



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



**CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Tesis

**ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN DE CELOBRIOHIDROLASA
II DE *Colletotrichum lindemuthianum***

Que presenta:

Biol. Ma. Irene Morelos Martínez

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

ASESOR: DR. HORACIO CANO CAMACHO

CO-ASESORA: DRA. MARÍA GUADALUPE ZAVALA PÁRAMO



Morelia, Michoacán. Febrero de 2020

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	5
2.1.1 Diversidad patotípica de <i>C. lindemuthianum</i>	5
2.1.2 Proceso de infección de <i>C. lindemuthianum</i>	6
2.1.3 Efectores y sistema inmune de la planta.....	8
2.2 Estructura de la pared celular vegetal.....	9
2.2.1 Celulosa	10
2.2.2 Biosíntesis de la celulosa	11
2.2.3 Degradación enzimática de la celulosa	12
2.2.4 Características de la celobiohidrolasa II.....	14
2.2.5 Celobiohidrolasas caracterizadas y antecedentes más relacionados.....	15
2.2.6 Importancia biotecnológica de las CBHII.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS.....	19
5.1 General	19
5.2 Específicos.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1 Material biológico	20
6.2 Medios de cultivo.....	20
6.2.1 Medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y Papa-Dextrosa (PD)	20
6.2.2 Medio Mathur modificado	20
6.3 Inducción de micelio	21
6.4 Extracción de ADN genómico	21
6.5 Extracción de ARN total	22
6.6 Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	22
6.7 Amplificación del gen <i>cbhII</i> por PCR de punto final.....	23
6.8 Clonación	24
6.8.1 Ligación del fragmento de ADN amplificado a un vector	24
6.8.2 Transformación de células <i>E. coli</i> quimiocompetentes.....	24
6.8.3 Purificación de plásmidos a gran escala.....	25

6.8.4 Digestión enzimática	25
6.8.5 Limpieza de plásmidos	26
6.9 Secuenciación del ADN y análisis de secuencias	26
6.10 Modelaje tridimensional	26
6.11 Perfiles de transcripción de <i>cbhII</i> por Qpcr	27
6.12 Análisis filogenético de la CBHII.....	28
7. RESULTADOS.....	29
7.1 Extracción de ADN genómico	29
7.2 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc	29
7.3 Amplificación del gen <i>cbhII</i> por PCR de punto final.....	30
7.4 Análisis de secuencias.....	31
7.5 Modelaje 3D de la CBHII	36
7.6 Perfil de transcripción de <i>cbhII</i> por qPCR.....	36
7.7 Análisis filogenético de la CBHII.....	38
8. DISCUSIÓN	41
9. CONCLUSIONES	46
10. LITERATURA CITADA	47

RESUMEN

Colletotrichum lindemuthianum es un ascomiceto patógeno de *Phaseolus vulgaris*. Este hongo emplea un arsenal de enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular vegetal para la obtención de una fuente de carbono. La celulosa es uno de los principales componentes de la pared celular vegetal y entre las enzimas que participan en la degradación de este polisacárido está la celobiohidrolasa II (CBHII), que produce celobiosa como producto final. En este trabajo se realizó el aislamiento y caracterización molecular-bioinformática del gen *cbhII* de la raza patógena 1472 y de la raza no patógena 0 de *C. lindemuthianum*. El gen *cbhII* que codifica para una celobiohidrolasa II, es 100% idéntico entre ambas razas del hongo y en las especies del género *Colletotrichum* se presenta un solo gen de *cbhII*. Las CBHII de las especies del género *Colletotrichum* muestran alta similitud e identidad y contienen dominios muy conservados como el módulo de unión a carbohidrato entre los residuos, secuencia del linker, dominio catalítico con los dos residuos de aspartato involucrados en la catálisis y un residuo de tirosina que participa en la configuración del anillo de glucosa para hacerla más susceptible a la reacción catalítica. La estructura 3D de la CBHII de *C. lindemuthianum*, mostró la topología β -barril con siete β -láminas con la topología del barril TIM modificado característico de la familia GH6. El solapamiento de la estructura 3D de CBHII de *C. lindemuthianum* y la proteína cristalizada de *T. reesei*, mostró una alta similitud en el plegamiento y la posición de los dos residuos D²²¹ y D¹⁷⁵ en el sitio catalítico dentro del túnel del barril. Ambas razas de *C. lindemuthianum* presentan un perfil de transcripción basal de *cbhII*, en cultivo con glucosa, congruente con represión catabólica y un perfil de transcripción de *cbhII* diferencial y en cultivo con pared celular vegetal de *P. vulgaris*. La raza patógena muestra una elevada transcripción de *cbhII*, mientras que en la raza no patógena se observan niveles bajos (celulosa) o basales (pared celular). El análisis filogenético de CBHII de especies del género *Colletotrichum*, mostró la presencia de tres clados o linajes sin eventos de duplicación genética. La estructura 3D entre los linajes de CBHII de especies de *Colletotrichum* es altamente conservada.

Palabras clave: fitopatógenos, *cbhII*, expresión, bioinformática y biotecnología.

ABSTRACT

Colletotrichum lindemuthianum is a pathogenic ascomycete of *Phaseolus vulgaris*. This fungus uses an arsenal of enzymes that degrade polysaccharides from the plant cell wall to obtain a carbon source. Cellulose is one of the main components of the plant cell wall and among the enzymes involved in the degradation of this polysaccharide is cellobiohydrolase II (CBHII), which produces cellobiose as the final product. In this work the isolation and molecular-bioinformatic characterization of the *cbhII* gene of pathogenic races 1472 and non-pathogenic 0 of *C. lindemuthianum* was performed. The *cbhII* gene that codes for a cellobiohydrolase II is 100% identical between both races of the fungus. The species of the genus *Colletotrichum* have a single *cbhII* gene. CBHII of the species of the genus *Colletotrichum* show high similarity and identity and contain highly conserved domains; carbohydrate binding module between the residues, linker sequence, catalytic domain with the two aspartate residues involved in catalysis and a tyrosine residue that participates in the configuration of the glucose ring to make it more susceptible to the catalytic reaction. The 3D structure of the CBHII of *C. lindemuthianum*, showed the β -barrel topology with seven β -sheets with the modified TIM barrel topology characteristic of the GH6 family. The overlapping of the CBHII 3D structure of *C. lindemuthianum* and the crystallized protein of *T. reesei*, showed a high similarity in the folding and position of the two residues D²²¹ and D¹⁷⁵ at the catalytic site within the barrel tunnel. Both races of *C. lindemuthianum* have a basal transcription profile of *cbhII*, in glucose culture, congruent with catabolic repression and a differential transcription profile of *cbhII*, in culture with plant cell wall of *P. vulgaris*. The pathogenic race shows high transcription of *cbhII*, while in the non-pathogenic race low (cellulose) or basal (plant cell wall) levels are observed. The phylogenetic analysis of CBHII of species of the genus *Colletotrichum*, showed the presence of three clades or lineages without genetic duplication events. The 3D structure between the CBHII lineages of *Colletotrichum* species is highly conserved.

1. INTRODUCCIÓN

Colletotrichum lindemuthianum, es un hongo filamentoso ascomiceto, patógeno de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en el que provoca la enfermedad conocida como antracnosis. Este fitopatógeno posee un estilo de vida hemibiótrofo, es decir, incluye una fase biotrófica seguida de una fase necrotrófica durante la cual emplea un arsenal de enzimas que le ayudan a despolimerizar la pared celular vegetal del hospedero y obtener una fuente nutricional (Perfect, *et al.*, 1999). La celulosa, es uno de los principales polímeros que componen la pared celular vegetal y está conformada de cadenas lineales de moléculas de β -D-glucopiranosas unidas por enlaces glicosídicos β -(1,4). Algunas de las enzimas clave para la degradación de la celulosa pertenecen a las familias 5, 6, 7, 12 y 45 de las glicosil hidrolasas y son reconocidas también como celulasas (Yang, *et al.*, 2011; Kubicek, *et al.*, 2014). Una de las enzimas clave en la degradación de regiones cristalinas de celulosa es la Celobiohidrolasa II (BHII), la cual es una $\text{exo-}\beta$ -1,4-glucanasa que hidroliza enlaces en el extremo no reductor de la celulosa produciendo celobiosa (Illmén *et al.*, 2011; Horn *et al.*, 2012). A principio de los setentas, la investigación en celulasas aumentó drásticamente, debido a la idea de utilizar celulosa para la producción de etanol como una alternativa de combustible (Kubicek, 2013b).

Actualmente, las aplicaciones biotecnológicas de dichas enzimas han tenido mucho auge, algunos ejemplos donde se han utilizado industrialmente es en el blanqueamiento del papel y en la obtención de bioetanol como combustible sustituto de la gasolina (Martínez-Anaya *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2011). Debido a la importancia biotecnológica de las celulasas, la CBHII ha sido caracterizada bioquímica y molecularmente en algunos hongos y bacterias. En este sentido, se reportó la producción de enzimas celulolíticas extracelulares por *C. lindemuthianum* raza 1472, crecido bajo diferentes condiciones de cultivo, así como el aislamiento del ADNc parcial que codifica a una CBHII, cuya secuencia mostró mayor similitud con genes de *Trichoderma* que con los de *Colletotrichum*, sugiriendo una transferencia (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2005). Por otro lado, a partir de ADN genómico purificado de micelio de *C. lindemuthianum* raza 1472, se clonó y secuenció un fragmento del gen *cbhII* que mostró 98% de identidad y 99% de similitud con el gen correspondiente de *C. orbiculare* (Morelos-Martínez, 2016). Sin

embargo, una caracterización que brinde mayor información sobre la CBHII de *C. lindemuthianum*, requiere del aislamiento del gen completo y su caracterización molecular, bioinformática y filogenética.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Colletotrichum lindemuthianum*

C. lindemuthianum (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara 1889, es una especie que se ha clasificado taxonómicamente en el reino de los Hongos, subreino Dikarya, filo Ascomycota, subdivisión Pezizomycotina, clase Sordariomycetes, orden Glomerellales, familia Glomerellaceae, género *Colletotrichum*, como se reporta por la base de datos mycobank (<http://www.mycobank.org/>). Este hongo es un patógeno de gran importancia económica debido a que es el agente causal de la enfermedad de la antracnosis en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), provocando grandes pérdidas económicas en los principales países productores de frijol (Sugiyama, 1998; Roca & Mendes-Costa, 2003). *C. lindemuthianum* es una de las principales especies que posicionan al género *Colletotrichum* dentro del top 10 de los patógenos de plantas más importantes (Dean, *et al.*, 2012).

Se ha reportado que *C. lindemuthianum* no presenta reproducción sexual en condiciones naturales, sin embargo, bajo condiciones de laboratorio se ha inducido la generación de estructuras de reproducción sexual. A esta fase donde el hongo logra reproducirse sexualmente se le ha identificado taxonómicamente como *Glomerella lindemuthiana* (Rodríguez-Guerra, *et al.*, 2005).

2.1.1 Diversidad patotípica de *C. lindemuthianum*

C. lindemuthianum es un hongo con gran diversidad patogénica. Hasta el 2006 se identificaron alrededor de 100 patotipos en todo el mundo (Rodríguez-Guerra, *et al.*, 2006). En México se ha reportado una gran diversidad patogénica de *C. lindemuthianum* (Balardin, *et al.*, 1997) y se han colectado 59 aislados de los estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas, Jalisco y Michoacán. A partir de cultivares diferenciales de frijol y estrategias moleculares (AFLP y RAPD), el análisis de los 59 aislados de *C. lindemuthianum* obtenidos de dos regiones geográficas de México, en las cuales el frijol se cultiva bajo diferentes condiciones, permitió la identificación de 10 patotipos, destacando una raza no patógena (saprófita) o raza 0, aislada de los Estados de Jalisco y Michoacán; la raza patógena 1088 aislada en Durango; y una raza con mayor

patogenicidad originalmente caracterizada como raza 1472 por Balardin, *et al.*, (1997) proveniente del Estado de Zacatecas (González, *et al.*, 1998). En el 2009 se realizó otro estudio en los estados de San Luis Potosí y Oaxaca, para los cuales, donde se logró identificar también los patotipos: 69, 100, 260, 324, 325, 356, y 485. Sin embargo, con las corroboraciones de patotipos anteriormente reportados y los nuevos identificados, se menciona que hasta el 2009 en México se habían identificado 56 patotipos (Sánchez-García, *et al.*, 2009).

2.1.2 Proceso de infección de *C. lindemuthianum*

El proceso de infección de *C. lindemuthianum* es similar al de otras especies del género (Diéguez-Uribeondo. *et al.*, 2005). Este proceso inicia con la adhesión de esporas a una superficie hidrofóbica del hospedero. Se ha encontrado evidencia de que dichas esporas contienen una capa especializada compuesta de glicoproteínas que ayuda principalmente a que éstas se adhieran a la superficie hidrofóbica de la planta. Posteriormente, ocurre la germinación para dar lugar a tubos germinativos y después a una estructura de infección especializada conocida como apresorio, el cual se encuentra rodeado de una matriz extracelular de glicoproteínas y una capa de melanina, además de contener una alta concentración de glicerol en su interior (Perfect *et al.* 1999; Rawlings *et al.*, 2007).

Esta estructura se desarrolla en respuesta a señales desencadenadas por la topografía de la superficie vegetal, como los poros estomales, señales químicas vegetales, ceras de la epicutícula, señales físicas como hidrofobicidad y tigmotropismo (Roberson, *et al.*, 2010; Riquelme & Sánchez-León, 2014). El apresorio funciona como una estructura mecánica de penetración de la cutícula y la pared celular del hospedero, empleando una punta de hifa muy delgada que surge por una presión turgente, resultado de la resistencia de la capa melanizada y la presión de la alta concentración del glicerol dentro de la estructura (Fig. 1A) (Bechinger, *et al.*, 1999). Una vez que la punta de la hifa logra instalarse intracelularmente, inicia una fase llamada biotrófica, donde se forma un complejo interfacial biotrófico (BIC) que parece estar en la punta de la hifa, pero no pertenece al hongo si no que es de origen vegetal y puede funcionar para translocar el conjunto de proteínas conocidas como efectores dentro del hospedero para manipular su

metabolismo y pasar desapercibido (Presti, *et al.*, 2015). También esta punta de hifa permite la formación de una vesícula de infección, posteriormente se desarrollan hifas primarias que invaden células adyacentes, sin provocar muerte celular debido a que tanto la vesícula de infección como las estas hifas primarias se encuentran rodeadas por una matriz interfacial que las separa de la membrana plasmática del hospedero y siguen contando con la presencia de BIC (Perfect & Green, 2001). Una vez que las hifas primarias invaden una región considerable, inicia la fase necrotrófica, en la que hay muerte celular debido a que se desarrollan hifas secundarias que secretan enzimas que hidrolizan los componentes de la pared celular penetrando los protoplastos y provocando la muerte de la célula (Mendgen & Hahn, 2002; Perfect *et al.*, 1999) (Fig. 1B).

En algunos hongos ascomicetos y basidiomicetos se ha encontrado una estructura especializada en la punta de la hifa conocida como Spitzenkörper la cual es una estructura esferoide densa compuesta de diferentes capas de macro y microvesículas, ribosomas, quitosomas, microtúbulos y microfibrillas de actina. Aunque el Spitzenkörper no es considerado como un orgánulo, puede funcionar como tal, ya que tiene la capacidad de coordinar como una sola unidad todos sus componentes y se cree que las vesículas en dicha estructura funcionan para la síntesis de la pared celular, es decir, está relacionada con la elongación de la hifa, pero además, estas vesículas también pueden estar involucradas en la secreción de enzimas al espacio extracelular (Roberson, *et al.*, 2010; Riquelme & Sánchez-León 2014).

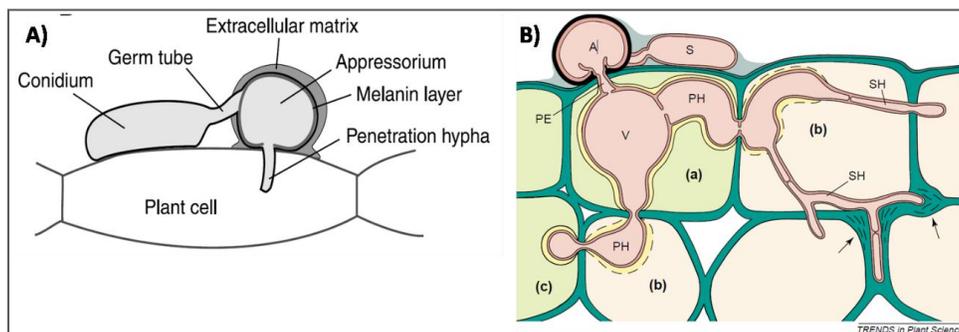


Figura 1. Proceso de infección de *C. lindemuthianum*: A) Infección inicial por penetración mecánica (Bechinger *et al.*, 1999); B) Desarrollo de las fases biotrófica y necrotrófica. (S) espora, (A) apresorio, (PE) hifa de penetración (V) vesícula de infección, (PH) hifas primarias en la fase biotrófica; (SH) hifas secundarias, (a) inicio de la fase biotrófica, (b) inicio de la fase necrotrófica y (c) nueva células hospedera de una hifa primaria que nuevamente dará origen a la fase biotrófica, seguida por la fase necrotrófica (Mendgen & Hahn, 2002).

2.1.3 Efectores y sistema inmune de la planta

En la interacción planta-patógeno, existen moléculas como quitina y polisacáridos provenientes de la pared celular del hongo como productos de síntesis de ésta, y que son secretados irremediamente aun estando el patógeno ya dentro de la célula vegetal interactuando en el apoplasto. A estas moléculas se les conoce como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) y Patrones Moleculares Asociados a Microbios (MAMPs por sus siglas en inglés) (Choi & Klessig, 2016; Villa-Rivera, *et al.*, 2017a). Estas moléculas pueden ser reconocidas por el hospedero mediante los receptores de respuesta a PAMPs (PRR por sus siglas en inglés), los cuales se ubican en la membrana celular del hospedero. La activación de PRR induce producción de hormonas y deposición de callosa en la pared celular vegetal y además desencadena la primera línea de defensa de la planta conocida como Inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI por sus siglas en inglés), sin embargo, PTI puede ser evadida mediante efectores secretados por el patógeno (Presti, *et al.*, 2015; Selin, *et al.*, 2016).

Los efectores son proteínas que, para el caso de hongos filamentosos, cumplen con algunas de las siguientes características: presencia de una señal de secreción, no tienen como destino final la mitocondria u otra región subcelular (excepto el núcleo, apoplasto y citoplasma), están codificadas por genes que son inducidos en el hospedero, no presentan hélices transmembranales ni motivos glicofosfatidilinositol, son proteínas pequeñas de menos de 300 aminoácidos y ricas en cisteína, algunas poseen repeticiones internas, son codificadas por genes con regiones Intergénicas largas, falta de dominios PFAM (excluyendo aquellos asociados con patogenicidad) y finalmente, no presentan ortólogos detectables (Stergiopoulos & Pierre, 2009; Borges de *Queiroz, et al.*, 2019). La función de los efectores es ayudar a la protección del hongo, suprimir la respuesta inmune o manipular la fisiología celular del hospedero (Stergiopoulos & Pierre, 2009).

Además del sistema inmune, está el sistema de vigilancia que permite al hospedero reconocer los efectores mediante proteínas de resistencia (Proteínas R) las cuales poseen receptores intracelulares conservados conocidos como receptores ricos en leucina de unión a nucleótidos (NB-LRR) los cuales ayudan a identificar a los efectores como moléculas extrañas y activan el sistema inmune del hospedero en su segunda fase,

al cual se le conoce como Inmunidad Desencadenada por Efectores (ETI por sus siglas en inglés). ETI finalmente y de manera rápida conlleva a la muerte celular localizada, fenómeno conocido como respuesta hipersensible (HR) (Mengiste, *et al.*, 2012; Padder, *et al.*, 2016).

De acuerdo al sitio donde son secretados los efectores, se pueden clasificar en dos tipos: efectores apoplásticos y efectores citoplasmáticos. Los efectores apoplásticos son secretados directamente al apoplasto mediante estructuras especializadas. En el caso de *C. lindemuthianum* dicha estructura especializada es el apresorio y las demás estructuras que de éste emergen, mientras que los efectores citoplasmáticos son acumulados en el BIC, ya antes mencionado, y de ahí son translocados al citoplasma (Crouch, *et al.*, 2014). Los efectores pueden ser conocidos también como factores de virulencia o factores de avirulencia, según la respuesta de la planta ante estos. Si logran evadir el sistema inmune de la planta y ayudan al hongo a desarrollar enfermedad, entonces se conocen como Factores de virulencia, en cambio, se conocen como Factores de avirulencia cuando son reconocidos por el sistema de vigilancia de la planta y desencadenan respuesta inmune vegetal (Stergiopoulos & Pierre, 2009; Selin, *et al.*, 2016).

Por su parte, dentro de los factores de virulencia para *Colletotrichum* se han encontrado que son proteínas involucradas en las etapas de pre y penetración, como lo son algunas proteínas Cap involucradas en el desarrollo del apresorio, cutinasas en la penetración, algunas proteínas cinanasas involucradas en transducción de señales y algunas enzimas hidrolíticas como pectin liasa, pectato liasa y xilanasas, por mencionar algunos (Villa-Rivera, *et al.*, 2017a).

2.2 Estructura de la pared celular vegetal

La pared celular vegetal es una cubierta recalcitrante que se encuentra al exterior de la membrana plasmática, que cumple con diversas funciones, tales como dar forma a las diferentes células, formar una interfaz entre las células adyacentes, proveer protección al resto de la célula y formar estructuras para la comunicación intercelular, entre otras (Keegstra, 2010). Las paredes celulares de las plantas se han clasificado en *paredes primarias* que rodean células en crecimiento o células poco especializadas que muestran

una similitud relativa entre ellas, y las *paredes secundarias* que son estructuras muy engrosadas ricas en lignina que se forman después que ha cesado el crecimiento celular. La pared secundaria, sobre todo, se puede encontrar rodeando células altamente especializadas. Además existe una estructura muy fina llamada lámina media, que es rica en pectina, y se encuentra como un modo de interfaz entre células adyacentes (Taiz & Zeiger, 2006).

Una pared celular vegetal típica está químicamente conformada por 40.6-51.2% de celulosa, 28.5–37.2% de hemicelulosa y 13.6–28.1% de lignina, siendo estos los componentes principales, aunque también se pueden encontrar otros componentes en menor proporción, como lo son proteínas y pectinas. Las proporciones de cada polisacárido varían dependiendo del tipo de célula y/o tipo de planta (Pauly & Keegstra, 2008). Por su parte, la celulosa es un polisacárido compuesto de moléculas de b-D-glucopiranosas unidas por enlaces glicosídicos β -(1,4) mientras que la hemicelulosa se compone de heteropolisacáridos compuestos por monosacáridos de cinco a seis carbonos (fundamentalmente xilosa, arabinosa, galactosa, manosa y ácido glucurónico). La lignina, también como uno de los principales componentes de la pared, es una estructura que se compone de cadenas largas de alcoholes polifenólicos. Las pectinas que componen la pared celular vegetal son principalmente homogalacturanos y ramnogalacturanos I y II (Vian-Ortuño, 2006; Burton, *et al.*, 2010).

2.2.1 Celulosa

La celulosa es un polímero formado por cadenas lineales de moléculas de b-D-glucopiranosas unidas por enlaces glicosídicos β -(1,4) (Burton, *et al.*, 2010). La unión de estos residuos de glucosa da origen a protofibrillas de celulosa. Cuando una protofibrilla se une a otra forman microfibrillas de celulosa, y éstas a su vez, en un arreglo final dan lugar a lo que comúnmente se conoce como fibra de celulosa. Esta estructura tridimensional de la celulosa se sostiene mediante interacciones de Van der Waals y además mediante interacciones no covalentes, además, las microfibrillas de celulosa se pueden encontrar unidas a moléculas de hemicelulosa y lignina (Lynd, *et al.*, 2002). Existen dos tipos de arreglos de las microfibrillas de celulosa; uno donde las fibrillas se encuentran separadas dando lugar a poros que permiten el paso a moléculas de agua,

este arreglo da lugar a regiones conocidas como amorfas; el segundo tipo de arreglo que puede adquirir la celulosa, es en el que las fibrillas se encuentran muy compactadas, de tal manera que forman una región cristalina insoluble en la mayoría de los solventes (Fig. 2) (Martínez-Anaya, *et al.*, 2008).

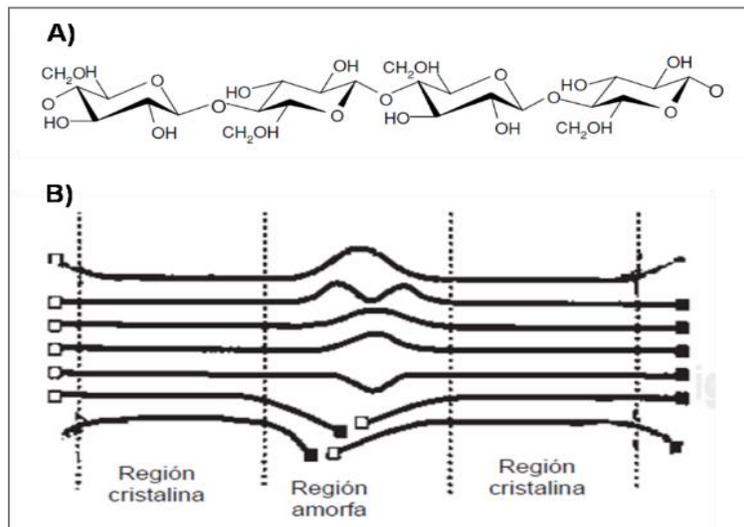


Figura 2. Estructura de la celulosa: **A)** Residuos de glucosa unidas mediante los enlaces glicosídicos β -(1,4). **B)** Los diferentes tipos de organización de las fibras de celulosa que generan la región cristalina, y la región amorfa (Martínez-Anaya, *et al.*, 2008).

2.2.2 Biosíntesis de la celulosa

Las microfibrillas de celulosa se encuentran embebidas en una matriz compuesta de hemicelulosa, pectinas, proteínas estructurales y enzimáticas que se presentan en pequeñas cantidades. Esta matriz de polisacáridos es sintetizada en el aparato de Golgi y exportada a la pared celular por exocitosis, mientras que las microfibrillas de celulosa son sintetizadas en la membrana plasmática y son depositadas directamente en la pared celular (Sandhu, *et al.*, 2009). Cada microfibrilla de celulosa se va formando por un empaquetamiento espontáneo y por la cristalización de docenas de cadenas de β -D-glucanos unidos por enlaces β -(1,4) establecidos por la acción de por lo menos tres tipos de celulosa sintetasas (CESA) (Cosgrove, 2005). Estas enzimas son complejos de 36 subunidades que se presentan en arreglo de roseta con un diámetro de 30 nm. Los complejos se reúnen en el aparato de Golgi, donde son inactivos y se trasladan a la

membrana plasmática, para activarse durante la síntesis de celulosa y a través de ésta depositar las microfibrillas de celulosa a la pared celular de acuerdo a la orientación de los microtúbulos, quienes ejercen una influencia directa en la orientación de la deposición de celulosa (Somerville, *et al.*, 2006).

Los complejos enzimáticos CESA van adicionando residuos de celulosa a una cadena ya existente, sin embargo, en estudios recientes se ha encontrado que un esteroil glucósido funciona como el aceptor inicial de glucanos, para la elongación de la cadena de celulosa, siendo este el inicio de la formación de la cadena (Peng, *et al.*, 2002). Es posible que moléculas de hemicelulosa, tales como xiloglucanos, vayan quedando atrapadas durante la formación de las microfibrillas de celulosa, dando lugar a regiones desordenadas o amorfas de celulosa (Cosgrove, 2005). Además del complejo CESA se ha encontrado que participa una endoglucanasa enlazada a la membrana llamada KORRIGAN o KOR, cuya función exacta no queda muy clara, pero su mutante indica que tiene una función indirecta en la formación de microfibrillas de celulosa (Sato, *et al.*, 2001).

2.2.3 Degradación enzimática de la celulosa

Las enzimas hidrolíticas son proteínas capaces de hidrolizar enlaces glicosídicos y obtener como producto oligosacáridos o monosacáridos, también son conocidas como Glicosil Hidrolasas (GHs), que a su vez se clasifican en familias de acuerdo a sus características estructurales y genéticas (Polaina, 2004). Las enzimas que participan en la degradación de celulosa pertenecen a las familias 5, 6, 7, 12 y 45 de las glicosil hidrolasas y son reconocidas también como celulasas (Yang, *et al.*, 2011; Kubicek, *et al.*, 2014). Sin embargo, la degradación de celulosa no solo involucra reacciones hidrolíticas, recientemente se han identificado mono-oxigenasas que dependen de cobre para llevar a cabo una reacción oxidativa, algunas son proteínas miembros de familia 33 de los módulos de unión a carbohidrato (CBM33) y algunas que se han clasificado dentro de las glicosil hidrolasas de la familia 61 (GH61), las cuales también actúan sinérgicamente con las celulasas comunes (Žifčáková & Baldrian, 2012).

De acuerdo al sitio de la cadena de celulosa en donde empiezan a despolimerizar, se puede decir que participan tres tipos de enzimas: las endo- β -1,4-glucanasas, (degradan enlaces internos en la cadena de celulosa), exo- β -1,4-glucanasas (enzimas que

hidrolizan enlaces en los extremos reductores y no reductores del polímero de celulosa) y finalmente las β -glucosidasas (que convierten el producto final de las exo- y endoglucanasas a residuos de glucosa) (Horn, *et al.*, 2012; Longoni, *et al.*, 2012).

Las celobiohidrolasas (CBHs) (EC 3.2.1.91), son celulasas hidrolíticas que atacan extremos reductores y no reductores en la cadena de celulosa (exo- β -1,4-glucanasas). Estas enzimas producen celobiosa como producto final y son una herramienta clave en la degradación de regiones cristalinas de celulosa. Existen dos tipos de CBHs que se distinguen por el extremo de la cadena de celulosa que degradan: la celobiohidrolasa I (CBHI), que hidroliza en el extremo reductor y la celobiohidrolasa II (CBHII), que ataca el extremo no reductor (Ilmén, *et al.*, 2011; Horn, *et al.*, 2012). La CBHII está conformada por un módulo de unión a carbohidrato (CBM) que ayuda a la enzima establecerse en el sustrato, como ocurre para otras enzimas (celulasas y no celulasas); un dominio catalítico donde se encuentran los residuos que ayudan en la reacción catalítica y un linker (también llamado asa) que une el CBM al dominio catalítico (Fig. 3) (Wilson, 2011; Horn *et al.*, 2012; Longoni *et al.*, 2012).

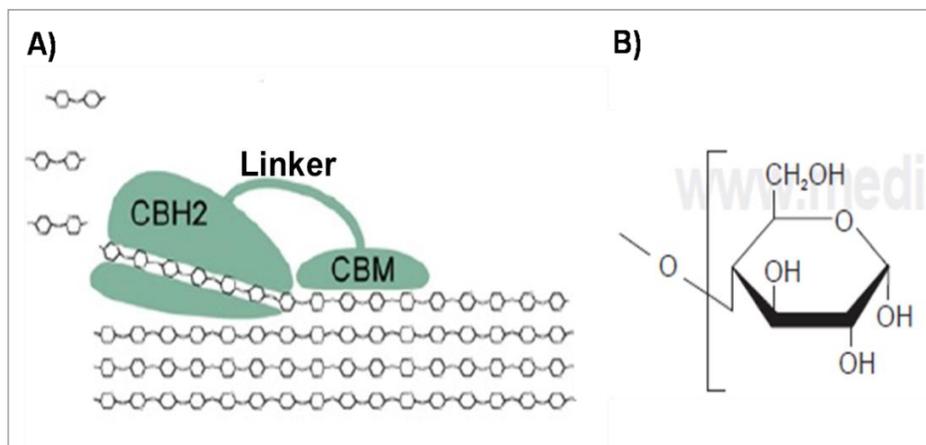


Figura 3. Mecanismo de reacción de la CBHII, **A)** CBHII degradando celulosa para convertirla a celobiosa. CBH2 son las siglas de la Celobiohidrolasa II, que a la vez indican el dominio catalítico de la enzima y CBM es el módulo de unión a carbohidatos. **B)** Residuo de glucosa resultante de una degradación enzimática por inversión, donde el grupo hidroxilo se encuentra invertido hacia abajo. Modificado de (Martínez-Anaya, *et al.*, 2008; Horn, *et al.*, 2012).

2.2.4 Características de la celobiohidrolasa II

La celobiohidrolasa II se ha clasificado dentro de la familia GH6, familia que se caracteriza por adoptar una estructura tridimensional semejante a un barril β/α_8 conocido también como barril TIM (por la triosa-fosfato isomerasa). Sin embargo, la estructura cristalizada de la CBHII adopta una topología semejante a dicho barril, pero con algunas modificaciones. Cuenta con siete β -láminas paralelas en lugar de ocho y en el extremo del carbono terminal se combinan dos asas que aparentemente se cierran en un túnel característico también de la topología del barril TIM (Rouvinen, *et al.* 1990; Koivula, *et al.*, 1996).

La mayoría de trabajos en hongos enfocados a la cristalización de CBHII, se han realizado en Ascomicetes, particularmente en *Trichoderma reesei* y *Humicola insolens* (Hui, *et al.*, 2002; Koivula, *et al.*, 2002; Varrot, *et al.*, 2003). Sin embargo, en 2010 se logró cristalizar esta proteína del Basidiomiceto *Coprinopsis cinerea*. La estructura presentó también las modificaciones al clásico barril TIM antes mencionadas y además se identificaron pequeños cambios estructurales en el túnel, que en comparación con las proteínas equivalentes de *Hypocrea jecorina* (teleomorfo de *T. reesei*) y *H. insolens*, presenta un túnel más amplio. Dicho cambio en el túnel parece ser menos favorable en la degradación de sustratos (Liu, *et al.*, 2010).

Además de la determinación de la estructura tridimensional de la CBHII, se ha logrado identificar el centro activo y sitio activo de la misma. El sitio activo de la CBHII de *T. reesei* se ubicó en el extremo del carboxilo terminal de la proteína, el cual forma parte del túnel cerrado en el barril β/α , por lo que también se le ha identificado a este túnel como el centro activo (Rouvinen, *et al.*, 1990).

La CBHII lleva a cabo la hidrólisis de las cadenas de celulosa por el mecanismo de inversión, también conocido como mecanismo de desplazamiento simple (Gutiérrez-Rojas, *et al.*, 2015). En estudios previos se ha reportado que dicha enzima una vez anclada al sustrato, no es liberada, razón por la cual se le conoce también como una enzima procesiva (Kubicek, 2013c).

En un estudio sobre la mutación de la CBHII (Cel6A) de *T. reesei* se identificaron en el sitio activo dos ácidos aspárticos (D²²¹ y D¹⁷⁵), que funcionan como residuos importantes del sitio catalítico cuyas mutantes resultaron disminuir la efectividad de la enzima para

degradar el sustrato (Koivula, *et al.*, 2002). En conjunto con estos dos residuos se identificó la presencia de otros dos residuos (D²⁶³ y D⁴⁰¹) en centro del túnel, los cuales son conservados en la familia de las GH6 y se les ha reconocidos su papel potencial en la reacción catalítica (Koivula, *et al.*, 1996). Se encontró también que la Y¹⁶⁹ de la CBHII de *T. reesei*, lleva a cabo un rol importante en la reacción catalítica. Esto se estableció gracias a mutaciones en este residuo específico de la proteína, los resultados sugieren que la Y¹⁶⁹ ayuda en la catálisis promoviendo un cambio conformacional en el anillo de la glucosa para facilitar la acción de los residuos D²²¹ y D²¹⁵ (Koivula, *et al.*, 1996; Koivula, *et al.*, 2002).

2.2.5 Celobiohidrolasas caracterizadas y antecedentes más relacionados

Debido a la importancia biotecnológica de las CBHII, esta proteína ha sido caracterizada bioquímica y molecularmente en hongos y bacterias. En la tabla 1 se resume los trabajos moleculares realizados de la CBHII en hongos. Adicional a los trabajos citados (Tabla 1), actualmente sólo existen dos trabajos sobre análisis de un fragmento del gen *cbhII* en *C. lindemuthianum*. Acosta-Rodríguez, *et al.* (2005), reportaron la producción de enzimas celulolíticas extracelulares por *C. lindemuthianum* raza 1472, crecido bajo diferentes condiciones de cultivo, así como el aislamiento del ADNc parcial que codifica a una CBHII a partir de micelio inducido con celulosa, sin embargo, la comparación de la secuencia del fragmento de *cbhII* aislado con las secuencias en base de datos, mostró una mayor similitud con genes de *Trichoderma* que con *Colletotrichum*, sugiriendo una transferencia. Por otro lado, en un segundo trabajo, a partir de ADN genómico purificado de micelio de *C. lindemuthianum* raza 1472, se clonó un fragmento del gen de la celobiohidrolasa II (*cbhII*).

Tabla 1. Análisis de genes de la Celobiohidrolasa II en hongos.

Hongo	Descripción	Año	Autores
<i>Trichoderma reesei</i>	Aislamiento y análisis de la secuencia completa del gen <i>cbh2</i> , ADN y ADNc.	1987	Teeri <i>et al.</i>
<i>Agaricus bisporus</i>	Aislamiento de dos ADNc y comparación <i>cbh2</i> de <i>T. reesei</i> . Expresión heteróloga de <i>Cel3</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	1994	Chow <i>et al.</i>

Tabla 1. Continuación. Análisis de genes de la Celobiohidrolasa II en hongos.

<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aislamiento de dos ADNc representantes de variantes alélicas putativas del gen.	1994	Tempelaars <i>et al.</i>
<i>Piromyces rhizinflata</i>	Análisis del ADNc de <i>Cel5B</i> y <i>Cel6A</i> perteneciente a la cepa 2301 de rumen. Purificación de las proteínas recombinantes.	2003	Tsai <i>et al.</i>
<i>Humicola insolens</i>	Clonación y secuenciación del gen <i>avi2</i> que codifica para la Avicelasa II (celobiohidrolasa II).	2003	Moriya <i>et al.</i>
<i>Piromyces equi</i>	Aislamiento y clonación del ADN genómico y ADNc.	2003	Harhangi <i>et al.</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	Clonación de 74 genes que codifican para enzimas degradadoras de polisacáridos, entre ellas la celobiohidrolasa II. Evaluación de expresión de las proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i> .	2006	Bauer <i>et al.</i>
<i>Irpex lacteus</i>	Aislamiento y análisis del gen <i>cel4</i> . Expresión heteróloga en <i>Pichia pastoris</i> .	2008	Toda <i>et al.</i>
<i>Podospora anserina</i>	Análisis de secuencias de genes que codifican para enzimas involucradas en la degradación de celulosa y comparación con <i>Neurospora crassa</i> .	2008	Espagne <i>et al.</i>
<i>Coprinopsis cinérea</i>	Aislamiento de los genes <i>CcCel6A</i> , <i>CcCel6B</i> , <i>CcCel6C</i> , <i>CcCel6D</i> , <i>CcCel6E</i> . Evaluación de expresión utilizando glucosa, celobiosa y celulosa como sustrato.	2009	Yoshida <i>et al.</i>
<i>Trichoderma viride</i>	Aislamiento de <i>cbhII</i> de la cepa CICC 13038, análisis de la secuencia de aminoácidos y obtención del peso molecular. Evaluación de expresión en <i>S. cerevisiae</i> .	2010	Song <i>et al.</i>
<i>Penicillium decumbens</i>	Análisis de expresión de seis genes, entre ellos <i>Cel6A</i> en una cepa silvestre y una mutante, en medios con glucosa, sorbosa, lactosa, celobiosa, celulosa y celulosa de salvado de trigo.	2011	Wei <i>et al.</i>
<i>Chaetomium thermophilum</i>	Se resolvió la estructura cristalizada de la celobiohidrolasa II.	2012	Thompson <i>et al.</i>

Mediante el análisis de la secuencia se identificó un fragmento de 929 pb con una cobertura del 54.64% similar al gen *cbhII* de *C. orbiculare*, y la comparación en las bases de datos internacionales mostró un 98% de identidad y 99% de similitud con dicho gen. En la secuencia parcial de *cbhII* de *C. lindemuthianum* se identificaron seis exones que codifican para 235 aminoácidos deducidos y se realizó la predicción de la estructura tridimensional de la proteína, cuya topología coincidió con la del b-barril TIM modificado,

característica de la familia GH6 (Morelos-Martínez, 2016). Estos resultados mostraron la presencia de un gen putativo que codifica para una celobiohidrolasa II, sin embargo, aunque se sabe que el hongo secreta celulasas (Acosta-Rodríguez, *et al.* 2005), se desconocen las características moleculares del gen *cbhII* completo y su perfil de expresión.

Sin embargo, existen otros estudios en *C. lindemuthianum*, donde se evaluaron los perfiles transcripcionales de genes de otras GH y se realizaron comparaciones entre la raza 0 y 1472. Por ejemplo, en el estudio realizado por Lara-Márquez, *et al.* (2011), el gen de la Pectín liasa 2 presentó mayor expresión en la raza patógena 1472 que en la no patógena 0, en el estudio realizado por Conejo-Saucedo, *et al.* (2016), el gen que codifica para la endo- β -1,4-xilanasas, mostró mayor expresión en la raza 1472; Villa-Rivera, *et al.* (2017b) también encontró que el gen de la endo- β -(1,6)-D-galactanasas presenta mayor expresión en la raza 1472, además, Villa-Rivera (2017) en un segundo trabajo, logró encontrar que el gen que codifica para la α -L-arabinofuranosidasas presenta mayor expresión en la raza 1472; finalmente, Campo-Díaz (2019) encontró que el gen de la β -xilosidasas presenta también mayor expresión en la raza 1472.

2.2.6 Importancia biotecnológica de las CBHII

Se ha reportado que las enzimas hidrolíticas tienen una aplicación biotecnológica importante. Por ejemplo, en la industria alimenticia se les ha utilizado para la elaboración de jugos, purés, extracción de aceite de olivo, en la elaboración de cerveza y vinos. En la ganadería han sido útiles para la obtención de alimentos para el ganado, mejorando así la producción de leche y carnes de rumiantes. Por otro lado, también se han utilizado ampliamente en la industria textil y lavandería, así como también en la elaboración de papel (Bhat, 2000).

A principio de los setentas las investigaciones en celulasas aumentaron drásticamente, debido a la idea de utilizar celulosa para la producción de etanol como una alternativa de combustible (Kubicek, 2013b). Actualmente las aplicaciones biotecnológicas de dichas enzimas han tenido mucho auge, siendo utilizadas sobre todo en la industria de papel y en la obtención de bioetanol como combustible sustituto de la gasolina (Martínez-Anaya, *et al.*, 2008; Yang, *et al.*, 2011). En un trabajo reciente se probó la eficiencia de una CBHII,

que presentó cerca del 80% de su actividad máxima después de 4 h de incubación a pH 2,0 usando residuos de mazorca de maíz deslignificada como sustrato, para la obtención de etanol. En este trabajo se encontró que la concentración de etanol aumentó en un 20% durante la sacarificación y fermentación simultáneas cuando se complementó con una dosis baja de 0.2 mg de la enzima por un gramo de sustrato (Gao, *et al.*, 2011)

Debido a la recalcitrancia de la pared celular, la biomasa vegetal utilizada con fines industriales se debe someter necesariamente a varios pretratamientos que pueden ser físico-mecánicos, físico-químicos, químicos o biológicos, esto con el objetivo de aumentar el área y la porosidad del sustrato, reducir la cristalinidad de la celulosa y hacer más accesible la biomasa para la degradación enzimática. En los pretratamientos biológicos generalmente se usan enzimas fúngicas (Kubicek, 2013b). Un ejemplo para el pretratamiento de la celulosa cristalina es la eficiencia de enzimas mono-oxigenasas, miembros de la familia CBM33 y GH61 antes mencionadas, que actúan sinérgicamente con celulasas comunes (Horn, *et al.*, 2012; Žifčáková & Baldrian, 2012).

T. reesei, es uno de los principales hongos que se ha utilizado para la producción de enzimas lignocelulolíticas. Este hongo fue descubierto en la segunda guerra mundial, al observar que se deterioraban las tiendas de campaña del ejército de Estados Unidos. Fue entonces que se aisló y se identificó originalmente como *T. viride*, sin embargo, no cumplió con todas las características de la especie y se le asignó el nombre de *T. reesei* con el que se reconoce hasta el momento. Actualmente, también se utilizan cepas mejoradas de este hongo y de otros hongos eficientes en secreción enzimática. La demanda que tienen los productos obtenidos a base de enzimas desencadenó un aumento en las investigaciones de enzimas con fines biotecnológicos. En busca de métodos para lograr la máxima expresión, se ha encontrado recientemente que una de las soluciones para promover la productividad de celulasas es el incremento de la expresión de proteínas accesorias que actúan sinérgicamente (Kubicek, 2013a).

3. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, es importante analizar molecular y bioinformáticamente el gen *cbhII* de *Colletotrichum lindemuthianum* y conocer si presenta expresión diferencial en razas del hongo con diferente estilo de vida.

4. HIPÓTESIS

En *Colletotrichum lindemuthianum*, el gen *cbhII* que codifica para una Celobiohidrolasa II se expresa de manera diferencial dependiendo del estilo de vida del hongo.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Realizar una caracterización molecular y bioinformática el gen *cbhII* de *Colletotrichum lindemuthianum*.

5.2 Específicos

- Realizar la caracterización molecular-bioinformática de la secuencia del ADNc del gen *cbhII* en *C. lindemuthianum*.
- Analizar los perfiles de transcripción de *cbhII* en una raza patógena (1472) y una no patógena (0) de *C. lindemuthianum*.
- Realizar un análisis filogenético y modelaje 3D de la proteína CBHII de *C. lindemuthianum* y de especies del género *Colletotrichum*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Se utilizó micelio de *C. lindemuthianum* razas 1472 (patógena) y raza 0 (no patógena), perteneciente al cepario del Laboratorio de Estudios de Enzimas Líticas de Pared Celular Vegetal del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, así como la cepa bacteriana comercial TOP10 de *Escherichia coli* (Invitrogen).

6.2 Medios de cultivo

6.2.1 Medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y Papa-Dextrosa (PD)

El micelio del hongo se creció y mantuvo en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (French, 1982). Para la elaboración de este medio se cortaron en cubos pequeños 250 g de papas sin cáscara y se sometieron a cocción en un matraz de 1 L con 500 ml de agua destilada en una olla de presión. Posteriormente se filtró el extracto y se le agregó 15 g de dextrosa y 20 g de agar previamente disueltos en 100 ml de agua destilada. Se aforó a 1 L y se esterilizó por 15 minutos a 15 lb de presión. Finalmente, el medio se distribuyó en Cajas Petri de 100 x 15 mm y se almacenó a 4 °C. Para la elaboración del medio PD se realizó un proceso similar al de la preparación de medio PDA, excepto que a no se le agregó agar.

6.2.2 Medio Mathur modificado

Para un litro de Medio Mathur modificado se disolvieron previamente en 500 ml de agua, 2.5 g de sulfato de magnesio, 2.72 g de fosfato de potasio monobásico, y se suministró un poco de calor (70 °C aproximadamente) para disolver 5.28 g de ácido L-glutámico g, posteriormente se suplementó con pared celular de *P. vulgaris* (cv. Flor de Mayo) obtenida de hipocotilos (Fry, 2006), celulosa, o glucosa al 2.5% como única fuente de carbono y se ajustó el pH a 8.2-8.5.

6.3 Inducción de micelio

A partir de cultivos de PDA, se tomaron de tres a cuatro discos de 0.6 cm de diámetro de micelio de ambas razas de *C. lindemuthianum* y se inocularon en 50 ml de medio PD en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. Se incubó a 18 °C en agitación a 150 rpm en una incubadora orbital (Thermo Scientific, mod. 4353) durante 10 días. Posteriormente, se recuperó el micelio por filtración y se lavó con agua destilada, desionizada, esterilizada (H₂O_{dde}) hasta eliminar el exceso de medio PD. El micelio recuperado fue inoculado en matraces de 125 ml con medio Mathur modificado, se incubó nuevamente a 18 °C en agitación a 150 rpm y después de 0, 4, 6, 12 y 48 horas y a los 3, 5, 7 y 9 días de incubación el micelio se recuperó por filtración y se almacenó en papel aluminio a -80°C hasta su uso.

6.4 Extracción de ADN genómico

Para aislar el ADN genómico se siguió el método de extracción de (Kuramae-Izioaka, 1997). En un mortero estéril, se pulverizó 0.1 g de micelio de *C. lindemuthianum* con nitrógeno líquido y se colocó en un microtubo estéril de 1.5 ml. Se adicionó dos volúmenes de Buffer de extracción (Tris pH 8.0 100 mM, EDTA 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, β-mercaptoetanol 10M, SDS 1%) y se homogeneizó en un vortex. Después, se incubó durante 40 minutos a 65 °C y se agregó 1/2 volumen de acetato de potasio 5M, se mezcló gentilmente, se incubó en hielo durante 30 minutos y se centrifugó en una microcentrífuga (Thermo Fisher Scientific, sorvall Legend Micro 17R) a 10,000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido de la centrifugación se transfirió a un microtubo estéril de 1.5 ml y se añadió un volumen igual de cloroformo-isoamílico (25:1), se mezcló perfectamente y se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm a 4 °C por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió otro microtubo estéril de 1.5 ml y para precipitar el ADN se le agregó un volumen igual de isopropanol frío (-20 °C), se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante conservando el precipitado. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 50 µl de H₂O grado molecular libre de nucleasas, se agregó 1 µl de RNasa libre de DNasa (40 µl/ml) y se incubó por 3 h a 37 °C. Transcurrido este lapso de tiempo, se corrió 10 µl de ADN en un gel de agarosa al 1% teñido con SybrSafe (1X) (Invitrogen) con buffer TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA

1mM) a 80 voltios durante 25 minutos. La muestra se cargó en el gel con 2 μ l de buffer de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xilan cyanol 0.25%, glicerol 30% y H₂O_{dde}). Finalmente, se midió la concentración del ADN en un NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific).

6.5 Extracción de ARN total

En un mortero estéril, se pulverizó 0.1 g de micelio con nitrógeno líquido para romper la pared celular y se agregó en un microtubo de 1.5 ml estéril con un 1 ml de TRIzol (Invitrogen), se homogeneizó en un vortex y se incubó por 5 minutos en hielo. A continuación, se agregó 0.2 ml de cloroformo por 1 ml de TRIzol utilizado en la homogeneización, la muestra se mezcló vigorosamente en un vortex y se incubó en hielo por 5 minutos, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se separó la fase soluble, se agregó isopropanol e incubó a -20 °C por una hora y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se recuperó la pastilla descartando el sobrenadante y se dejó secar por 15 minutos a temperatura ambiente, enseguida se lavó con etanol al 75% por cada ml de Trizol utilizado, la pastilla se lavó hasta desprenderla del fondo del tubo por inversión. Se centrifugó nuevamente a 7,500 rpm por 5 minutos a 4 °C y se descartó el etanol conservando la pastilla, se dejó secar por 30 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 ml de H₂O grado molecular libre de nucleasas. Se midió la concentración del ARN total en un NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) y se corroboró la integridad por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con SybrSafe (1X) (Invitrogen) con buffer TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM) a 70 voltios durante 40 minutos. La muestra se cargó en el gel con 2 μ l de buffer de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xilan cyanol 0.25%, glicerol 30% y H₂O_{dde}).

6.6 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para las síntesis de ADNc se siguieron las instrucciones del Kit SuperScrip III RT (Invitrogen). Antes de iniciar con la síntesis de ADNc en un microtubo de 0.2 ml previamente lavado con H₂O grado molecular, se trató 1 mg de ARN total con DNasa I (2 u/ml) (Invitrogen). Respetando el orden de reactivos se agregó a un volumen total de 9 ml, 1 ml de Buffer 10x para DNasa I (100 mM Tris, pH 7.5. 25 mM MgCl₂ y 5 mM CaCl₂),

0.5 ml de DNasa y el resto de H₂O grado molecular libre de nucleasas y se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se inactivó la enzima con 1 ml de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (5 mM) e incubación a 65 °C durante 10 minutos y se dejó reposar en hielo por dos minutos. Para iniciar con la reacción de síntesis de ADNc, para obtener un volumen total de 13 ml se adicionó los siguientes reactivos: 1 ml de oligonucleótido dT₂₀ (50 mM), 1 ml de dNTP mix (10mM), lo que reste de H₂O grado molecular libre de nucleasa, se incubó a 65 °C, y después se colocó en hielo durante 1 minuto. Se centrifugó brevemente y se adicionó lo siguiente: 4 ml de buffer 5x First-strand, 1 ml de DTT (0.1M), 0.5 ml de RNasa OUT (40 unidades/ ml (Invitrogen) y 0.5 de superScrip III RT (200 u/ml). Se mezcló suavemente por pipeteo y se incubó a 50 °C durante 50 minutos y posteriormente se incubó a 70 °C durante 15 minutos. Finalmente se midió la concentración del ADNc como se describió anteriormente.

6.7 Amplificación del gen *cbhII* por PCR de punto final

Para aislar el gen *cbhII*, se utilizó ADN genómico y el ADNc obtenido del ARN total de micelio inducido con celulosa por 48 horas en ambas razas. Para la amplificación del gen se utilizaron los juegos de oligonucleótidos específicos (Tabla 2) diseñados con base en la secuencia del gen *cbhII* identificado en el genoma de *C. lindemuthianum* 89, disponible en bases de datos (NCBI). Para la mezcla de reacción se usaron los siguientes reactivos: 17.2 µl de H₂O grado molecular, 2.5 µl de buffer PCR 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8.4, KCl 500 mM, concentración final 1X), 1 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de cada oligonucleótido (10 pm/µl) (Tabla 2), 1 µl de dNTP mix (2.5 mM), 200 ng de ADN/ADNc, 0.3 µl de *Taq* polimerasa (1 u/ml) (Invitrogen). La mezcla de reacción se incubó en un termociclador (Veriti Thermal Cycler, mod. 96-well) bajo las siguientes condiciones; desnaturalización inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 56-59 °C durante 45 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos; por último, una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis siguiendo el procedimiento anteriormente detallado, en un gel de agarosa al 1.5 % que se corrió a 70 voltios durante 50 minutos.

Tabla 2. Juegos de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *cbhII*-ADN y *cbhII*-ADNc

Oligonucleótidos	Secuencia	TM °C	Tamaño
CocbhIIF1	CGACTCACGGACAACCTCTCACACT	56	1803pb
CocbhIIR1	TGAATCAGCCCACGCAAAGAAT		
CocbhIID1	CGACTCACGGACAACCTCTCACACT	59	878
cbhIIq-R	CTTGGGCGCCGGCACACT		
cbhIIq-D	CGCTGGCCAGTTCGTCTCTAC	59	888
CocbhIIR3	GAATCAGCCCACGCAAAGAATG		

6.8 Clonación

6.8.1 Ligación del fragmento de ADN amplificado a un vector

La reacción de ligación se llevó a cabo en un microtubo de 1.5 ml como sigue; se mezcló 3 µl del producto de amplificación de ADN, 1 µl de solución de sales, 1.5 µl de H₂O_{dde} y 0.5 µl de vector pCR™ 4-TOPO (Invitrogen). Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

6.8.2 Transformación de células *E. coli* quimiocompetentes

Se adicionó 2 µl de la reacción de ligación con el vector pCR™ 4-TOPO a un microtubo de 1.5 ml con 50 µl de células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Se incubó en hielo por 30 minutos, se sometió a las células a un shock térmico por 30 segundos a 42 °C y se transfirió inmediatamente a hielo. Después se adicionó 250 µl de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y Glucosa 20 mM) (Invitrogen) y se incubó a 37 °C en agitación a 200 rpm durante una hora. Finalmente, las células se plaquearon en Cajas Petri 100 x

15 mm (80 µl en cada caja) con medio LBA con ampicilina (LBA-Amp 1 mg/ml) y se incubaron a 37 °C durante toda una noche.

6.8.3 Purificación de plásmidos a gran escala

Las colonias transformantes se seleccionaron y se transfirieron con palillos estériles a tubos de ensaye de 15 ml con 2 ml de medio LB con ampicilina (LB-Amp 1mg/ml). Se incubaron a 37 °C y 150 rpm en la incubadora orbital (Thermo Scientific, mod. 4353) durante toda la noche. La purificación de plásmidos recombinantes se llevó a cabo de acuerdo al método de Birnboim & Dolly (1979). Se centrifugó 1.5 ml de cultivo a 13,000 rpm por 10 segundos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 150 µl de solución Birnboim I (Glucosa 50 mM, EDTA 10mM y TRIS/HCl 25 mM), 300 µl de solución Birnboim II (NaOH 0.2 M, SDS 1%), 300 µl Birboim III (Acetato de sodio 3 M, pH 5.2). Posteriormente se le agregó 300 µl de cloroformo, se mezcló en vórtex hasta tornar a un color blanco y se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 minutos. La fase acuosa obtenida de la centrifugación se transfirió cuidadosamente a otro microtubo de 1.5 ml estéril y se agregó 700 µl de isopropanol frío (-20 °C), mezclando perfectamente. Se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm por 15 min y se descartó el sobrenadante, conservando sólo el precipitado. Posteriormente, se lavó el precipitado agregando 750 µl de etanol al 70% frío (-20 °C), se centrifugó a 12,000 rpm por 3 minutos y se decantó el sobrenadante. El precipitado obtenido se dejó secar durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió en 50 µl de H₂O grado molecular libre de nucleasas y se agregó 1 µl de RNasa A (10 mg/µl) (Sigma), se incubó durante 1 hora a 37 °C. La integridad de los plásmidos recombinantes se verificó por electroforesis en gel en gel de agarosa al 1% como se describió previamente.

6.8.4 Digestión enzimática

Para verificar el tamaño de los insertos en los plásmidos recombinantes, se realizó digestión enzimática de la siguiente manera: se agregó 5 µl de plásmido, 8 µl de H₂O grado molecular libre de nucleasas, 0.5 µl de la enzima *EcoRI*, 1.5 µl Buffer 10X, en un volumen final de 15 µl. Una vez obtenida la mezcla se incubó a 37 °C por una hora.

Finalmente se revisó el tamaño de los insertos por electroforesis en gel de agarosa al 1% como se describió previamente.

6.8.5 Limpieza de plásmidos

La limpieza de plásmidos para secuenciación se realizó de acuerdo a la técnica de Stemmer (1991). Se ajustó el volumen de ADN (10-25 µg) a 150 µl con H₂O_{de} y se adicionó 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Posteriormente se agregó 140 µl de acetato de amonio 7.5 M y se mezcló gentilmente, se adicionó 420 µl de fenol:cloroformo:isoamílico y se centrifugó 12,000 rpm durante 2 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un microtubo de 1.5 ml estéril, se adicionó 800 µl de etanol absoluto frío (-20 °C) y se incubó durante 20 minutos a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos. El ADN precipitado se lavó agregando 300 µl de etanol al 70 % frío (-20 °C), se resuspendió en 30 µl de H₂O grado molecular libre de nucleasas y se verificó la integridad de los plásmidos por electroforesis en gel de agarosa al 1% como se describió previamente.

6.9 Secuenciación del ADN y análisis de secuencias

Los insertos en los plásmidos y los productos de amplificación de ADN se secuenciaron por el método dideoxy (Sanger, *et al.*, 1975) a través de la empresa comercial MacroGen USA. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias reportadas en el banco de datos internacional, mediante el software en línea Basic Local Alignment Search Tool (Blast), y se editaron con el servidor en línea AUGUSTUS (Stanke & Morgenstern, 2005). A partir de las secuencias codificantes para CBHII disponibles en base de datos internacionales de especies de *Colletotrichum* se realizaron los alineamientos utilizando los softwares BioEdit 7.0.5 (Hall, 2005), Mega 6 (Tamura, *et al.*, 2013) Clustal Omega de European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Y ClustalX (Thompson, *et al.*, 1997).

6.10 Modelaje tridimensional

Para el modelaje tridimensional de las proteínas se utilizaron los softwares I-TASSER (Yang, *et al.*, 2015) y Swiss Model (Biasini, *et al.*, 2014). La edición de los modelos se

realizó con los programas Chimera USF 1.10.2 (Pettersen, *et al.*, 2004) y Swiss-Pdb Viewer (With, *et al.*, 2001).

6.11 Perfiles de transcripción de *cbhll* por Qpcr

Como control de expresión basal se utilizó ADNc de micelio crecido con glucosa durante 8 h. Para el análisis de inducción se utilizó ADNc de micelio de cultivos con pared celular e incubado por 0, 4, 6, 12 y 48 horas y 3, 5, 7 y 9 días en celulosa y en pared celular vegetal. Como referencia se amplificó un fragmento del gen de β -tubulina con el juego de oligonucleótidos específicos TR β tub2-D y TR β tub2-R (Conejo-Saucedo, *et al.*, 2016; Villa-Rivera, *et al.*, 2017). Para evaluar la expresión del gen *cbhll* se utilizó el juego de oligonucleótidos específicos *cbhll*q-D y *cbhll*q-R (Tabla 2), diseñados a partir de la secuencia genómica del gen *cbhll* *C. lindemuthianum* raza 89 disponible en bases de datos (NCBI). La especificidad de la reacción se verificó mediante un análisis de la curva de fusión y la eficiencia de cada oligonucleótido se verificó utilizando la curva estándar. Los oligonucleótidos mostraron una pendiente de -3.273, con una R² de 0.93% y un porcentaje de eficiencia de 102%, valores que están dentro de los parámetros aceptados. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 10 μ l, que contenía 200 ng de ADNc, 2 pmol de cada oligonucleótido, 5 μ l de Radiant™ Green (2X) qPCR Mix Hi-Rox (1X) (Alkali Scientific). Se incluyeron controles sin plantilla en todas las placas. Los ensayos de amplificación se realizaron en placas de reacción MicroAmp Fast Optical de 48 pocillos (Applied Biosystems) y se cubrieron con una película adhesiva óptica MicroAmp (Applied Biosystems) en el sistema de PCR StepOne Real-Time (Applied Biosystems). Las amplificaciones se realizaron en las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de 95 °C durante 40 seg, 62 °C durante 30 seg y 72 °C durante 40 seg, una curva de fusión de 95 °C durante 15 seg, 60 °C durante 1 min y 95 °C durante 15 seg. La cuantificación relativa de la expresión génica (qPCR) se realizó mediante el método de CT comparativo ($\Delta\Delta C_t$). Los datos se obtuvieron por triplicado en dos eventos independientes y fueron analizados en Excel. Se realizó análisis de varianza (ANOVA). Los resultados se reportaron como las medias con errores estándar (SE). Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

6.12 Análisis filogenético de la CBHII

Los análisis filogenéticos se basaron en los criterios de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood-ML), y de Inferencia Bayesiana (Bayesian Inference-BI) mediante los programas Mega X 10.0.5 (Kumar, *et al.*, 2018) y Mr Bayes v3.1 (Ronquis, *et al.*, 2012) respectivamente. Para el análisis ML se calculó el modelo de evolución molecular, el cual se eligió bajo el criterio de información de Akaike (AIC) (Alfaro & Hulsenbeck, 2006), mediante el programa de Mega X 10.0.5 (Kumar, *et al.*, 2018). Los análisis bayesianos se corrieron con 10×10^6 generaciones usando dos Cadenas de Markov de Montecarlo (MCMC), los árboles se muestrearon cada 1000 generaciones descartando el 25% para obtener un árbol de consenso de mayoría. Los soportes de los nodos se estimaron con análisis bootstrap (PB) y probabilidad posterior (PP). Los árboles se visualizaron y editaron utilizando el programa FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2014).

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de ADN genómico

En la figura 4, se muestra la integridad del ADN purificado de las razas 0 y 1472 de *C. lindemuthianum*. Para su identificación, las muestras se indican como ADNCL0 y ADNCL1472 purificados de las razas 0 y 1472, respectivamente. Se obtuvieron concentraciones de 30 ng/ml para la muestra ADNCL0, y 45 ng/ μ l para ADNCL1472.

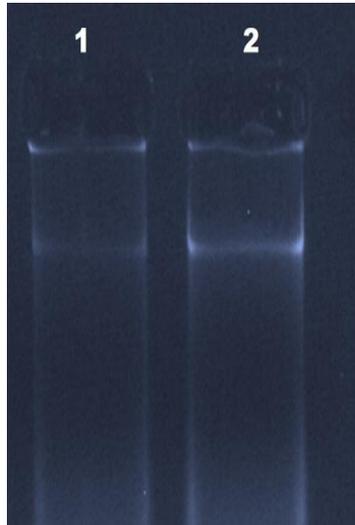


Figura. 4. Integridad de ADN total purificado de *C. lindemuthianum* raza 0 y raza 1472. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X, teñido con SybrSafe. El carril 1 muestra ADNCL0; carril 2 muestra ADNCL1472.

7.2 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc

En la figura 5, se muestra la integridad de ARN total purificado de las razas 0 y 1472 de *C. lindemuthianum*. La figura 5A muestra el ARN total purificado de micelio de ambas razas, incubado en medio con pared celular de *P. vulgaris* durante 0, 4, 6, 12, 48 h, y 3, 5, 7 y 9 días. La figura 5B muestra el ARN total purificado de micelio de ambas razas, incubado en medio con celulosa durante 0, 4, 6, 12, 48 h, y 3, 5, 7 y 9 días. Se obtuvieron concentraciones de ARN total desde 520.6 hasta 2,247.2 ng/ml, que fueron adecuadas para la síntesis de ADNc. Una vez obtenido el ADNc las concentraciones determinadas por espectrofotometría fueron en un rango de 707.3 a 1786.0 ng/ml.

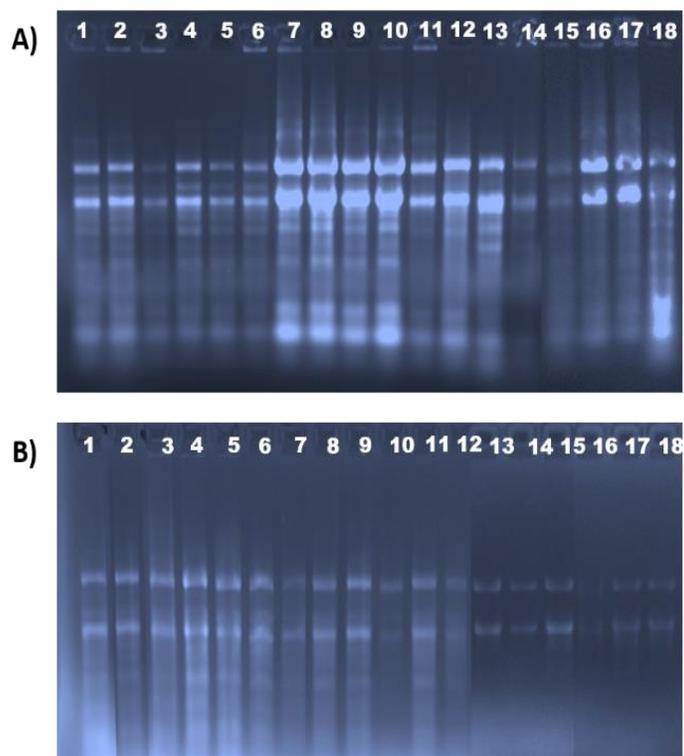


Figura. 5. Integridad de ARN total purificado de micelio *C. lindemuthianum* raza 0 y raza 1472. **A)** ARN total de micelio inducido con pared celular vegetal. **B)** ARN total de micelio inducido con celulosa. Geles de agarosa al 2% en TAE 1X, teñidos con SybrSafe. En los carriles 1-9, ARN de la raza 0; carriles 10-18, ARN de la raza 1472.

7.3 Amplificación del gen *cbhII* por PCR de punto final

En la figura 6 se muestran los productos de amplificación del ADN genómico y ADNc del gen *cbhII* de ambas razas del hongo. El producto de amplificación de ADN genómico obtenido con el juego de oligonucleóticos CocbhIIF1 y CocbhIIR1 mostró el tamaño esperado de aproximadamente 1850 pb (Fig. 6A). Adicionalmente, los productos de amplificación del ADNc obtenidos los juegos de oligonucleótidos CocbhIIF1/cbhIIq-R y cbhIIq-D/CocbhIIR3 mostraron un tamaño esperado de aproximadamente 870 pb y 880 pb (Fig. 6B y C).

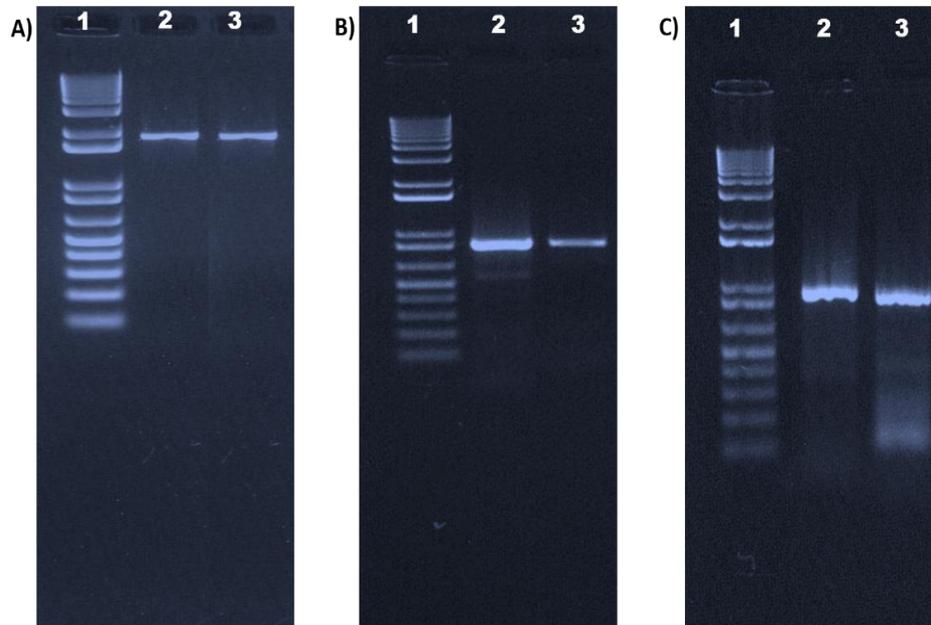


Figura. 6. Productos de amplificación del gen *cbhII*. **A)** *cbhII*-ADN **B)** y **C)**. *cbhII*-ADNc de la raza 0 y la raza 1472 respectivamente. Geles de agarosa al 1.5% en TAE 1X, teñidos con SybrSafe. En Carril 1, marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; carriles 2 y 3 productos de la raza 0 y 1472 respectivamente.

7.4 Análisis de secuencias

Las secuencias de *cbhII*-ADN y *cbhII*-ADNc obtenidas fueron 100% idénticas entre ambas razas, por lo que se sólo se tomó en cuenta una secuencia para los siguientes análisis. La secuencia del gen *cbhII* presentó un tamaño de 1803 pb, cinco intrones y seis exones, con un marco de lectura de 1443 pb. El marco de lectura abierto de la secuencia de CBHII reveló 480 aa deducidos más un codón de paro (Fig. 8), con un péptido señal en el extremo amino con sitio de corte con una probabilidad de 0.7842 entre los residuos A¹⁸ y V¹⁹ (Fig. 7), generando una proteína madura de 462 aa, de acuerdo al análisis con el software en línea SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), con un peso molecular predicho de 48.6 KDa.

Tabla 3. Porcentajes de similitud e identidad de la secuencia de CBHII de *C. lindemuthianum* con secuencias correspondientes del género *Colletotrichum*.

Especie y cepa	Identidad	Similitud	No. de Acceso
<i>C. lindemuthianum</i> 83	100%	100%	MASO02000617.1
<i>C. lindemuthianum</i> 89	99%	99%	MASP02000791.1
<i>C. trifolii</i> 543-2	99%	99%	TDZ49557.1
<i>C. orbiculare</i> MAFF 240422	99%	99%	TDZ16118.1
<i>C. spinosum</i> CBS515.97	98%	99%	TDZ35571.1
<i>C. sidae</i> CBS518.97	96%	97%	QAPF01000097.1
<i>C. cocoides</i> NJ-RT1RT1	83%	90%	LECQ01000036.1
<i>C. cocoides</i> RP180a	83%	90%	LECP01000060.1
<i>C. musae</i> GM20	83%	90%	NWMS01002060.1 NWMS01001655.1
<i>C. sansevieriae</i> Sa-1-2	83%	90%	NJHP01001385.1
<i>C. truncatum</i> MTCC3414	83%	89%	NBAU02000002.1
<i>C. fruticola</i> CGMCC3.17371	82%	89%	XP_031893570.1
<i>C. siamense</i> ICMP 18578	82%	90%	RJJI01000005.1
<i>C. asianum</i> ICMP18580	82%	90%	KAF0325841.1
<i>C. chlorophyti</i> NTL11	81%	87%	OLN96738.1
<i>C. tofieldiae</i> 0861	79%	88%	KZL66544.1
<i>C. incanum</i> MAFF238704	79%	88%	KZL84438.1
<i>C. falcatum</i> Cf671	79%	88%	LPVI01000438.1
<i>C. godetidae</i> C184	79%	87%	LZRM01001173.1
<i>C. lentis</i> CT-30	79%	87%	NWBT01000042.1
<i>C. acutatum</i> 1	79%	87%	LUXP01000004.1
<i>C. shisoii</i> PG-2018a	79%	86%	TQN65299.1

Tabla 3. Continuación. Porcentajes de similitud e identidad de la secuencia de CBHII de *C. lindemuthianum* con secuencias correspondientes del género *Colletotrichum*.

<i>C. gloeosporioides</i> Cg-14	79%	87%	EQB57973.1
<i>C. orchidophilum</i> IMI309357	76%	86%	XP_022480968.1
<i>C. tanacetii</i> BRIP57314	78%	87%	PJEX01000114.1
<i>C. sublineola</i> TX430BB	78%	85%	KDN64379.1
<i>C. higginsianum</i> MAFF305635-REP	77%	85%	TIC90142.1
<i>C. higginsianum</i> IMI 349063	77%	85%	XP_018152797.1
<i>C. graminicola</i> M1.001	77%	85%	XP_008089827.1
<i>C. nymphaeae</i> SA-01	76%	85%	KXH25560.1
<i>C. simmondsii</i> CBS122122	76%	85%	KXH35695.1
<i>C. fioriniae</i> PJ7	76%	85%	EXF81890.1
<i>C. tanacetii</i> BRIP57314	75%	85%	TKW55009.1
<i>C. sp</i> PG-2018a	76%	84%	TQN65299.1
<i>C. salicis</i> CBS607.94	76%	84%	KXH66887.1
<i>C. fructicola</i> Naragc5	73%	80%	ELA31610.1

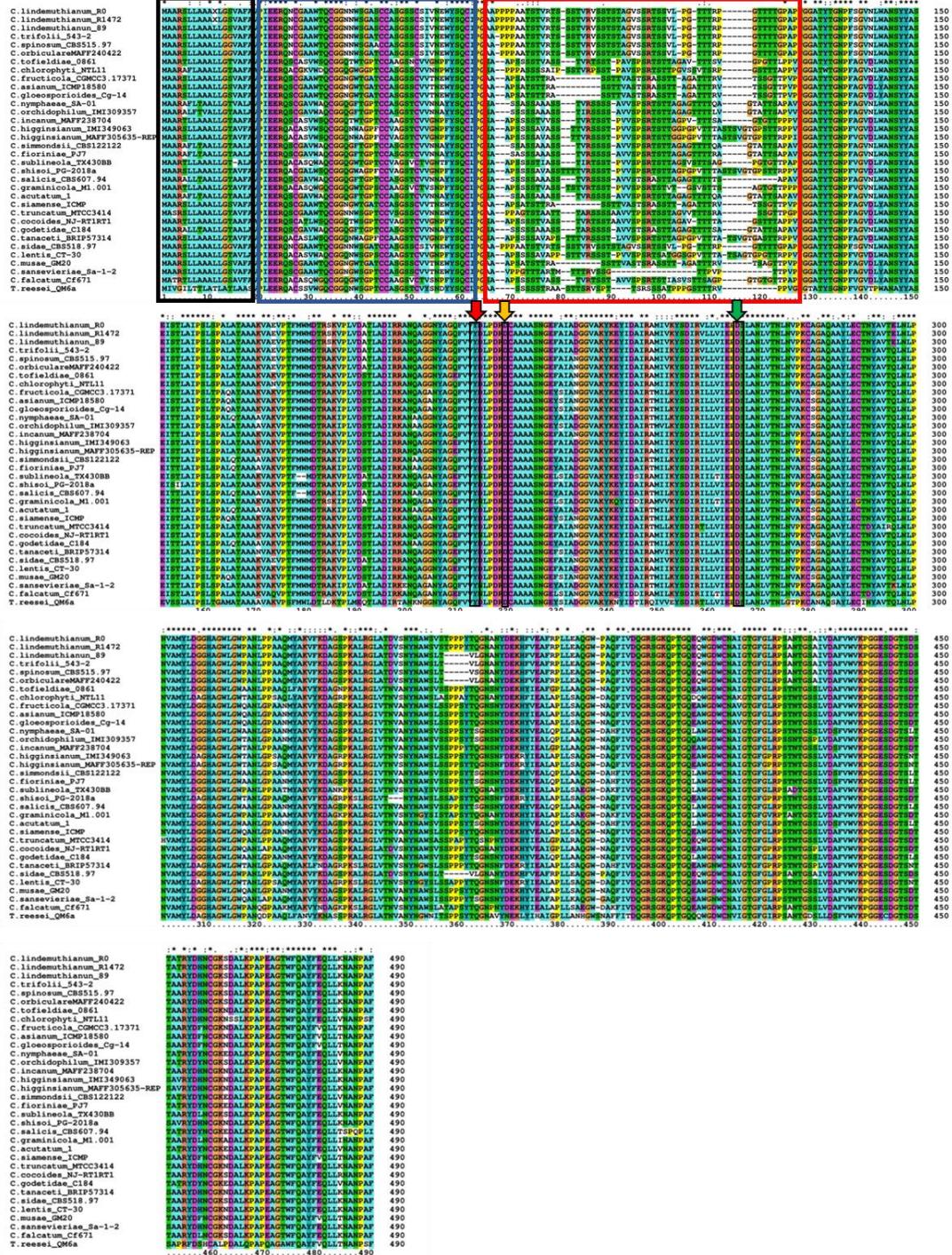


Figura 8. Alineamiento clustal de la secuencia de CBHII de *C. lindemuthianum* con secuencias en especies del género *Colletotrichum* y con *T. reesei*. Se indican los dominios conservados en rectángulos. El péptido señal se señala con el rectángulo negro; el módulo de unión a carbohidratos con el rectángulo azul; el linker con el rectángulo rojo y el dominio catalítico corresponde al resto de la proteína sin rectángulo. Las flechas amarillas y verdes indican los ácidos aspárticos (D175 y D221) y la flecha roja la tirosina (Y169) encontrados en *T. reesei* que funcionan como residuos importantes del sitio catalítico.

7.5 Modelaje 3D de la CBHII

Para el modelaje de la estructura tridimensional de la proteína se utilizó como templado a la CBHII cristalizada de *T. reesei* (PDB: 3CBH[A]), con la cual presentó 73% de identidad. El modelo resultante mostró la topología β -barril con siete β -láminas con la topología del barril TIM modificado característico de la familia GH6 y los dos residuos de aspartato importantes en el sitio catalítico posicionados dentro del túnel del barril similar a la estructura de CBHII de *T. reesei* (Fig. 9 A). Dentro de los parámetros de calidad se obtuvo un diagrama de Ramachandran con 94.62% de ángulos favorable, un Qmean de -1.18, GMQE de 0.74 y $c\beta$ de -0.72, indicando que el modelo obtenido es de alta calidad. Adicionalmente, se realizó un sobrelapado del modelo 3D de CBHII de *C. lindemuthianum* y la estructura 3D de la CBHII de *T. reesei* (Fig. 9 B) utilizada como templado. En la figura 9 C se observa que las estructuras se sobreponen en la mayoría de las regiones, incluyendo los aa del sitio catalítico.

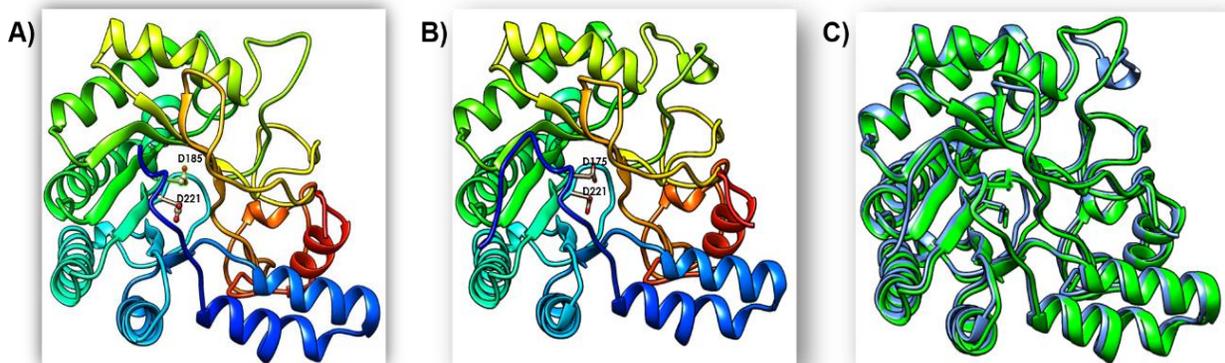


Figura 9. Estructura 3D de la CBHII. **A)** Modelo 3D en *C. lindemuthianum* con los dos residuos de aspartato importantes en la catálisis. **B)** Modelo 3D de *T. reesei*. **C)** Sobreposición de estructuras 3D de *C. lindemuthianum* y *T. reesei*.

7.6 Perfil de transcripción de *cbhII* por qPCR

Como se puede observar en la figura 10, la raza 1472 presentó los mayores niveles de transcrito de *cbhII* que la raza 0, tanto en cultivo con pared celular de frijol como en celulosa. Cuando los hongos fueron cultivados en medio con celulosa, la raza 1472 presentó dos picos de expresión relativa a las 6 h (7.8 veces) y a los 3 días (9 veces) (Fig. 10 A). En contraste, la raza 0 mostró un pico máximo de expresión a los 3 días (2.9

veces) que fue claramente inferior al de la raza 1472. Cuando se utilizó pared celular de frijol como fuente de carbono, la raza 1472 mostró un pequeño pico de expresión a los 3 días (4.1) y un máximo pico de expresión a los 7 días (11.7 veces) que fue el pico mayor detectado en el análisis, mientras que para la raza 0, los niveles de expresión apenas sobrepasaron a los basales con glucosa (Fig. 10B). Sin embargo, en el inicio del análisis (0h) que realmente corresponde a aproximadamente 15 minutos, lo que tarda el procesamiento del micelio en la purificación del ARN total, la raza 0 mostró niveles de expresión ligeramente superiores a la raza 1472. En la figura 11, se muestran los niveles de expresión de ambas razas en ambos sustratos.

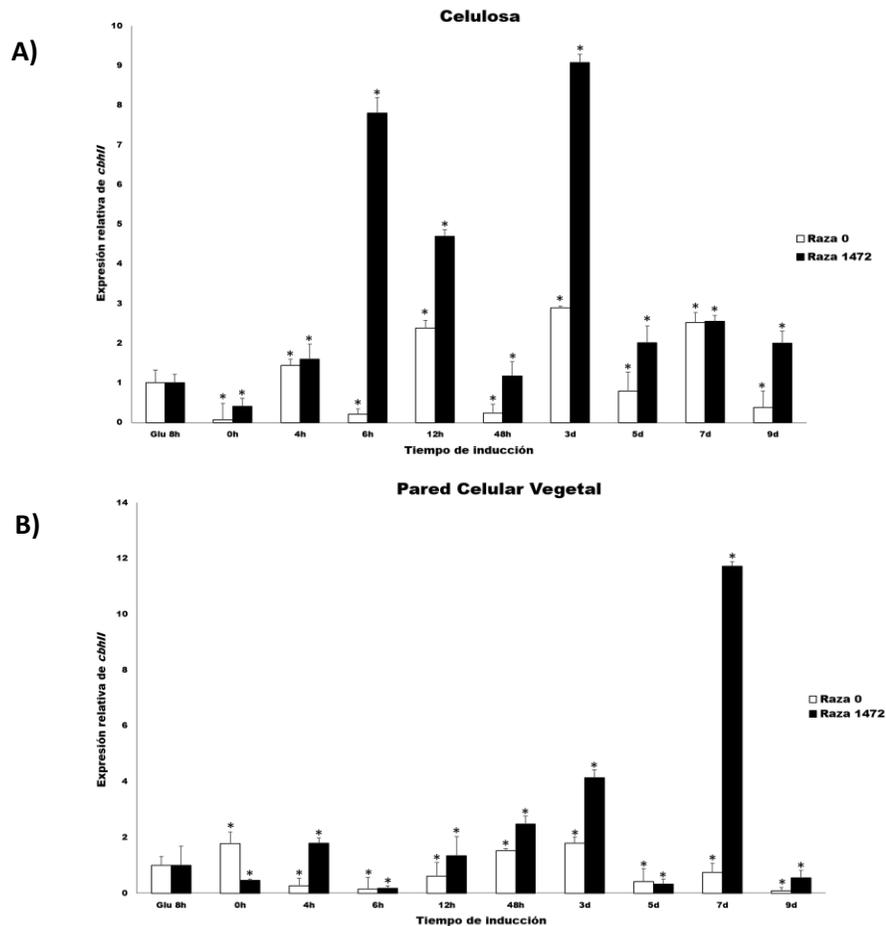


Figura 10. Expresión relativa del gen *cbhII* en la raza 1472 y raza 0 de *C. lindemuthianum*. **A)** celulosa y **B)** pared celular vegetal. Las barras muestran la media de los valores por triplicado \pm el error estándar de los dos eventos independientes, el asterisco sobre las barras representa la diferencia significativa para ($p < 0.05$), en relación a la expresión basal con glucosa a 8 h.

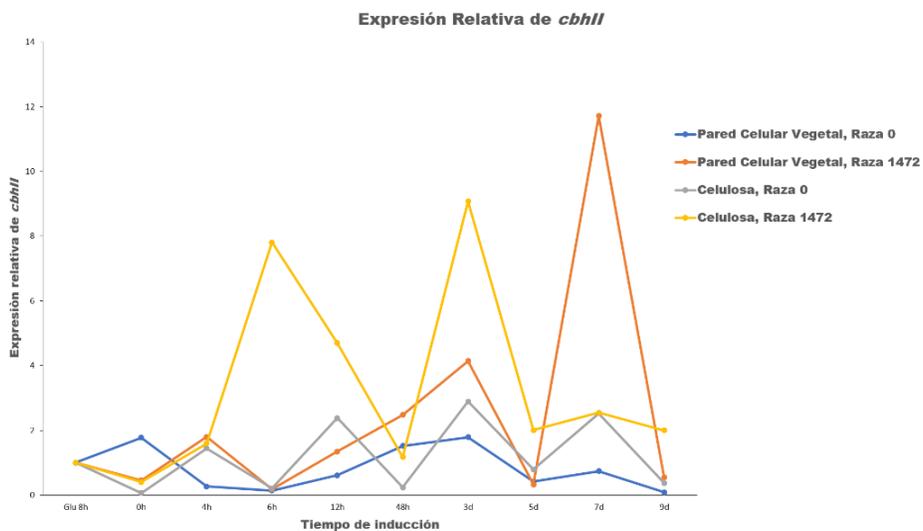


Figura 11. Integración de la expresión del gen *cbhII* de la raza 1472 y raza 0 en cultivos con celulosa y pared celular vegetal.

7.7 Análisis filogenético de la CBHII

Con la finalidad de conocer las relaciones filogenéticas de las CBHII de especies del género *Colletotrichum*, se construyeron árboles filogenéticos donde se incluyeron las secuencias de CBHII de *Colletotrichum* disponibles en NCBI. Como grupo externo se utilizó la secuencia de una CBHII (PDB: CcCel6C) ya caracterizada del basidiomiceto *Coprinopsis cinerea* quien muestra una similitud e identidad de 58% y 43% respectivamente (Liu, *et al.*, 2010).

En el árbol filogenético consenso construido bajo Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB) (Fig. 12), el género *Colletotrichum* parece ser monofilético, presentando una topología con dos clados principales (C1 y C2) con valores de soporte bajos pero aceptables cuando se construyó mediante MV, y en general, altos cuando se construyó con IB. Dichos clados, se encuentran formando una politomía con *C. chlorophyti*. C1 mostró un único linaje basal al resto de linajes que se encuentran agrupados en C2 como como subclados (SC1, SC2 y SC3). De acuerdo al agrupamiento y designación de clados de *Colletotrichum* sp. realizado por Cannon, *et al.*, (2012), C1 agrupó únicamente a especies pertenecientes al clado destructivum (especies patógenas de dicotiledoneas); mientras que en C2, SC1 agrupó al clado gramínicola (especies que infectan exclusivamente monocotiledoneas gramíneas); SC2 agrupó a especies pertenecientes al

clado orbiculare (especies que infectan dicotiledoneas), donde se incluyó a *C. lindemuthianum* teniendo como secuencias hermanas las correspondientes a *C. trifolii*, *C. spinosum*, *C. orbiculare* y *C. sidae*, además, en SC2 aparece la CBHII de *C. cocoides* como una proteína ancestral al clado orbiculare; finalmente, SC3 agrupó a especies pertenecientes a los clado acutatum (especies patógenas de dicotiledoneas) y gloeosporioides (especies que infectan tanto dicotiledoneas como monocotiledoneas). A continuación, para comparar la topología de los modelos 3D de los linajes de proteínas detectados en el árbol filogenético, se modelaron dos estructuras 3D de las CBHII representativas de cada clado según Cannon, *et al.*, (2012) y se sobrelaparon. En la figura 13, se muestran los modelos 3D de cada linaje en los clados del árbol filogenético, donde se observa que la topología de la estructura de la CBHII es muy conservada.

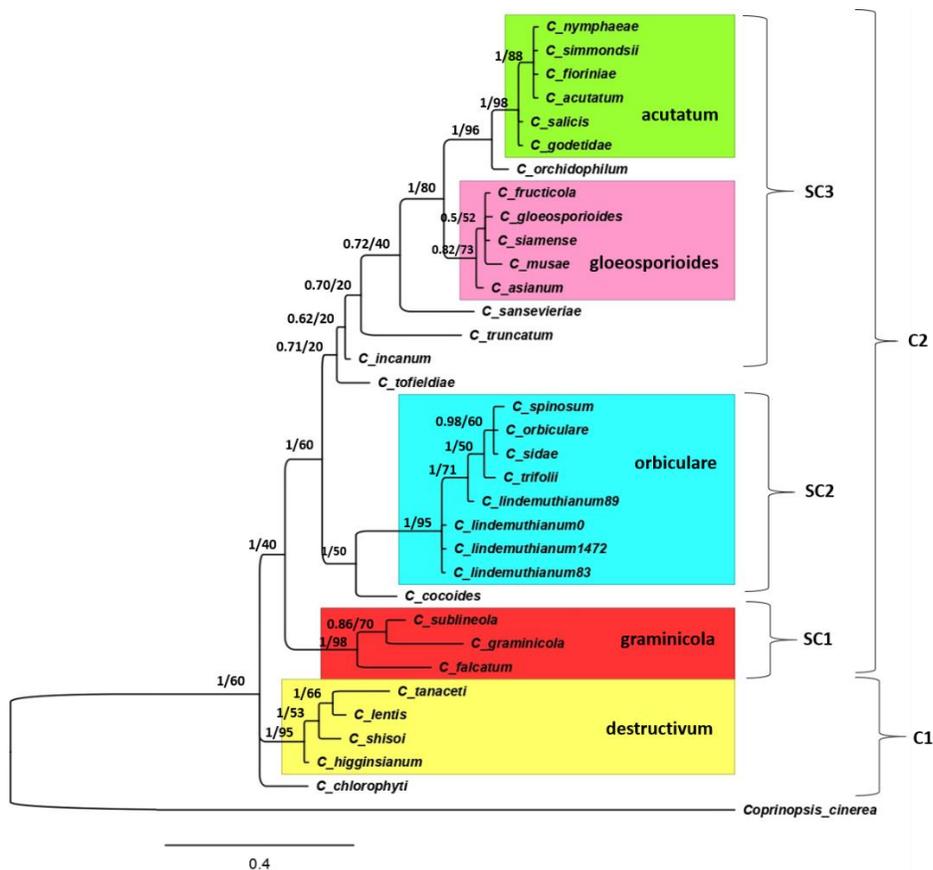


Figura 12. Filograma de la CBHII de especies de *Colletotrichum*, polarizado con una CBHII de *C. cinerea* como grupo externo. Se indican los valores de soporte de las ramas IB/ML. Clados conservados se muestran en las cajas de colores con sus respectivos nombres según Cannon, *et al.*, (2012). Las llaves con abreviaturas indican los principales linajes, divididos en clados y subclados.

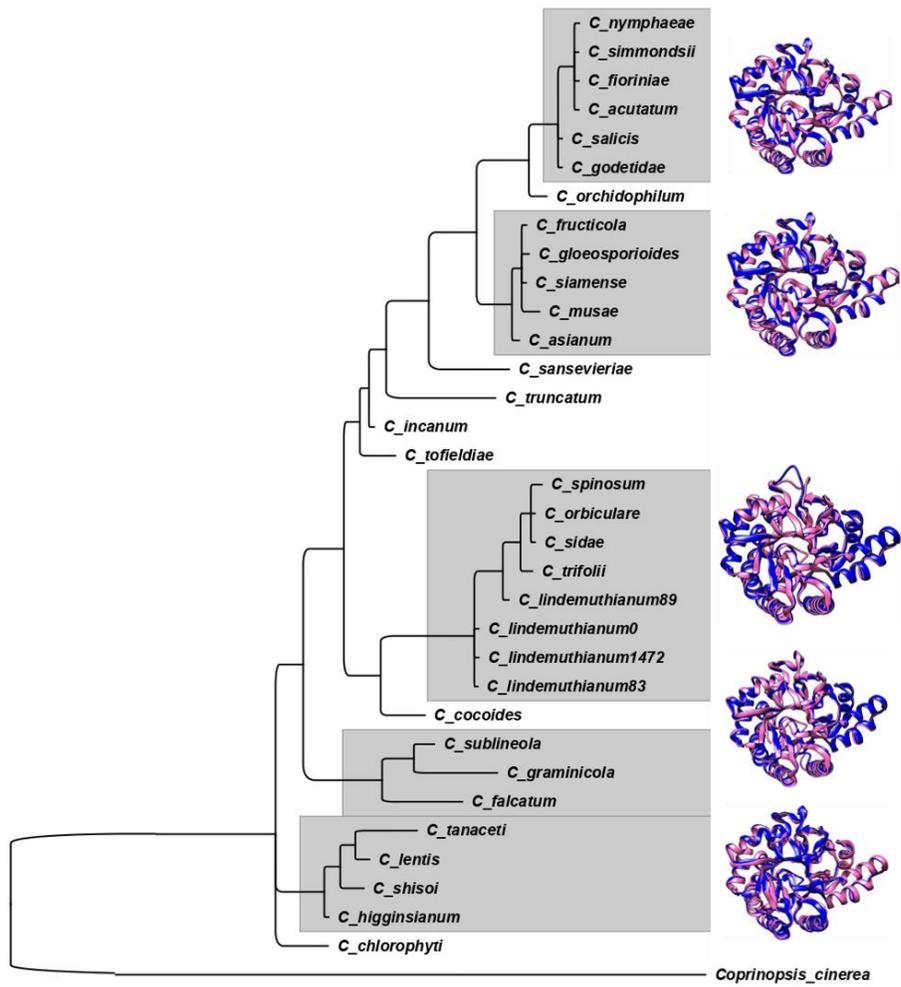


Figura 13. Filograma de la CBHII de especies de *Colletotrichum* con modelos 3D superpuestos, predichos para cada clado o linaje.

8. DISCUSIÓN

El análisis bioinformático-molecular de las secuencias aisladas a partir del ADN genómico y las secuencias del ADNc, mostró que corresponden al gen (*cbhII*) que codifica para la CBHII en las razas patógena 1472 y no patógena 0 de *C. lindemuthianum*. La región estructural de *cbhII* contiene cinco intrones y seis exones y la secuencia es 100% idéntica entre ambos hongos. El gen con un marco de lectura de 1478 pb, codifica para una proteína de secreción de 475 aa con un péptido señal de 17 aa y proteína madura de 456 aa. La secuencia de la proteína presenta un módulo de unión a carbohidrato entre los residuos 24-62, la secuencia linker en 63-106 y el dominio catalítico en los residuos 107-475, donde se identificaron dos residuos (D²²¹ y D¹⁷⁵) del sitio catalítico de acuerdo a lo reportado para la CBHII de *T. reesei* (Koivula, *et al.*, 1996; Koivula, *et al.*, 2002).

El modelo 3D de la proteína mostró la topología β -barril con siete β -láminas con la topología del barril TIM modificado característico de la familia GH6 (Rouvinen, *et al.* 1990; Liu, *et al.*, 2010; Kubicek, 2013c) y los dos residuos de aspartato del sitio catalítico posicionados dentro del túnel del barril, altamente similar a la estructura cristalizada de CBHII de *T. reesei*, con la cual presentó 73% de identidad (Rouvinen *et al.* 1990). Adicionalmente, el solapamiento de la estructura 3D de la CBHII de *C. lindemuthianum* con la proteína cristalizada de *T. reesei*, mostró alta similitud en el plegamiento y posición de los residuos catalíticos, indicando que la estructura de estas proteínas es muy conservada, incluso entre diferentes especies de hongos filamentosos.

El alineamiento de la secuencia de nucleótidos y aa de la CBHII de *C. lindemuthianum* con las secuencias correspondientes en los genomas de especies de *Colletotrichum* reportados en bases de datos (NCBI), mostró que se trata de un gen muy conservado que no ha sufrido diversificación (múltiples copias). Un análisis preliminar con un árbol de distancias realizado con secuencias de CBHII de las diferentes especies comparadas en Blast de NCBI, mostró un patrón de evolución parecido a lo encontrado con las especies de *Colletotrichum*.

También, mediante el alineamiento clustal se estableció que las CBHII de las especies del género *Colletotrichum* contienen dominios muy conservados, incluyendo la secuencia

del péptido señal para secreción. En general en todas las secuencias se identificaron el módulo de unión a carbohidrato entre los residuos, la secuencia linker y el dominio catalítico con los dos residuos de aspartato involucrados en la catálisis; D¹⁷⁵ y D²²¹ en *T. reesei* (Koivula, *et al.*, 2002) y D¹⁹² y D²³⁸ en *C. lindemuthianum* (raza 0 y raza 1472). También, en todas las secuencias se identificó un residuo de tirosina conservado (Y¹⁶⁹ en *T. reesei*) cuya participación en la configuración del anillo de glucosa para hacerla más susceptible a la reacción catalítica fue demostrada por mutación de la enzima en *T. reesei* (Koivula, *et al.*, 1996) y que en *C. lindemuthianum* corresponde al residuo Y¹⁸.

El perfil de transcripción de *cbhII* de *C. lindemuthianum* por qPCR, mostró resultados similares a los observados para genes de xilanasa *xyl1* (Conejo-Saucedo, *et al.*, 2016), pectin lisa 2 *pnl2* (Lara-Márquez, *et al.*, 2011), galactanasa *ebg* (Villa-Rivera, *et al.*, 2017b), arabinofuranosidasa *abfA* (Villa-Rivera, 2017), y β -xilosidasa *bxyloA* (Campos-Díaz 2019). Se detectaron niveles basales del transcrito de *cbhII* en ambas razas crecidas en glucosa, coincidiendo con el proceso de represión catabólica por glucosa (Acosta-Rodríguez, *et al.*, 2005; Lara-Márquez *et al.*, 2011; Tani, *et al.*, 2014; Conejo-Saucedo, *et al.*, 2016; Villa-Rivera, *et al.*, 2017b; Villa-Rivera, 2017).

Lo anterior es consistente con el reporte de producción basal de celulasas en *T. reesei*, y *C. lindemuthianum* 1472 (Carle-Urioste, *et al.*, 1997, Acosta-Rodríguez, *et al.*, 2005). Por otro lado, se sabe que la expresión de genes de celulasas y xilanasas en *T. reesei* y otros hongos, está regulada negativamente por los factores de transcripción ACEI y CreA, y se han encontrado sitios de unión al ADN en la región regulatoria del gen *ebg* y *abfA* de *C. lindemuthianum* y de la mayoría de los genes *ebg* y *abfA* de especies de *Colletotrichum* (Aro, *et al.* 2005; Villa-Rivera, *et al.* 2017b; Villa-Rivera, 2017). Por lo tanto, es posible que el gen *cbhII* esté regulado por ACEI y CreA. También, se ha descrito que en *Aspergillus niger* CreA funciona directa o indirectamente con la acumulación de secuencias cortas de ARN antisentido en presencia de glucosa desarrollando condiciones de represión catabólica (Delmas, *et al.*, 2012).

Como comprobación de la hipótesis de este estudio y de manera similar a lo observado en los perfiles de expresión de los genes *xyl1*, *pnl2*, *ebg*, *abfA* y *bxyloA* (Lara-Márquez, *et al.*, 2011; Conejo-Saucedo, *et al.* 2016; Villa-Rivera, *et al.*, 2017b; Villa-Rivera, 2017;

Campos-Díaz, 2019), el gen *cbhII* mostró una expresión diferencial entre las razas patógena 1472 y la no patógena 0 de *C. lindemuthianum*. En presencia de celulosa, la raza patógena 1472, presentó un rápido incremento de mayores niveles de transcripción (a las 6 h, 7.8 veces y a los 3 días, 9 veces), que la raza no patógena 0 (a los 3 días, 2.9 veces). Este resultado sugiere que la celobiosa, producto de degradación de la CBHII secretada por los hongos a niveles basales, induce de la expresión de *cbhII*.

En presencia de paredes celulares de frijol, la raza 1472 presentó el nivel de transcrito más alto (a los 7 días, 12 veces) detectado en el análisis, mientras que la raza 0 se mantuvo en niveles basales, sugiriendo que los productos de degradación de la hemicelulosa fueron mejores inductores de expresión del gen que los de la celulosa. Estos resultados sugieren que la expresión diferencial de *cbhII* entre estos hongos de la misma especie, se debe a la diferencia en su estilo de vida.

En la interacción planta-patógeno, una rápida respuesta en la secreción de enzimas degradadoras de pared celular garantiza la efectividad del proceso de invasión del tejido vegetal. Por el contrario, a pesar de que la raza no patógena presenta los mismos genes que la patógena, no parece requerir de una rápida expresión de genes involucrados en la degradación de los polisacáridos de la pared vegetal y en algunos casos tampoco requiere de altos niveles de actividad enzimática para obtener sus nutrientes (Piñón-Escobedo, 2005; Conejo-Saucedo, *et al.*, 2016). Por otro lado, la diferencia en los tiempos de expresión de *cbhII* entre ambos hongos se debe a que el producto de degradación de la celulosa, celobiosa, induce la rápida expresión del gen, en contraste, la degradación de la celulosa inmersa en el sustrato complejo que es la pared celular vegetal de frijol, implica la degradación del resto de polisacáridos como la pectina y hemicelulosa, para poder acceder a la celulosa (Lynd, *et al.*, 2002; Horn, *et al.* 2012).

Se ha encontrado que los productos de degradación de enzimas que degradan componentes de la pared celular más externos o más expuestos, activan la transcripción de otros genes de enzimas que degradan componentes de la pared celular más internos (Gutiérrez-Rojas, 2015). Por ejemplo, para *A. niger* se ha reportado que los productos de degradación de la hemicelulosa como D-xilosa y L-arabinosa inducen la producción de algunas xilanasas y celulasas (Gutiérrez-Rojas, 2015; Khosravi, *et al.*, 2019). De acuerdo

a un estudio transcriptómico y de expresión por qPCR realizado en cepas mutantes de *A. niger* ($\Delta XlnR$ y $\Delta XkiA$), los genes de celobiohidrolasa *cbhA* y *cbhB*, están poco expresados en los puntos temprano y tardíos de crecimiento en cascarras de soya, sin embargo en puntos tardíos los mismos genes son sobreexpresados en mutantes $\Delta XkiA$; este estudio sugiere que *XkiA* que codifica para una xiluloquinasa regula a *XlnR* pues su mutante permite la acumulación de monosacáridos como D-xilosa y L-arabinosa, activadores de *XlnR* (Khosravi, *et al.*, 2019). Considerando que el análisis de la región regulatoria de los genes *ebg* y *abfA* de *C. lindemuthianum* y de otras especies de *Colletotrichum*, reveló sitios de unión para los reguladores positivos *Xlnr* y *Gal4* de la expresión de genes de enzimas celulolíticas y xilanolíticas (Villa-Rivera *et al.* 2017b; Villa-Rivera, 2017), es posible que los genes de *cbhII* también presenten sitios de unión para estos reguladores.

En el análisis filogenético, el árbol consenso mostró probable monofilia para el género *Colletotrichum*, y aunque se presenta una politomía suave de los clados principales con la secuencia de *C. chlorophyti*, esto puede sugerir una falta de datos únicamente (Hoelzer & Melnick, 1994). En general, las secuencias se agruparon en dos linajes principales, que considerando que se trata de proteínas muy conservadas, se esperaría que sus genes sean ortólogos, mostrando una topología de monofilia para el género. A pesar de la politomía ya mencionada, el análisis filogenético corroboró que los genes *cbhII* de *Colletotrichum* no presentan duplicaciones, indicando que son secuencias altamente conservadas. Adicionalmente, los clados o linajes de *CBHII* de las especies analizadas, coincidieron con los clados taxonómicos descritos por Cannon, *et al.* (2012), que se relacionan con el tipo de hospederos (dicotiledoneas o monocotiledoneas) a los cuales infectan las especies patógenas de *Colletotrichum*.

Un patrón similar se ha observado para pectin liasa 2 (Lara-Márquez, *et al.*, 2017), xilanasa (Conejo-Saucedo, *et al.*, 2017), endo- β -(1,6)-D-galactanasa (Villa-Rivera, *et al.* 2017b) y α -L-arabinofuranosidasa (Villa-Rivera, 2017), sugiriendo la importancia que tiene la composición y estructura de la pared celular de las plantas hospederas en la evolución de las enzimas de los hongos patógenos para el proceso de degradación. Finalmente, la exploración del modelaje 3D de proteínas representativas de cada linaje

detectado en el árbol filogenético, reveló alta conservación en el plegamiento y estructura de las proteínas, sugiriendo una fuerte selección sobre los genes de estas proteínas.

9. CONCLUSIONES

- Las razas patógena 1472 y no patógena 0 de *C. lindemuthianum*, presentan un gen (*cbhII*) de celobiohidrolasa II, 100% idéntico en su región estructural.
- Las especies del género *Colletotrichum* analizadas presentan un solo gen de celobiohidrolasa II putativa
- Las CBHII de las especies del género *Colletotrichum* contienen dominios muy conservados: péptido señal para secreción, el módulo de unión a carbohidrato entre los residuos, la secuencia linker, el dominio catalítico con los dos residuos de aspartato, involucrados en la catálisis y un residuo de tirosina que participa en la configuración del anillo de glucosa para hacerla más susceptible a la reacción catalítica.
- La estructura 3D de la CBHII de *C. lindemuthianum*, mostró la topología β -barril con siete β -láminas, congruente con la topología del barril TIM modificado característico de la familia GH6.
- El sobrelapamiento de la estructura 3D de CBHII de *C. lindemuthianum* y la proteína cristalizada de *T. reesei*, mostró una alta similitud en el plegamiento y la posición de los dos residuos D²²¹ y D¹⁷⁵ en el sitio catalítico dentro del tunel del barril.
- Las razas patógena 1472 y no patógena 0 de *C. lindemuthianun* presentan un perfil de transcripción de *cbhII* basal en cultivo con glucosa, congruente con represión catabólica.
- Las razas patógena 1472 y no patógena 0 de *C. lindemuthianun* presentan un perfil de transcripción de *cbhII* diferencial, en cultivo con celulosa y pared celular vegetal de *P. vulgaris*.
- La raza patógena muestra elevada transcripción de *cbhII*, mientras que en la raza no patógena se observan niveles bajos (celulosa), o basales (pared celular). Es decir, presentan una expresión diferencial del gen.
- El análisis filogenético de CBHII de especies del género *Colletotrichum*, mostró la presencia de tres clados o linajes sin eventos de duplicación genética.
- La estructura 3D entre los linajes de CBHII de especies de *Colletotrichum* es altamente conservada.

10. LITERATURA CITADA

- Acosta-Rodríguez, I., C. Piñón-Escobedo, M. G. Zavala-Páramo, E. López-Romero, y 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, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 87(4): 301–310.
- Alfaro, M. E., & J. P. Huelsenbeck. 2006. Comparative performance of Bayesian and AIC-based measures of phylogenetic model uncertainty. *Systematic Biology*, 55(1): 89-96.
- Aro, N., T. Pakula, M. Penttilä. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4):719-39.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingstom, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl. 1999. *Short protocols in molecular biology*. Wiley Y Sons, Inc. 4a ed. 1104 pp.
- Bauer, S., P. Vasu, S. Persson, A. J. Mort y C. R. Somerville. 2006. Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30): 11417–11422.
- Balardin, R. S., A. M. Jarosz, J. D. Kelly. (1997). Virulence and Molecular Diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central, and North America. *Phytopathology*, 87(12): 1184–1191.
- Bechinger, C., K. F. Giebel, M. Schnell, P. Leiderer, H. B. Deising y M. Bastmeyer. 1999. Optical Measurements of Invasive Forces Exerted by Appressoria of a Plant Pathogenic Fungus. *Science*, 285(5435): 1896–1899.
- Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5): 355–383.

- Biasini, M., S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. Gallo-Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli y T. Schwede. 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(1): 252-258.
- Birnboim, H. C. y J. Dolly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7:1513–1523.
- Brevern de, A.G., C. Etchebest y S. Hazout. 2000. Bayesian probabilistic approach for predicting backbone structures in terms of protein blocks. *Proteins* 41: 271-287
- Brunner P. C., S. F. Torriani, D. Croll, E. H. Stukenbrock y B. A. McDonald. 2013. Coevolution and life cycle specialization of plant cell wall degrading enzymes in a hemibiotrophic pathogen. *Molecular biology and evolution*, 30:1337-1347.
- Burton, R. A., M. J. Gidley y G. B. Fincher. 2010. Heterogeneity in the chemistry. Structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology*, 6(10): 724–732.
- Campos-Díaz, J. P. 2019. Aislamiento y análisis bioinformático de un gen de β -xilosidasa de *Colletotrichum lindemuthianum* (Tesis de maestría). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- Cannon, P. F., U. Damm, P. R. Johnston y B. S. Weir. 2012. *Colletotrichum*—current status and future direction. *Studies in Micology*, 73:181-213.
- Carle-Urioste JC, J. Escobar-Vera, S. El-Gogary, F. Henrique-Silva, E. Torigoi, O. Crivellaro, A. Herrera-Estrella, H. El-Dorry. 1997. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *J Biol Chem*. 272(15):10169-74.
- Choi, J., K-T Kim, J. Jeon, Y-H Lee. 2013. Fungal plant cell wall-degrading enzyme database: a platform for comparative and evolutionary genomics in fungi and Oomycetes. *BMC Genomics*, 14(5):57.

- Choi, H. W., & D. F. Klessig. 2016. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology*, 16(1), 1–10.
- Chow, C. M., E. Yague, S. Raguz, D. A. Wood y C. F. Thurston. 1994. The *cel3* gene of *Agaricus bisporus* codes for a modular cellulase and is transcriptionally regulated by the carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8): 2779–2785.
- Conejo-Saucedo, U., H. Cano-Camacho., E. López-Romero, M. G. Villa-Rivera, A. Lara-Márquez, A., M. G. Zavala-Páramo. 2016. Cloning and characterization of an endo- β -1,4-xylanase gene from *Colletotrichum lindemuthianum* and phylogenetic analysis of similar genes from phytopathogenic fungus. *African Journal of Microbiology Research*, 10(32): 1292-1305
- Cosgrove, D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(11): 850–861.
- Crouch, J., R. O’Connell, P. Gan, E. Buiate, M. F. Torres, L. Beirn, & L. Vaillancourt. 2014. The genomics of *Colletotrichum*. In *Genomics of plant-associated fungi: monocot pathogens* (pp. 69-102). Springer, Berlin, Heidelberg.
- De Queiroz, C. B., H. L. N. Correia, M. F. Santana, D. S. Batista, P. M. Vidigal, S. H. Brommonschenkel, M. de Queiroz. 2019. The repertoire of effector candidates in *Colletotrichum lindemuthianum* reveals important information about *Colletotrichum* genus lifestyle. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(5): 2295–2309.
- Dean, R.; v. K. A. Jan; Z.A. Pretorius; K.I.M.E. Hammond-kosack; A.D.I. Pietro; P.D. Spanu; J.J. Rudd; M. Dickman; R. Kahmann; J. Ellis; G.D. Foster. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol*, 13 (4): 414-430
- Delmas, S., S. T. Pullan, S. Gaddipati, M. Kokolski, S. Malla, M. J. Blythe, D. B. Archer. 2012. Uncovering the Genome-Wide Transcriptional Responses of the Filamentous Fungus *Aspergillus niger* to Lignocellulose Using RNA Sequencing. *PLoS Genetics*, 8(8).
- Diéguez-Uribeondo, J., H. Förster, A. Soto-Estrada y J. E. Adaskaveg. 2005. Subcuticular-Intracellular, Hemibiotrophic and Intercellular Necrotrophic Development of *Colletotrichum acutatum* on Almond. *Phytopathology*, 95(7): 751–758.

- Espagne, E., O. Lespinet, F. Malagnac, D. C. Silva, O. Jaillon, M. B. Porcel, A. Couloux, J. M. Aury, B. Ségurens, J. Poulain, V. Anthouard, S. Grossetete, H. Khalili, E. Coppin, M. Déquard-Chablat, M. Picard, V. Contamine, S. Arnaise, A. Bourdais, V. Berteaux-Lecellier, D. Gautheret, R. P. Vries de, E. Battaglia, P. M. Coutinho, E. GJ Danchin, B. Henrissat, R. EL Khoury, A. Sainsard-Chanet, A. Boivin, B. Pinan-Lucarré, C. H. Sellem, R. Debuchy, P. Wincker, J. Weissenbach y P. Silar. 2008. The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biology*, 9(5): 77.
- French, E. R. y T. T. Herbert. 1982. Métodos de Investigación Fitopatológica. IICA. San José, Costa Rica. 289 pp.
- Fry SC. 2006. The growing plant cell wall chemical and metabolic analysis. Caldwell, NJ: Blackburn Pr.
- Gao, L., F. Wang, F. Gao, L. Wang, J. Zhao y Y. Qu. 2011. Purification and characterization of a novel cellobiohydrolase (PdCel6A) from *Penicillium decumbens* JU-A10 for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 102(17): 8339–42.
- González, M., R. Rodríguez, M.E. Zavala, J. L. Jacobo, F. Hernández, J. Acosta, O. Martínez and J. Simpson. 1998. Characterization of mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 88:292-299.
- Gutiérrez-Rojas, I., N. Moreno-Sarmiento y D. Montoya. 2015. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1): 1–12.
- Hall, T. 2005. Bioedit v 7.0. 5. Ibis Therapeutics, a division of Isis Pharmaceuticals. Carlsbad.
- Harhangi, H. R., A. C. J. Freelove, W. Ubhayasekera, M. van Dinther, P. J. M. Steenbakkens, A. Akhmanova, ... y H. J. M de Camp. 2003. Cel6A, a major exoglucanase from the cellulosome of the anaerobic fungi *Piromyces* sp. E2 and *Piromyces equi*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1628(1): 30–39.

- Hoelzer, G. A., & D. J. Melnick. 1994. Reply from GA Hoelzer and DJ Melnick. *Trends in ecology & evolution*, 9(8), 298-299.
- Horn, S. J., G. Vaaje-Kolstad, B. Westereng y V. G.Eijsink. 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1): 45.
- Hui, J. P. M., T. C. White y P. Thibault. 2002. Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei*. *Glycobiology*, 12(12): 837–849.
- Igarashi, K., M. Maruyama, A. Nakamura, T. Ishida, M. Wada y M. Samejima. 2012. Degradation of Crystalline Celluloses by *Phanerochaete chrysosporium* Cellobiohydrolase II (Cel6A) Heterologously Expressed in Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*, 110: 105–110.
- Ilmén, M., R. Den Haan, E. Brevnova, J. McBride, E. Wiswall, A. Froehlich, A. Koivula, S. P. Voutilainen, M. Siika-aho, D. C. Grange la, N. Thorngren, S. Ahlgren, M. Mellon, K. Deleault, V. Rajgarhia, W. H. van Zyl y M. Penttilä. 2011. High level secretion of cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1): 30-34.
- Joseph, A. P., G. Agarwal, S. Mahajan, J. C. Gelly, L. S. Swapna, B. Offmann y F. Cadet. 2010. A short survey on protein blocks. *Biophys Rev* 2: 137-145
- Keegstra, K. 2010. Plant cell walls. *Plant Physiology*, 154(2): 483–486.
- Khosravi, C., J. E. Kowalczyk, T. Chroumpi, E. Battaglia, M. V. Aguilar Pontes, R. P. De Vries, R. 2019. Transcriptome analysis of *Aspergillus niger xlnR* and *xkiA* mutants grown on corn Stover and soybean hulls reveals a highly complex regulatory network. *BMC Genomics*, 20(1), 1–16.
- Koivula, A., T. Reinikainen, L. Ruohonenz, A. Valkeajärvi, M. Claeysens, O. Teleman, G. J. Kleywegt, M. Szardenings, J. Rouvinen, T. A. Jones y T. T. Teeri. 1996. The active site of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II: the role of tyrosine 169. "Protein Engineering, Design and Selection", 9(8), 691–699.

- Koivula, A., L. Ruohonen, G. Wohlfahrt, T. Reinikainen, T. T. Teeri, K. Piens, M. Claeysens, M. Weber, A. Vasella, D. Becker, M. L. Sinnott, J. Y Zou, G. J. Kleywegt, M. Szardenings, J. Ståhlberg y T. A. Jones. 2002. The Active Site of Cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei*: The Roles of Aspartic Acids D221 and D175. *Journal of the American Chemical Society*, 124(34): 10015– 10024.
- Kubicek, C. P. 2013a. Production of cellulases and hemicelulases by Fungy. In Kubicek, C. P. (Ed.). *Fungy and Lignocellulosic Biomass*. Wiley-Blackwell. pp. 165–183.
- Kubicek C. P. 2013b. Production of Fermentable Sugars from Lignocellulose. In Kubicek C. P. (Ed.). *Fungy and Lignocellulosic Biomass*. Wiley-Blackwell. pp.185–200.
- Kubicek C. P. 2013c. The tools-Part 1: Enzymology of Cellulose Degradation. In Kubicek C. P. (Ed.). *Fungy and Lignocellulosic Biomass*. Wiley-Blackwell. pp. 45–68.
- Kubicek C. P., L. Trebol S. y N. L. Glass. 2014. Cell Wall-degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. *Phytopathol*, 52:427–451.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Kuramae-Izuoaka, E. E. 1997. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. *UNIMAR*, 19(3): 683–689.
- Liang, L., S. Tanaka, L. Lo Presti, G. Schweizer, M. Tollot, A. Zuccaro, R. Kahmann. 2015. Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66(1), 513–545.
- Liu, Y., M. Yoshida, Y. Kurakata, T. Miyazaki, K. Igarashi, M. Samejima, K. Fukuda, A. Nishikawa y T. Tonozuka. 2010. Crystal structure of a glycoside hydrolase family 6 enzyme, CcCel6C, a cellulase constitutively produced by *Coprinopsis cinerea*. *FEBS Journal*, 277(6): 1532–1542.

- Longoni, P., M. Rodolfi, L. Pantaleoni, E. Doria, L. Concia, A. M. Picco y R. Cella. 2012. Functional analysis of the degradation of cellulosic substrates by a *Chaetomium globosum* endophytic isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10): 3693–3705.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. Van-Zyl y S. Isak. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY MADRAS*, 66(3).
- Martínez-Anaya, C., E. Balcázar-López, E. Dantán-González y J. Folch-Mallol. 2008. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *ALAM*, 50(3): 119-131
- Mendgen, K. y M. Hahn. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*, 7(8), 352–356.
- Mengiste, T. (2012). *Plant Immunity to Necrotrophs*, (50): 1–28.
- Morelos-Martínez, I. 2016. aislamiento y caracterización parcial del gen de la celobiohidrolasa II de *Colletotrichum lindemuthianum* raza 1472 (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- Moriya, T., M. Watanabe, N. Sumida, K. Okakura y T. Murakami. 2003. Cloning and Overexpression of the *avi2* Gene Encoding a Major Cellulase Produced by *Humicola insolens* FERM BP-5977. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(6): 1434–1437.
- O’Connell, R. J., M. R Thon, S. Hacquard, S. G. Amyotte, J. Kleemann, M. F. Torres, U. Damm, E. A. Buiate, L. Epstein, N. Alkan, J. Altmüller, L. Alvarado- Balderrama, C. A. Bauser, C. Becker, B. W. Birren, Z. Chen, J Choi, J. A. Crouch, J. P. Duvick, M. A. Farman, P. Gan, D. Heiman, B. Henrissat, R. J. Howard, M. Kabbage, C. Koch, B. Kracher, Y. Kubo, A. D. Law, M. H. Lebrun, Y. H. Lee, I. Miyara, N. Moore, U. Neumann, K. Nordström, D. G. Panaccione, R. Panstruga, M. Place, R. H. Proctor, D. Prusky, G. Rech, R. Reinhardt, J. A. Rollins, S. Rounsley, C. L. Schardl, D. C. Schwartz, N. Shenoy, K. Shirasu, U. R. 44 Sikhakolli, K. Stüber, S. A. Sukno, J. A. Sweigard, Y. Takano, H. Takahara, F. Trail, H. C. van der Does, L. M. Voll, I. Will, S. Young, Q. Zeng, J. Zhang, S. Zhou, M. B. Dickman, P.

- Schulze-Lefert, E. V. L. van Themaat, L. J. Ma y L. J Vaillancourt. 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, 44(9): 1060-1067.
- Padder, B. A., K. Kamfwa, H. E. Awale, J. D. Kelly. 2016. Transcriptome Profiling of the *Phaseolus vulgaris-Colletotrichum lindemuthianum* Pathosystem. *PloS one*, 11(11): 1–26.
- Pauly, M. y K. Keegstra. 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant Journal*, 54(4), 559–568.
- Peng, L. 2002. Sitosterol-beta -glucoside as Primer for Cellulose Synthesis in Plants. *Science*, 295(5552), 147–150.
- Perfect, S. E. y J. R. Green. 2001. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 2(2): 101–108.
- Perfect, S. E., H. B. Hughes, R. J. O’Connell y J. R. Green. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 27(2-3): 186–198.
- Pettersen, E. F, T.D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C Meng y T. E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13): 1605–1612. Polaina, J. 2004. Estructura, función e ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos. *Mensaje Bioquímico*, 28: 61–76.
- Piñón-Escobedo Carlos. 2005. Inducción de actividad de xilanasas y β -xilosidasas en dos razas del hongo fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum* (tesis de maestría). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto.
- Presti, L. Lo, D. Lanver, G. Schweizer, S. Tanaka, L. Liang, M. Tollot, R. Kahmann. 2015. Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annual review of plant biology*, (66): 513-545.
- Rambaut, A. 2014. FigTree v1.4.2. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

- Riquelme, M., & E. Sánchez-León. 2014. The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Current opinion in microbiology*, (20): 27-33.
- Rodríguez-Guerra, R., J. A. Acosta-Gallegos, M. M. Gallegos-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(1): 101–114.
- Rodríguez-Guerra, R., M. T. Ramírez-Rueda, M. Cabral-Enciso, M. García-Serrano, Z. Lira-Maldonado, R. G. Guevara-González, M. González-Chavira y J. Simpson. 2005. Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. *Mycologia*, 97(4): 793–803
- Rawlings, S. L., R. J. O’Connell y 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(4-6): 110–119.
- Roca M., M. G. Davide, L. C. y M. C Mendes-Costa. 2003. Cytogenetics of *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* ft. *phaseoli* sp). *Fitopatologia Brasileira*, 28(4): 367–373.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, y J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542.
- Rouvinen, J., T. Bergfors, T. Teeri, J. K. C. Knowles y T. A. Jones. 1990. Three- Dimensional Structure of *Trichoderma reesei*. *Science*, 276:340-346 Sales, S. 1991. Extracción de plásmidos (Midi-Prep) con Bromuro de Etidio. *Biotechniques*, 10(6), 726.
- Sánchez-García, M. M., A. Flores-Olivas, A. Sánchez-Arizpe, S. Pineda-Rodríguez, G. López-Jiménez, S. Fraire-Velásquez, E. R. Garrido-Ramírez, J. A. Acosta-Gallegos, J. S. Williamson y R. Rodríguez-Guerra. 2009. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* en

- Oaxaca y San Luis Potosí, México, y resistencia en genotipos de frijol. *Agricultura Técnica En México*, 35(1): 46–57.
- Sandhu, A. P. S., G. S. Randhawa y K. S. Dhugga. 2009. Plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Molecular Plant*, 2(5): 840–850.
- Sanger, F., y A. R. Coulson. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 94: 441–448.
- Sato, S., T. Kato, K. Kakegawa, T. Ishii, Y. G. Liu, T. Awano, K. Takabe, Y. Nishiyama, S. Kuga, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, D. Shibata. 2001. Role of the putative membrane-bound endo-1,4-beta-glucanase KORRIGAN in cell elongation and cellulose synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, 42(3): 251–263.
- Selin, C., T. R. de Kievit, M. F. Belmonte, W. G. Fernando. 2016. Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: progress and challenges. *Frontiers in microbiology*, (7): 600.
- Somerville, C. 2006. Cellulose Synthesis in Higher Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22(1): 53–78.
- Song, J., B. Liu, Z. Liu y Q. Yang. 2010. Cloning of two cellobiohydrolase genes from *Trichoderma viride* and heterogenous expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology Reports*, 37(4): 2135–2140.
- Stanke, M., & B. Morgenstern. 2005. AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. *Nucleic acids research*, 33(2): 465-467.
- Stergiopoulos, I., & P. J. G. M. de Wit. 2009. Fungal Effector Proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1): 233–263.
- Sugiyama, J. (1998). Relatedness, phylogeny, and evolution of the fungi. *Mycoscience*, 39(4): 487–511.

- Taez, L. y E. Zeiger. 2006. Fisiología Vegetal. Castelló de La Plana: Publicaciones de La Universitat Jaume I, D. L., 285 pp.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski y S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Teeri, T. T., P. Lehtovaara, S. Kauppinen, I. Salovuori y J. Knowles. 1987. Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulosytic enzymes: Gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene*, 51(1): 43–52.
- Tempelaars, C. A., P. R. Birch, P. F. Sims y P. Broda. 1994. Isolation, characterization, and analysis of the expression of the cbhII gene of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12): 4387–93.
- Thompson, A. J., T. Heu, T. Shaghasi, R. Benyamino, A. Jones, E. P. Friis, K. S. Wilson y G. J. Davies. 2012. Structure of the catalytic core module of the *Chaetomium thermophilum* family GH6 cellobiohydrolase Cel6A. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 68(8): 875–882.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876– 4882.
- Toda, H. T., N. N. Agahata, Y. A. Mano, K. N. Ozaki, T. K. Anda, M. O. Kazaki y M. S. Himosaka. 2008. Gene Cloning of Cellobiohydrolase II from the White Rot Fungus *Irpex lacteus* MC-2 and Its Expression in *Pichia pastoris*, 72(12): 3142–3147.
- Tsai, C-F., X. Qiu y J.-H. Liu. 2003. A comparative analysis of two cDNA clones of the cellulase gene family from anaerobic fungus *Piromyces rhizinflata*. *Anaerobe*, 9(3): 131–140.
- Varrot, A., T. P. Frandsen, I. von Ossowski, V. Boyer, S. Cottaz, H. Driguez, M. Schülein y G. J. Davies. 2003. Structural Basis for Ligand Binding and Processivity in Cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens*. In *Structure*, 11:855–864.

- Vian Ortuño, A. 2006. Introducción a la Química Industrial. Reverté, Barcelona, España, 568 pp.
- Villa-Rivera, M. G., Conejo-Saucedo, U., Lara-Marquez, A., Cano-Camacho, H., Lopez-Romero, E., & Zavala-Paramo, M. G. (2017). The Role of Virulence Factors in the Pathogenicity of *Colletotrichum* sp. *Current Protein & Peptide Science*, 18(10), 1–14.
- Villa-Rivera, M. G. 2017. Caracterización bioquímico-molecular de la endo- β -(1,6)-D-galactanasa y la α -L-arabinofuranosidasa de dos razas de *Colletotrichum lindemuthianum* con distinto estilo de vida (Tesis de doctorado). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- Villa-Rivera, M. G., U. Conejo-Saucedo, A. Lara-Marquez, H. Cano-Camacho, E. Lopez-Romero, M. G. Zavala-Páramo. 2017a. The Role of Virulence Factors in the Pathogenicity of *Colletotrichum* sp. *Current Protein & Peptide Science*, 18(10): 1–14.
- Villa-Rivera, M. G., M. G. Zavala-Páramo, U. Conejo-Saucedo, E. López-Romero, A. Lara-Márquez, H. Cano-Camacho. 2017b. Differences in the expression profile of endo- β -(1,6)-D-galactanase in pathogenic and non-pathogenic races of *Colletotrichum lindemuthianum* grown in the presence of arabinogalactan, xylan or *Phaseolus vulgaris* cell walls. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 99, 75–86.
- Wei, X., K. Zheng, M. Chen, G. Liu, J. Li, Y. Lei, Y. Qin y Y. Qu. 2011. Transcription analysis of lignocellulolytic enzymes of *Penicillium decumbens* and its catabolite-repression-resistant mutant. *Comptes Rendus Biologies*, 334(11): 806–811.
- Wilson, D. B. 2011. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3): 259–263.
- With, G. S., D. View y H. O. F. Deep. 2001. Software review Swiss-PDB Viewer (Deep View). *Software Review*, 2(2): 195–197.
- Yang, B., Z. Dai, S.-Y. Ding y C. E. Wyman. 2011. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4): 421–450.

Yang, J., R. Yan., A. Roy, D. Xu, J. Poisson y Y. Zhang. 2015. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1): 7–8.

Yoshida, M., K. Sato, S. Kaneko y K. Fukuda. 2009. Cloning and Transcript Analysis of Multiple Genes Encoding the Glycoside Hydrolase Family 6 Enzyme from *Coprinopsis cinerea*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(1): 67–73.

Žifčáková, L. y P. Baldrian. 2012. Fungal polysaccharide monooxygenases: New players in the decomposition of cellulose. *Fungal Ecology*, 5(5): 481–489