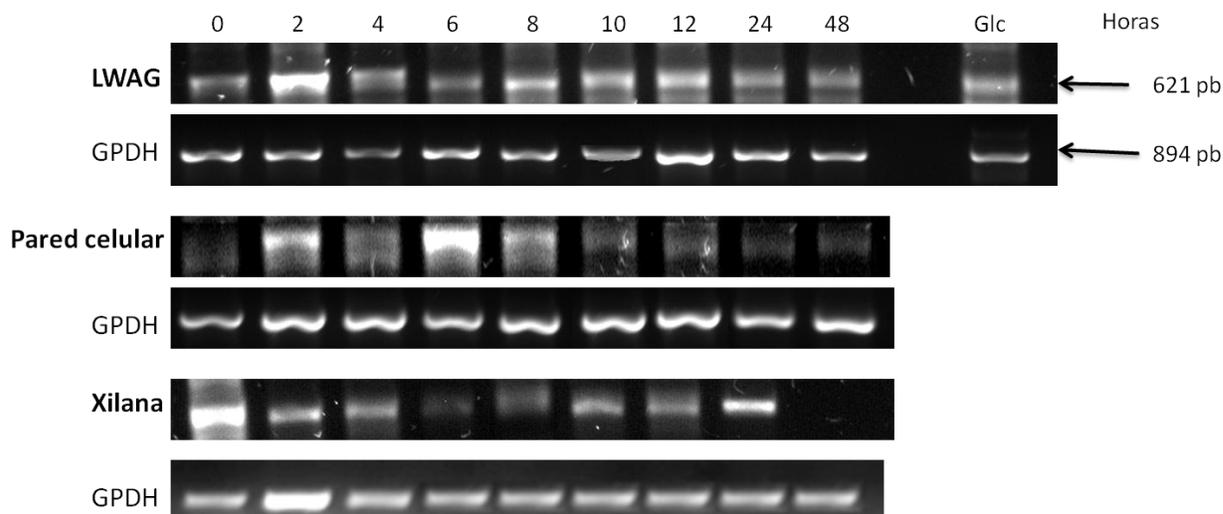


Figura 9. Análisis de expresión de la raza 1472 de *C. lindemuthianum* inducido con LWAG, pared celular ó xilana. Gel de agarosa al 1.2 % teñido con sybr safe 1X en TAE 1X. GPDH, gliceraldehido-3-fostato deshidrogenasa. A la derecha se indica con flechas los tamaños aproximados de los productos de amplificación.

De acuerdo a los resultados del análisis de expresión de *Clebg* por RT-PCR en la raza 1472, se decidió eliminar algunos tiempos en los que no se observaba un cambio sustancial en la concentración del transcrito para el análisis de expresión por qPCR, los tiempos seleccionados fueron los siguientes; 0, 2, 6, 12, 24 y 48 horas.

7.4. Expresión de *Clebg* por qPCR.

Se evaluaron juegos de oligonucleótidos específicos Galq (directo y reverso) y GalRT (directo y reverso) diseñados a partir del fragmento de ADNc de *Clebg* (Cuadro 2) en PCR de punto final para corroborar la presencia de un producto único de amplificación y establecer la temperatura óptima de alineamiento. Para el juego de oligos GalRT se observó más de un producto de amplificación a 57°C y a 59°C, mientras que para el juego de oligonucleótidos Galq se observó un solo producto a ambas temperaturas.

Una vez estandarizada la temperatura óptima de alineamiento para los oligonucleótidos en PCR de punto final se procedió a realizar la curva de validación para probar la eficiencia de los mismos en qPCR utilizando una concentración máxima de ADNc de 250 ng/μl y 4 diluciones adicionales 1:5 para los dos juegos de oligonucleótidos. Los resultados de la curva de validación mostraron que el juego de oligonucleótidos Galq amplifica un solo

producto a diferencia de lo observado en punto final, mientras que el juego de oligonucleótidos GalRT que en punto final mostraba un solo producto, en qPCR mostró dos productos. Con base en los resultados anteriores se eligió el juego de oligonucleótidos Galq a una temperatura de alineamiento de 59°C para realizar los siguientes experimentos. La curva de validación de los oligonucleótidos Galq tuvo una pendiente de -3.153, la R^2 de 0.96 y el porcentaje de eficiencia de 107% lo cual está dentro de los parámetros óptimos.

Una vez estandarizados los parámetros anteriores se procedió a evaluar la expresión de *Clebg* por qPCR en la raza patógena (1472) y en la raza no patógena (0) de *C. lindemuthianum*, cada uno de los resultados se obtuvo por triplicado en tres corridas independientes y para el procesamiento de los datos obtenidos se utilizó Excel.

De acuerdo a los resultados que se muestran en la figura 10, la expresión relativa de *Clebg* fue mayor en la raza 1472 que en la raza 0 para los tres sustratos probados. En la raza 0 inducida con xilana y LWAG, la expresión fue menor (3 y 4 veces respectivamente) que la detectada en la raza 1472 (6 y 7 veces respectivamente) (Fig. 10A y B). En la raza 1472 inducida con LWAG, el máximo incremento de expresión del transcrito (6 veces) se detectó hacia las 2 h (Fig. 9A), lo cual fue congruente con los resultados del análisis de expresión por RT-PCR (Fig. 9).

La expresión relativa del gen en la raza 1472 inducida con xilana, mostró valores significativamente mayores a los basales detectados glucosa, con un incremento desde las 0 h que alcanzó un máximo hacia las 6 h y disminuyó hasta los niveles basales hacia las 48 h (Fig. 10B) con un comportamiento “normal”. En la raza 0, la xilana indujo una moderada expresión de *Clebg* con niveles que fueron significativamente mayores a los basales detectados con glucosa, con una expresión máxima hacia las 2 h (3.5 veces) (Fig 10A). Por otro lado, la raza 0 con LWAG, mostró en general una expresión baja ligeramente superior a los niveles basales detectados con glucosa (Fig. 10B).

Expresión de *Clebg* por qPCR

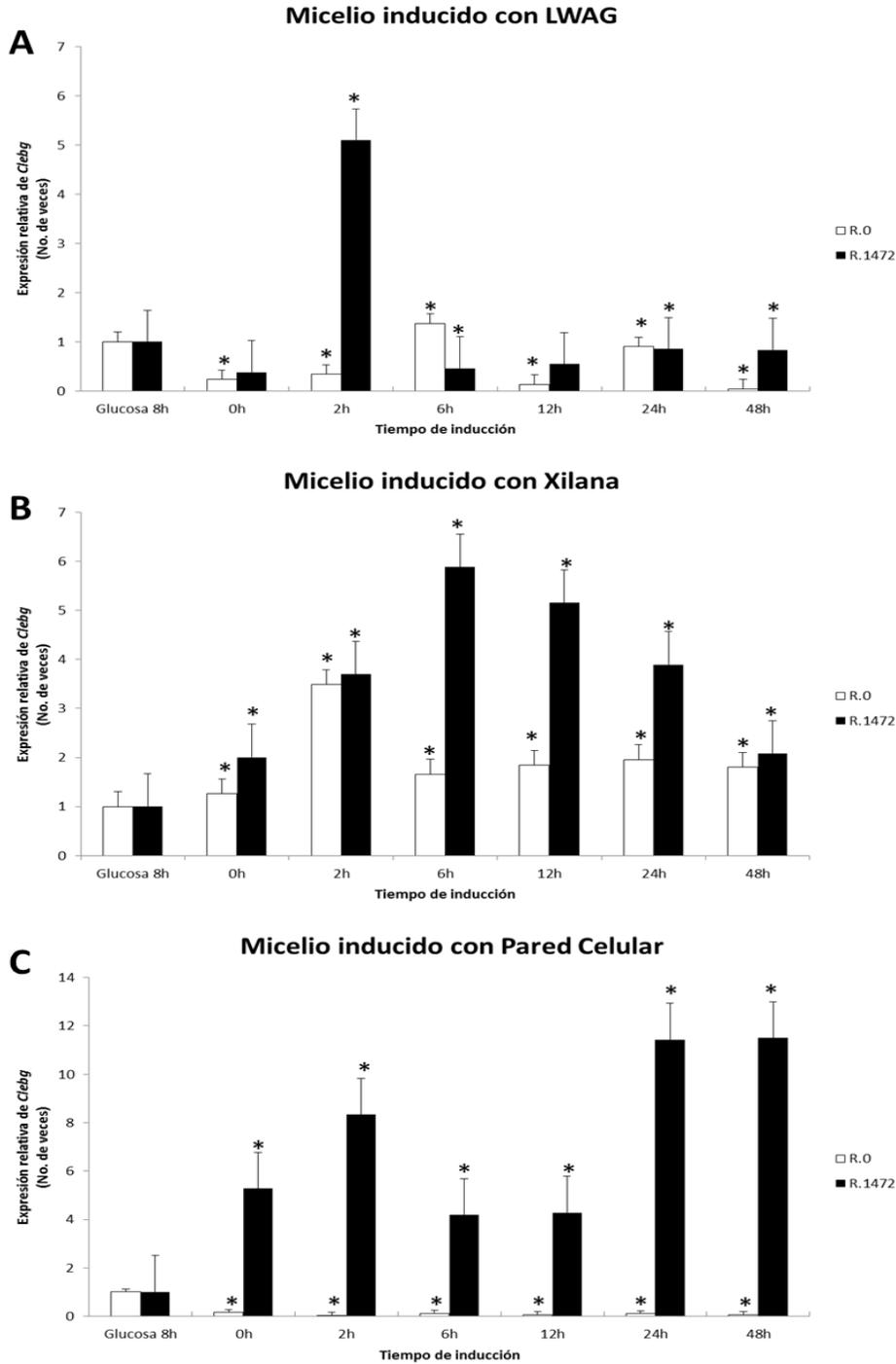


Figura 10. Cinética de expresión relativa de *Clebg* en la raza 0 y 1472 de *C. lindemuthianum*, por qPCR. A) Expresión relativa en medio de cultivo con LWAG. B) Expresión relativa en medio de cultivo con xilana. C) Expresión relativa en medio de cultivo con pared celular. Se utilizó β -tubulina como control endógeno en todas las condiciones. Las barras muestran la media de los valores de expresión por triplicado \pm el error estándar en tres experimentos independientes. El símbolo “*” indica la diferencia significativa ($P < 0.05$) en relación a la expresión relativa en medio con glucosa.

En micelio inducido con pared celular, los niveles de expresión en la raza 0 fueron similares a los basales detectados con glucosa, en tanto que en la raza 1472 la expresión de *Clebg* se incrementó hasta 12 veces hacia las 24 y 48 horas (Fig. 10C). Además, como se puede observar, la expresión incremento rápidamente desde las 0 h alcanzando un primer pico hacia las 2 h (10 veces), posteriormente hubo un descenso hacia niveles similares entre las 6 y 12 h (5 veces), y un segundo pico máximo de expresión entre las 24 y 48 h con los niveles de expresión más altos detectados para *Clebg* (12 veces) (Fig 10C).

Finalmente, en la figura 11 se muestra una gráfica donde se integran los resultados obtenidos en los sustratos probados en las razas patógena y no patógena los cuales se describieron con anterioridad.

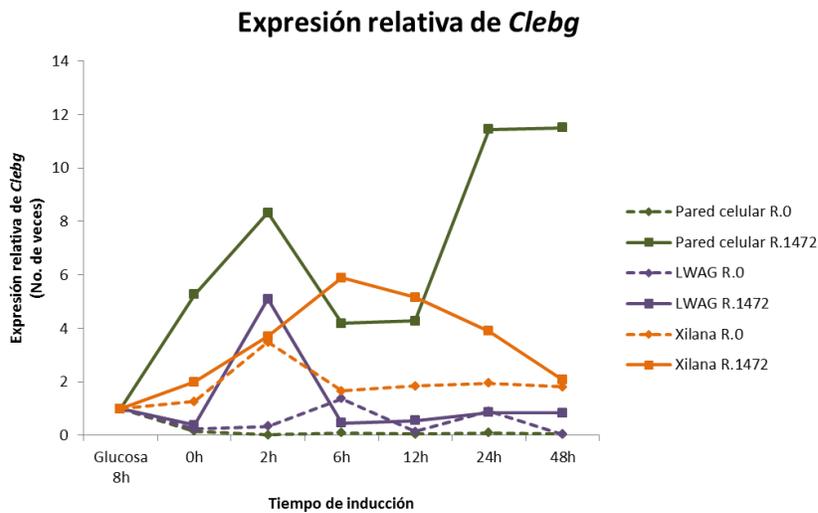


Figura 11. Expresión relativa de *Clebg* en medio de cultivo con pared celular, arabinogalactano (LWAG) y xilana.

8. DISCUSIÓN

8.1 Caracterización del ADNc que codifica una Endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum*

En el proceso de co-evolución resulta de una presión de selección recíproca ejercida por la planta y el patógeno, donde se han seleccionado en ambos organismos estrategias de defensa y colonización respectivamente (Geffroy, 1999). Los patógenos de plantas producen enzimas capaces de degradar los componentes de la pared celular ya que la despolimerización de sucesivas moléculas mediante la hidrólisis de uno u otro tipo de enlace representa una fuente de carbono directa para el patógeno. Los hongos frecuentemente secretan un grupo muy variado de hidrolasas, esta multiplicidad confiere flexibilidad, incrementando la eficiencia del complejo hidrolítico (Riou, 1991).

La pared celular se caracteriza por poseer polisacáridos altamente ramificados volviéndolos muy heterogéneos. Entre estos polisacáridos, los AGs son polímeros de arabinogalactano asociados a hemicelulosas o pectina, aunque es incierto el porcentaje en el que se encuentran debido a que el contenido es variable dependiendo de la especie y el tipo celular. Los AGs se encuentran también unidos a proteína y anclados a la membrana plasmática donde desempeñan funciones muy variadas (Burton, 2010, Seifert, 2007).

Aunque los AGs no son polisacáridos abundantes en la pared celular de las plantas, tanto hongos como bacterias producen un complejo de enzimas capaces de hidrolizarlos. Estas enzimas son la β -(1,3)-D-galactanasa, la β -(1,6)-D-galactanasa y la α -(1-5)-arabinofuranosidasa.

Existen varios reportes sobre la purificación y secuenciación de estas proteínas, así como de algunas secuencias de nucleótidos que las codifican. Particularmente, para las β -(1,6)-D-galactanasas, existen varias secuencias de aminoácidos deducidos reportadas en bases de datos tanto de hongos como de bacterias, pero solo hay tres secuencias de nucleótidos reportadas para hongos ascomicetos (*T. viride*, *F. oxysporum* y *N. crassa*) y una secuencia de nucleótidos para el actinomiceto (*Streptomyces avermitilis*) adicionalmente se cuenta con los reportes de los genomas de *C. higginsianum*, *C. gloesporoides* y *G. graminícola*, donde es posible identificar las secuencias de los genes putativos que codifican para la β -(1,6)-D-galactanasa. Sin embargo, el número de secuencias de nucleótidos en bases de datos es

mucho menor en comparación con las secuencias de aminoácidos deducidos disponibles (Kotake, 2004, Sakamoto, 2007, Hitomi, 2008, Takata, 2010).

De acuerdo al alineamiento clustal y a los porcentajes de similitud e identidad del fragmento secuenciado de *Clebg* (Cuadro 1, Fig. 6), se puede apreciar que las secuencias de aminoácidos deducidas son variables de acuerdo a su tamaño, la mayoría de las secuencias poseen alrededor de 480 aminoácidos, sin embargo hay secuencias más cortas como las de *F. oxisporum* y *C. gloesporoides* (421 y 431) así como más largas como la secuencia de *P. marneffeii* (519 aminoácidos) (Cuadro 1). Las secuencias que comparten mayores porcentajes de similitud e identidad con el fragmento secuenciado de *C. lindemuthianum* son, como es de esperarse, las que corresponden al mismo género, por lo anterior, es probable que la secuencia de nucleótidos completa de *Clebg* tenga una longitud similar a la de estas secuencias.

A pesar de que algunas de las secuencias enlistadas en el Cuadro 1 comparten porcentajes bajos de similitud e identidad, como es el caso de la secuencia de *F. oxisporum*, esta posee aminoácidos conservados, así como la conformación tridimensional típica en glicosil hidrolasas de la familia 5. Adicionalmente, se ha demostrado que el ADNc que codifica para una endo- β -(1,6)-galactanasa de *F. oxisporum* se transcribe y produce proteína nativa o recombinante que muestra actividad hidrolítica de LWAG (Sakamoto, 2007).

Por lo anterior, aunque los porcentajes de similitud e identidad de *Clebg* son moderados respecto a la mayoría de las secuencias reportadas para otros hongos, y bajo comparado con *F. oxisporum*, se puede considerar que la secuencia de *Clebg* de *C. lindemuthianum* corresponde al gen que codifica una endo- β -(1,6)-galactanasa putativa, que se clasifica entre las glicosil hidrolasas de la familia 5.

8.2 Análisis *in silico* de la proteína deducida del gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum*

La predicción de la estructura terciaria de la proteína deducida a partir del fragmento de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *C. lindemuthianum* resultó en un modelo inestable e improbable de que ocurra en la naturaleza. Esto se puede explicar como resultado de la utilización de una β -(1,5)-mananasa de *T. reesei*, como templado para la predicción de la estructura terciaria, debido a la carencia de una β -(1,6)-galactanasa cristalizada para realizar

un correcto alineamiento. Sin embargo, el análisis se realizó usando la β -(1,5)-mananasa porque pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 5, y ya se había usado en estudios anteriores para la predicción de estructura terciaria de las galactanasas de *T. viride* y de *F. oxisporum* (Kotake, 2004, Sakamoto, 2007).

Se esperaba que la baja calidad del modelo predicho hubiera sido causada por la utilización para el análisis de la secuencia incompleta del gen de la β -galactanasa de *C. lindemuthianum* (Fig. 8), por lo que se procedió a realizar el mismo análisis con las secuencias deducidas de aminoácidos de las galactanasas de *G. graminicola*, *C. gloesporoides* y *C. higginsiaunum*, sin embargo; se obtuvieron resultados similares a los del análisis con la secuencia de *Clebg*. Por lo anterior, se comprobó que es necesario contar con el templado de una galactanasa cristalizada para obtener la predicción de modelos estables.

Lo anterior sugiere que el tipo de sustrato es determinante en la conformación tridimensional de estas proteínas, ya que aunque pertenezcan a la misma familia y compartan ciertas similitudes en su estructura y en algunos residuos, las interacciones entre aminoácidos varían de acuerdo al sustrato que enfrentan y es gracias a esta diferencia que al evaluar la calidad del modelo predicho no se hayan obtenido resultados satisfactorios. Sin embargo, al analizar el alineamiento y la estructura secundaria entre la β -mananasa y la β -galactanasa, aunque no hay similitud evidente entre los residuos de aminoácidos, estos si forman en varios casos las mismas estructuras secundarias, por ejemplo, dos pequeñas láminas β en el extremo amino que en la estructura tridimensional forman una estructura en forma de fondo de barril, que es muy características de las glicosil hidrolasas de la familia 5 (Sabini, 2000). Con base en lo anterior, se corrobora que de manera similar a las β -(1,6)-galactanasas de *T. viride* y *F. oxisporum*, la galactanasa de *C. lindemuthianum* forma parte de las glicosil hidrolasas de la familia 5.

8.3 Expresión de *Clebg* en las razas patógena 1472 y no patógena 0 de *C. lindemuthianum* cultivado con diferentes sustratos

De acuerdo a los resultado mostrados en la figura 10, se puede observar que la expresión de *Clebg* en micelio de la raza patógena (1472) es diferente al de la raza no patógena (0) de *C. lindemuthianum*. Esta diferencia tan contrastante en el caso de la expresión en medio de

cultivo con pared celular vegetal, sugiere la función de *Clebg* como un factor de patogénesis que podría formar parte de los mecanismos que permiten a la raza patógena infectar a la planta. Se ha establecido con anterioridad que las AGPs tienen varias funciones y entre ellas se les ha relacionado con la respuesta de defensa en plantas (Seifert, 2007).

Aunque no se ha aclarado la función biológica que desempeñan las enzimas que degradan AGs y AGPs en la interacción del patógeno con la planta, es más probable que los AGs no representen una fuente muy rica de carbono, debido a que aunque se asocian con xilana y pectina, el contenido de los AGs es muy bajo en relación con los otros polisacáridos (Pauly, 2008). Las AGPs pertenecen a la familia de proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) y se sabe que la acumulación de proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) se ha relacionado con el mecanismo de defensa contra el ataque de patógenos. El incremento temprano de HRGPs es un prerrequisito para la protección eficiente de las plantas, esto se demostró en la interacción de *F. oxysporum* vs tomate, donde se encontraron bajas cantidades de HRGPs en plantas sanas y 96 a 120 horas después de la inoculación con el hongo, se enriqueció la cantidad de HRGPs como resultado del daño al tejido (Benhamou, 1989, Showalter, 2010). Debido a la alta acumulación de estas proteínas durante la interacción de la planta con el patógeno, es posible que éste último utilice las enzimas que degradan AGPs para hidrolizar el componente carbohidrato de las HRGPs y de esta manera evitar las respuestas de defensa en la planta. Esto resulta ser muy importante para un hongo en fase de infección biotrófica, ya que es indispensable evadir por distintas estrategias las respuestas de defensa de la planta, por ejemplo, desarrollando capas interfaciales ricas en carbohidratos y proteínas que separan las membranas del hongo y de la planta y/o suprimiendo activamente las respuestas de defensa del hospedero un largo tiempo (Mendgen, 2002, Münch, 2008).

Adicionalmente, se reportó que las AGPs podrían estar involucradas en la percepción de estímulos causantes de las respuestas de defensa donde el componente carbohidrato es fundamental para ésta o cualquier otra función de las AGPs ya que se demostró que si se degrada el componente carbohidrato es posible que las funciones de los AGPs queden inhabilitadas parcial o completamente, lo que supondría que la planta no reconozca al patógeno y no se dieran señales para que la defensa de la planta (Mashiguchi, 2008).

Las AGPs han sido categorizadas dentro de las proteínas de señalización de la pared celular, para lo cual se han propuesto algunos modelos de cómo podrían estar involucrados

en la comunicación y/o adhesión celular (Jamet, 2008, Showalter, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que algunas AGPs presentan un dominio conservado de seis residuos de cisteína denominado dominio PAC (prolina, AGP, cisteína) con una pequeña glicoproteína LAT52 que se ha reportado que interactúa con un receptor RLK (receptores de cinasas) llamado LePRK2. Se ha sugerido que el dominio PAC es el intermediario en la unión entre AGPs y RLKs y así mismo se plantea que RLKs y AGPs pueden ser el enlace entre la matriz de polisacáridos y la señalización celular (Seifert, 2007).

Los resultados de expresión de *Clebg* en la raza patógena 1472 y no patógena 0 de *C. lindemuthianum* en cultivo con pared celular vegetal como única fuente de carbono, sugieren que la β -(1,6)-D-galactanasa podría estar participando como factor de patogénesis al degradar los enlaces de las cadenas laterales de galactosa de AGPs involucrados en vías transducción de señales relacionados con la respuesta de defensa de la planta. Adicionalmente, algunos productos de degradación de la pared celular vegetal adicionales a los de degradación de xilana y LWAG parecen potenciar la inducción de la expresión de *Clebg* en la raza patógena 1472.

Se ha reportado que la hidrólisis de β -(1,6) galactanos de AGPs por la β -(1,6)-galactanasa es incrementada considerablemente por la acción coordinada con la α -(1,5)-arabinofuranosidasa. Si la actividad de estas incrementa cuando actúan coordinadamente, es posible que la expresión de sus genes se encuentre coordinada también. Este mismo trabajo demostró que la arabinofuranosidasa recombinante de *N. crassa* hidrolizó tanto α -(1,5)-arabinanos como arabinoxilanos mostrando un relativo amplio espectro de especificidad de sustrato hacia varios oligo y polisacáridos de la pared celular que contienen α -(1-5)-arabinofuranosil (Takata, 2010). Esto sugiere que la expresión del gen de la arabinofuranosida puede estar coordinada con la expresión de *Clebg* y es por eso que se encuentra una expresión mayor de este transcrito en micelio inducido con pared celular. Aunque en la xilana y la LWAG pueden contener residuos α -(1-5)-arabinofuranosil, es probable que la cantidad de estos no sea tan considerable como en la pared celular, y por ello se induce una baja o moderada expresión de *Clebg* con estos sustratos.

De manera similar a lo observado con enzimas del complejo lítico de *C. lindemuthianum*, como celulasas, pectín liasa y xilanas, (Acosta-Rodriguez, 2005, Lara-Marquez, 2011b) la expresión de *Clebg* en LWAG, xilana ó pared celular vegetal, mostró inducción de niveles

de expresión que se pueden detectar en las primeras horas y/o días. Aunque no se han hecho ensayos de actividad que nos permitan correlacionar los tiempos a los que encontramos el transcrito con la actividad de la proteína, en reportes previos de purificación de la β -(1,6)-galactanasa, donde se mide la actividad de la proteína nativa, se ha observado que la mayor actividad se tiene a las 48 horas para *F. oxisporum* y a las 50 horas para *A. niger*, pero la actividad es detectada desde las 0 horas y va incrementando lentamente (Brillouet, 1991, Lounteri, 2003).

9. CONCLUSIONES

- Se identificó un fragmento de 1101 pares de bases que corresponde a un transcrito con un marco de lectura de 367 aminoácidos que codifica a una endo- β -(1,6)-D-galactanasa putativa que pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 5.
- La comparación con bases de datos mostró 80-85% de similitud con las secuencias de aminoácidos de β -(1,6)-D-galactanasas reportadas para *Glomerella graminicola*, *Colletotrichum gloesporoides* y *Colletotrichum higginsianum*.
- La predicción de la estructura terciaria de endo- β -(1,6)-D-galactanasa basada en la proteína Man5A cristalizada no mostró interacciones estables.
- El gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa de *Colletotrichum lindemuthianum* presenta niveles basales de expresión en presencia de glucosa.
- La expresión del gen de en *Colletotrichum lindemuthianum* se induce en la raza patógena (1472) en cultivo con pared celular vegetal pero no en la raza no patógena (0) siendo este sustrato el mejor inductor de la expresión del gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa.
- La endo- β -(1,6)-D-galactanasa podría ser un factor de patogénesis de *Colletotrichum lindemuthianum*.

10. LITERATURA CITADA

- ACOSTA-RODRIGUEZ, I., C. PIÑÓN-ESCOBEDO, M. G. ZAVALA-PARAMO, E. LÓPEZ-ROMERO, H. CANO-CAMACHO. 2005. Degradation of cellulose by the bean-pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Production of extracellular cellulolytic enzymes by cellulose induction. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87, 301-10.
- BALARDIN, R. S., A. M. JAROSZ, AND J. D. KELLY 1997. Virulence and Molecular Diversity in *Colletotrichum lindemurhianum* from South, Central, and North America. *Phytopathology*, 87, 1184-1191.
- BARDOLI, L., F. KIEFER, K. ARNOLD, P. BENKERT, J. BATTEY AND T. SCHWEDE 2009. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *NATURE PROTOCOLS*, 4, 1-13.
- BAUER, S., PRASANNA VASU, STAFFAN PERSSON, ANDREW J. MORT, AND CHRIS R. SOMERVILLE 2006. Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *PNAS*, 103, 11417-11422.
- BENHAMOU, N., D. MAZAU AND M. T. ESQUERRÉ-TUGAYE 1989. Immunocytochemical Localization of Hydroxiprolin-rich Glycoproteins in Tomato Root Cells Infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*: Study of Compatible Interaction. *The American Phytopathological Society*, 80, 163-173.
- BRILLOUET, J.-M., PASCALE WILLIAMS, AND MICHEL MOUTOUNET 1991. Purification and Some Properties of a Novel Endo- β -(1-6)-D-galactanase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1565-1571.
- BURTON, R. J. A., M. J. GIDLEY AND 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology*, 6, 724-732.
- CARPITA, N., MAUREEN MCCANN, AND LAWRENCE R. GRIFFING 1996. The plant extracellular matrix: news from the cell's frontier. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 8, 1451-1463.
- CASSAB, G. I. 1998. Plant Cell Wall Proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 281-309.
- CLARKE, A. E., L. ANDERSON, AND B. A. STONE 1979. Form and Function of Arabinogalactans and Arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry*, 18, 521-540.
- COSGROVE, D. J. 2005. Growth of the Plant Cell Wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 850-861.
- DE VRIES, R. P., LUCIE PARENICOVÁ, SANDRA W. A. HINZ, HARRY C. M. KESTER, GERRIT BELDMAN, JACQUES A. E. BENEN AND JAAP VISSER 2002. The β -1,4-endogalactanase A gene from *Aspergillus niger* is specifically induced on arabinose and galacturonic acid and plays an important role in the degradation of pectic hairy regions. *Eur. J. Biochem.*, 269, 4985-4993.
- DEAN, R., J. A. L. VAN KAN, Z. A. PRETORIUS, K. E. HAMMOND-KOSACK, A. DI PIETRO, P. D. SPANU, J. J. RUDD, M. DICKMAN, R. KAHMANN, J. ELLIS AND G. D. FOSTER 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414-430.

- DIVON, H. H., AND ROBERT FLUHR 2007. Nutrition acquisition strategies during fungal Infections of plants. *FEMS Microbiol Lett*, XX, 1-10.
- DUFRESNE, M., SARAH PERFECT, ANNE-LAURE PELLIER, JOHN A. BAILEY, AND THIERRY LANGIN 2000. A GAL4-like Protein Is Involved in the Switch between Biotrophic and Necrotrophic Phases of the Infection Process of *Colletotrichum lindemuthianum* on Common Bean. *The Plant Cell*, 12, 1579-1589.
- ELLIS, M. J. E., CAROLYN J. SCHULTZ, AND ANTONY BACI 2010. Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface. *Plant Physiology*, 153, 403-419.
- FOREMAN, P. K., DOUG BROWN, LYDIA DANKMEYER, RALPH DEANS, STEPHEN DIENER, NIGEL S. DUNN-COLEMAN, FRITS GOEDEGEBUUR, THOMAS D. HOUFEK, GEORGE J. ENGLAND, AARON S. KALLEY, HENDRIK J. MEERMAN, THOMAS MITCHELL, COLIN MITCHINSON, HEATHER A. OLIVARES, PAULINE J. M. TEUNISSEN, JIAN YAO, AND MICHAEL WARD 2003. Transcriptional Regulation of Biomass-degrading Enzymes in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. *The journal of Biological Chemistry*, 278, 31988-31997.
- FRENCH, E. R. Y. T. T. H. 1982. Métodos de Investigación Fitopatológica. *I.I.I.A.*, 53.
- GASPAR, Y., KIM L. JOHNSON, JAMES A. MCKENNA, ANTHONY BACIC, AND CAROLYN J. SCHULTZ 2001. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology*, 47, 161-176.
- GEFFROY, V., D. SICARD, J. C. F. DE OLIVEIRA, M. SÉVIGNAC, S. COHEN, P. GEPTS, C. NEEMA, T. LANGIN, AND M. DRON. 1999. Identification of an Ancestral Resistance Gene Cluster involved in the Coevolution Process Between *Phaseolus vulgaris* and its Fungal Pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 774-784.
- GONZÁLEZ, M., RAUL RODRÍGUEZ, MARIA ELENA ZAVALA, JUAN L. JACOBO, FERNANDO HERNÁNDEZ, JORGE ACOSTA, OCTAVIO MARTÍNEZ, AND JUNE SIMPSON 1998. Characterization of Mexican Isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by Using Differential Cultivars and Molecular Markers. *Phytopathology*, 88, 292-299.
- HARHOLT, J., ANONGPAT SUTTANGKAKUL, AND HENRK VIBE SCHELLER 2010. Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiology*, 153, 384-395.
- HITOMI, I., TOSHIHISA KOTAKE, YOICHI TSUMARAYA, AND SATOSHI KANEKO 2008. Characterization of an Endo- β -1,6-Galactanase from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2379-2383.
- ICHINOSE, H., KOTAKE T., TSUMARAYA Y., AND KANEKO S. 2006a. Characterization of an Exo- β -1,3-D-galactanase from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893 Acting on Arabinogalactan-Proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2745-2750.
- IDNURM, A. & HOWLETT, B. J. 2001. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*, 2, 241-255.
- JAMET, E., C. ALBENNE, G. BOUDART, M. IRSHAD, H. CANUT, R. PONT-LEZICA 2008. Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics*, 8, 893-908.

- JAMET, E., H. CANUT, GEORGES BOUDART AND R. PONT-LEZICA 2006. Cell wall proteomics: a new insight through proteomics. *TRENDS in Plant Science*, 11, 33-39.
- KEEGSTRA, K. 2010. Plant cell walls. *Plant Physiology*, 154, 483-486.
- KOHORN, B. D. 2000. Plasma Membrane-Cell Wall Contacts. *Plant Physiology*, 124, 31-38.
- KOTAKE, T., SATOSHI KANEKO, AYA KUBOMOTO, MD. ASHRAFUL HAQUE, HIDEYUKI KOBAYASHI, AND YOICHI TSUMARAYA 2004. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Trichoderma viride* endo- β -(1-6)-galactanase gene. *Biochem. J.*, 377, 749-755.
- KREUZINGER, N., RENATE PODEU, FRANZ GRUBER, FRIEDERIKE GÖBL, AND CHRISTIAN P. KUBICEK 1996. Identification of Some Ectomycorrhizal Basidiomycetes by PCR Amplification of their *gpd* (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3432-3438.
- KUBICEK, C. P. 2013. *Fungi and Lignocellulosic Biomass*, WILEY-BLACKWELL.
- LARA-MARQUEZ, A., M.G. ZAVALA-PÁRAMO, E. LÓPEZ-ROMERO, H. CANO CAMACHO 2011a. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. *Biotechnol Lett*, 33, 859-868.
- LARA-MARQUEZ, A., M.G. ZAVALA-PARAMO, E. LÓPEZ-ROMERO, N. CALDERÓN-CORTES, R. LÓPEZ-GÓMEZ, U. CONEJO-SAUCEDO, H. CANO-CAMACHO. 2011b. Cloning and characterization of a pectin lyase gene from *Colletotrichum lindemuthianum* and comparative phylogenetic/structural analyses with genes from phytopathogenic and saprophytic/opportunistic microorganisms. *BMC Microbiol*, 11, 260.
- LOUNTERI, E., CHRISTIANE LAINE, SANNA UUSITALO, ANITA TELEMAN, MATTI SIIKA-AHO, AND MAIJA TENKENEN 2003. Purification and characterization of *Aspergillus* β -D-galactanases acting on β -1,4- and β -1,3/6-linked arabinogalactans. *Carbohydrate Polymers*, 53, 155-168.
- MASHIGUCHI, K., E. URAKAMI, M. HASEGAWA, K. SANMIYA, I. MATSUMOTO, I. YAMAGUCHI, T. ASAMI, AND Y. SUZUKI 2008. Defense-Related Signaling by Interaction of Arabinogalactan Proteins and β -Glucosyl Yariv Reagent Inhibits Gibberellin Signaling in Barley Aleurone Cells. *Plant Cell Physiol.*, 49, 178-190.
- MAU, S.-L., CHAO-GUANG CHEN., ZHAO-YAN PU, ROBERT L. MORITZ, RICHARD J. SIMPSON, ANTONY BACIC, AND ADRIENNE E. CLARKE 1995. Molecular cloning of cDNAs encoding the protein backbones of arabinogalactan-proteins from the filtrate of suspension-cultured cells of *Pyrus communis* and *Nicotina glauca*. *The Plant Journal*, 8, 269-281.
- MENDGEN, K., AND MATTHIAS HAHN 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*, 7, 352-356.
- MÜNCH, S., ULRIKE LINGNER, DANIELA S. FLOSS, NANCY LUDWIG, NORBERT SAUER, HOLGER B. DESING 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology*, 165, 41-51.
- O'CONNELL, R. J., J. A. BAILEY, AND D. V. RICHMOND 1985. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology*, 27, 75-98.

- OKEMOTO, K., TAKAMASA UEKITA, YOICHI TSUMARAYA, YOHICHI HASHIMOTO, AND TAKESHI KASAMA 2003. Purification and characterization of an endo- β -(1-6)-galactanase from *Trichoderma viride*. *Carbohydrate Research*, 338, 219-230.
- P. DE VRIES, R., AND JAAP VISSER 2001. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 497-522.
- PASTOR-CORRALES, M. A., AND OSCAR A. ERAZO 1994. Inheritance of Anthracnose Resistance in Common Bean Accession G 2333. *Plant Disease*, 78, 959-962.
- PAULY, M., AND KENNETH KEEGSTRA 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal*, 54, 559-568.
- PÉREZ ALMEIDA, I., AND NICHOLAS C. CARPITA 2006. Las β -Galactosidasas y la dinámica de la Pared Celular. *Revista de Ciencia y Tecnología de América*, 31, 476-483.
- PERFECT, S. E., AND JONATHAN R. GREEN 2001. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal. *Molecular Plant Pathology*, 2, 101-108.
- PERFECT, S. E., H. BLEDDYN HUGES, RICHARD J. O'CONNELL, AND JONATHAN R. GREEN 1999. *Colletotrichum*: A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal-Plant Interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 27, 186-198.
- RAWLINGS, S. L., R. J. O'CONNELL, J. R. GREEN 2007. The spore coat of the bean anthracnose fungus *Colletotrichum lindemuthianum* is required for adhesion, appressorium development and pathogenicity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70, 110-119.
- RIOU, C., GEORGES FREYSSINET, AND MICHEL FEVRE 1991. Production of Cell Wall-Degrading Enzymes by the Phytopathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1478-1484.
- RODRÍGUEZ-GUERRA, R., J. A. ACOSTA-GALLEGOS, M. M. GONZÁLEZ-CHAVIRA Y J. SIMPSON 2006. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de frijol. *Agricultura Técnica en México*, 32, 101-114.
- SABINI, E., HEIDI SCHUBERT, GARIB MURSHUDOV, KEITH S. WILSON, MATTI SIIKA-AHO, AND MERJA PENTTILA 2000. The three-dimensional structure of a *Trichoderma reesei* β -mannanase from glycoside hydrolase family 5. *Acta Cryst.*, 56, 3-13.
- SAKAMOTO, T., TANIGUCHI Y., SUZUKI S., IHARA H., AND KAWASAKI H. 2007. Characterization of *Fusarium oxisporum* β -1,6-Galactanase, an Enzyme That hydrolyzes Larch Wood Arabinogalactan. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3109-3112.
- SAMBROOK, J., AND D. W. RUSSEL. 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Third edition. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*.
- SHELLER, H. V., AND PETER ULVSKOV 2010. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61, 263-289.
- SEIFERT, G. J., AND KEITH ROBERTS. 2007. The Biology of Arabinogalactan Proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58.

- SHOWALTER, A. M. 1993. Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins. *The Plant Cell*, 5, 9-23.
- SHOWALTER, A. M. 2001. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 1399-1417.
- SHOWALTER, A. M., B. KEPPLER, J. LICHTENBERG, D. GU, AND L. R. WELCH 2010. A Bioinformatics Approach to the Identification, Classification, and Analysis of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins. *Plant Physiology*, 153, 485-513.
- SOMERVILLE, C., STEFAN BAUER, GINGER BRININSTOOL, MICHAELLE FACETTE, THORSTEN HAMMANN, JENNIFER MILNE, ERIN OSBORNE, ALEX PAREDEZ, STAFFAN PERSSON, TED RAAB, SONJA VORWERK, AND HEATHER YOUNGS 2004. Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls *Science*, 306, 2206-2211.
- STEMMER, W. P. C. 1991. A 20-minute ethidium bromide/high-salt extraction protocol for plasmid DNA. *BioTechniques*, 10, 726.
- SUGIYAMA, J. 1998. relatedness, phylogeny, and evolution of the fungi. *Mycoscience*, 39, 487-511.
- TAKATA, R., KEITA TOKITA, SATOKO MORI, RYOHEI SHIMODA, NAOKI HARADA, HITOMI ICHINOSE, SATOSHI KANEKO, KIYOHICO IGARASHI, MASAHIRO SAMEJIMA, OICHI TSUMARAYA, TOSHIHISA KOTAKE 2010. Degradation of carbohydrate moieties of arabinogalactan-proteins by glycoside hydrolases from *Neurospora crassa*. *Carbohydrate Research*, 345, 2516-2522.
- TIAN, C., WILLIAM T. BEESON, ANTHONY T. LAVARONE, JIANPING SUN, MICHAEL A. MARLETTA, JAMIE H. D. CATE, AND N. LOUISE GLASS. 2009. Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *PNAS*, 106, 22157-22162.
- TSUMARAYA, Y., NOBUYOSHI MOCHIZUKI, YOHICHI HASHIMOTO, AND PAVOL KOVAC 1990. Purification of an Exo- β -(1-3)-D-galactanase of *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) and Its Action Arabinogalactans-proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 7207-7215.
- VORWERK, S., SHAUNA SOMERVILLE, AND CHRIS SOMERVILLE 2004. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *TRENDS in Plant Science*, 9, 203-209.
- WIJESUNDERA, R. L. C., J. A. BAILEY, R. J. W. BYRDE, AND A. H. FIELDING 1989. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 34, 403-413.