



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Tesis

**AISLAMIENTO Y ANÁLISIS MOLECULAR DE UN GEN DE
 β -XILOSIDASA DE *Colletotrichum lindemuthianum***

Que presenta:

QFB. PERLA JAZMÍN CAMPOS DÍAZ

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

ASESORA: DRA. MARÍA GUADALUPE ZAVALA PÁRAMO

CO-ASESOR: DR. HORACIO CANO CAMACHO

Marzo 2019



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DRA. LILIANA MÁRQUEZ BENAVIDES
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E


Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Aislamiento y análisis molecular de un gen de β -xilosidasa de *Colletorhichum lindemuthianum*" presentado por la QFB. Perla Jazmín Campos Díaz con Número de Matricula 1166715A, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.


A T E N T A M E N T E

Morelia, Michoacán, a 21 de febrero de 2019

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA




Dra. María Guadalupe Zavala Páramo
Directora de Tesis



Dr. Horacio Cano Camacho
Co director



Dr. Rafael Salgado Garciglia



Dr. Rodolfo López Gómez



Dra. Alicia Lara Márquez

Este trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D.C. María Guadalupe Zavala Páramo y la co-asesoría del D.C. Horacio Cano Camacho, como parte del proyecto de investigación “Caracterización bioquímica y molecular de los complejos hemicelulolíticos de *Coletotrichum lindemuthianum*”. Se contó con el apoyo de SEP-CONACyT (2012-01-182755 de MGZP), UMSNH (Proyecto CIC 2014-2015 de HCC).

AGRADECIMIENTOS

- A mis asesores, los Doctores Maria Guadalupe Zavala Paramo y Horacio Cano Camacho por su direcion y formacion academica. Por el apoyo, por todas las experiencias y aprendizajes adquiridos durante estos años de licenciatura y maestria y sobre todo por la oportunidad que me brindaron al formar parte de su equipo.
- A mi comité tutorial, los Doctores Rafael Salgado Garciglia, Rodolfo Lopez Gomez y Alicia Lara Márquez por su tiempo y sus atinados comentarios en cada seminario de evaluación, así como por la revisión del presente documento, ayudandome a pulir cada parrafo.
- A mis Padres Marina Díaz y Santiago Campos por apoyarme en cada etapa de mi vida, por estar conmigo ayudandome y haciendo lo posible para ver cumplidos cada uno de mis sueños. A mis hermanos Santiago, Noel, Keily, Carmen y Guadalupe que siempre han estado conmigo apoyandome en cada momento. A mis abuelitos Viegen Cardoso y J. Carmen Diaz y a mis tios por el apoyo emocional para salir adelante en cada meta.
- A la D.C. Maria Guadalupe Villa Rivera, quien por su amistad y por la orientacion y paciencia que me brindo durante la realización de mi trabajo experimental.
- A mis compañeros de laboratorio Juan Pablo, Alfredo, Irene, Morelia, Alma, Denise, Marco, Karla y Jesica por la compañía y los agrabales momentos que hemos compartido.
 - A CONACyT por la beca ortorgada 618664.

- Saber mucho no es lo mismo que ser inteligente. La inteligencia no es solo información, sino también juicio para manejarla.

Carl Sagan.

ÍNDICE GENERAL

Índice	1
Índice de tablas y figuras	3
Resumen	5
Abstrad	6
1. Introducción	7
2. Antecedentes	8
2.1 Pared celular vegetal	8
2.2 Composición química de la pared celular vegetal	9
2.2.1 Pectina	9
2.2.2 Hemicelulosa	10
2.2.3 Xilana	11
2.2.4 Celulosa	12
2.2.5 Lignina	12
2.2.6 Protenina	13
2.3 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	13
2.3.1 Razas de <i>C. lindemuthianum</i>	14
2.3.2 Mecanismo de infección de <i>C. lindemuthianum</i>	15
2.4 Degradación enzimática de la pared celular vegetal	17
2.4.1 Degradación de la hemicelulosa	19
2.4.2 Degradación de la xilana	19
2.4.3 Características de las b-xilosidasas	21
2.5 Reguladores transcripcionales de xilanasas	22
2.6 Genes de β-xilosidasas en hongo	23
2.7 β-xilosidasas en <i>C. lindemuthianum</i>	24
2.8 Aplicaciones biotecnológicas	24
3. Justificación	27
4. Hipótesis	28
5. Objetivos	29
6. Materiales y métodos	30
6.1 Material biológico	30
6.2 Medios de cultivo	30
6.2.1 Medio Papa-Dextrosa (PD) y Papa-Dextrosa-Agar (PDA)	30
6.2.2 Medio mínimo Mathur	30
6.3 Purificación de la pared celular vegetal	30

6.4 Ensayos de inducción	31
6.5 Purificación de ADN	31
6.6 Purificación de ARN	32
6.7 Electroforesis en gel de agarosa	32
6.8 Síntesis de ADNc	33
6.9 Amplificación por PCR de punto final	33
6.10 Análisis de expresión por qPCR	34
6.11 Secuenciación y análisis de secuencias	35
6.12 Modelaje 3D y estructura secundaria	35
6.13 Análisis filogenético	36
7. Resultados	37
7.1 ADN total purificado	37
7.2 ARN total purificado	37
7.3 Análisis bioinformático-molecular del gen <i>bxyloA</i> de <i>C. lindemuthianum</i>	38
7.4 Modelo 3D y estructura secundaria de BXYLOA	45
7.5 Análisis de expresión por qPCR	49
8. Discusión	53
9. Conclusiones	58
10. Bibliografía	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición de la pared celular vegetal primaria	10
Figura 2. Estructura química de los diferentes componentes de la hemicelulosa en las paredes celulares	11
Figura 3. Mecanismo de infección de <i>C. lindemuthianum</i>	17
Tabla 1. Descripción general de enzimas de hongos involucradas en la modificación y degradación de la PCV	18
Figura 4. Degradación enzimática de la hemicelulosa	21
Figura 5. Representación esquemática de las β-xilosidasas que liberan xilosa a partir de la xilobiosa	21
Tabla 2. b-xilosidasas caracterizadas en hongos	23
Figura 6. Bioconversión de biomasa lignocelulósica	25
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen <i>bxiloA</i>	33
Figura 7 Electroforesis de ADN total purificado de <i>C. lindemuthianum</i>	37
Figura 8. Integridad del ARN total purificado de <i>C. lindemuthianum</i> razas 0 y 1472	37
Tabla 4. Concentración de ARN total purificado	38
Figura 9. Análisis comparativo de las secuencias genómicas (ADN) del gen <i>bxyloA</i> ambas razas de <i>C. lindemuthianum</i>	39
Figura 10. Esquema de la estructura del gen <i>bxyloA</i>	40
Figura 11. Productos de amplificación del gen de <i>bxyloA</i>	40
Figura 12. Análisis comparativo de las secuencias de ADNc del gen <i>bxyloA</i>	41
Figura 13. Secuencia deducida de aminoácidos de la b-xilosidasa de <i>C. lindemuthianum</i>	42
Figura 14. Representación gráfica del sitio de corte del péptido señal de BXYLOA de <i>C. lindemuthianum</i>	42
Figura 15. Ubicación de los sitios de posible N-glicosilación en BXYLOA de <i>C. lindemuthianum</i>	43

Tabla 5. Similitud e identidad de la secuencia del gen <i>bxyloA</i> de <i>C. lindemuthianum</i> con secuencias de genes de <i>Colletotrichum</i> spp	44
Figura 16. Alineamiento clustal de secuencias de b-xilosidasas de <i>Colletotrichum</i> spp	46
Figura 17. Modelaje tridimensional de la b-xilosidasa de <i>C. lindemuthianum</i>	47
Figura 18. Sobreposición de las estructuras 3D de las b-xilosidasas de <i>C. lindemuthianum</i> y <i>G. thermoleovorans</i> IT-08	47
Figura 19. Alineamiento de la estructura secundaria de la b-xilosidasa de <i>C. lindemuthianum</i> y <i>G. thermoleovorans</i> IT-08	48
Figura 20. Análisis de la expresión relativa por qPCR de <i>bxyloA</i>	49
Figura 21. Arbol filogenético consenso (IB, ML) de b-xilosidasas del género <i>Colletotrichum</i>	51
Figura 22. Árbol filogenético de b-xilosidasas de especies del género <i>Colletotrichum</i>	51
Figura 23. Árbol filogenético de secuencias de b-xilosidasas de especies del género <i>Colletotrichum</i>.	52
Figura 24. Estructuras 3D de una proteína representativa de cada linaje en el árbol filogenético	52

RESUMEN

Colletotrichum lindemuthianum es un hongo hemibiotrófico que secreta un coctel de enzimas hidrolíticas que participan en el proceso de degradación de la pared celular vegetal (PCV). La hemicelulosa de la PCV requiere para su degradación completa de una mezcla compleja de hemicelulasas, tales como endoxilanasas, β -xilosidasas, endoglucanasas, endomannanasas, manosidasas α -arabinofuranosidasas y galactosidasas. En este trabajo se aisló, identificó y analizó el gen *bxyloA* que codifica para una β -xilosidasa de las razas 0 y 1472 de *C. lindemuthianum*. La secuencia *bxyloA* consta de una región estructural de 1860 pb con tres intrones y cuatro exones. El transcrito de *bxyloA* con un UTR5' de 199 pb presenta un marco de lectura de 1709 pb que codifica para 570 residuos con un codón de detención y un UTR3' de 237 nt. El análisis *in silico* de la β -xilosidasa (BXYLOA) mostró un sitio de corte del péptido señal entre S¹⁷¹I¹⁸ que genera una proteína madura de 553 aa con cinco posibles sitios de N-glicosilación en N^{132, 192, 258, 468, 502}. El modelo 3D de BXYLOA reveló las características típicas de las β -xilosidasas GH43. La comparación con 26 secuencias de β -xilosidasas putativas de genomas de *Colletotrichum* spp. mostró un grupo con altos porcentajes de similitud e identidad (98-84 y 97-76%) y otro grupo con bajos porcentajes (69-34 y 65-23%), indicando una alta diversidad. Los residuos del sitio catalítico de BXYLOA se localizaron en D¹²D¹²⁵E¹⁸⁷, y son conservados en la mayoría de las β -xilosidasas de *Colletotrichum* spp. El perfil de transcripción por qPCR de *bxyloA* mostró un importante incremento del transcrito del gen en la raza patógena 1472 desde los primeros minutos y hacia las 6 h, después de inducción con PCV de *Phaseolus vulgaris*. En contraste, la raza no patógena 0 mostró niveles basales de expresión de *bxyloA*. El análisis filogenético de β -xilosidasas de *Colletotrichum* spp., mostró dos clados o linajes, congruentes con los dos grupos identificados por alineamiento. Un linaje (C1) muestra eventos de duplicación y alta diversificación genética, y en el otro linaje (C2), donde se encuentra BXYLOA de *C. lindemuthianum*, no hay duplicaciones y es muy conservado. A pesar de la diversidad genética de las β -xilosidasas y que el templado utilizado para la predicción 3D es de una bacteria, la estructura es altamente conservada. Sin embargo, la estructura 3D del subclado C1Sc3 donde se agrupan secuencias de *C. orchidophilum*, *C. fioriniae* y *C. graminicola*, no presenta el dominio β -sandwich en el C-terminal.

Palabras clave: *Colletotrichum lindemuthianum*, hemicelulosa, β -xilosidasa, fitopatógeno, antracnosis.

ABSTRACT

Colletotrichum lindemuthianum is a hemibiotrophic fungus that secretes a cocktail of hydrolytic enzymes that participate in the degradation process of the plant cell wall (PCV). The hemicellulose of PCV requires for its complete degradation a complex mixture of hemicellulases, such as endoxylanases, β -xylosidases, endoglucanases, endomannanases, mannosidases α -arabinofuranosidases and galactosidases. In this work the *bxyloA* gene coding for a β -xylosidase of races 0 and 1472 of *C. lindemuthianum* was isolated, identified and analyzed. The *bxyloA* sequence consists of a structural region of 1860 bp with three introns and four exons. The transcript of *bxyloA* with a UTR5' of 199 bp has a reading frame of 1709 bp which codes for 570 residues with a stop codon and a UTR3' of 237 nt. In silico analysis of β -xylosidase (BXYLOA) showed a signal peptide cleavage site between S¹⁷¹I¹⁸ that generates a mature protein of 553 aa with five possible N-glycosylation sites at N^{132, 192, 258, 468, 502}. The 3D model of BXYLOA revealed the typical characteristics of the β -xylosidases GH43. The comparison with 26 sequences of putative β -xylosidases of genomes of *Colletotrichum spp.* showed a group with high percentages of similarity and identity (98-84 and 97-76%) and another group with low percentages (69-34 and 65-23%), indicating a high diversity. The residues of the BXYLOA catalytic site were located in D¹²D¹²⁵E¹⁸⁷, and are conserved in most of the β -xylosidases of *Colletotrichum spp.* The transcription profile by qPCR of *bxyloA* showed a significant increase of the transcript of the gene in the pathogenic race 1472 from the first minutes and towards 6 h, after induction with PCV of *Phaseolus vulgaris*. In contrast, the nonpathogenic race 0 showed basal levels of *bxyloA* expression. The phylogenetic analysis of β -xylosidases from *Colletotrichum spp.* showed two clades or lineages, congruent with the two groups identified by alignment. A lineage (C1) shows duplication events and high genetic diversification, and in the other lineage (C2), where BXYLOA of *C. lindemuthianum* is found, there are no duplications and it is much conserved. Despite the genetic diversity of β -xylosidases and that the tempering used for 3D prediction is of a bacterium, the structure is highly conserved. However, the 3D structure of the subset C1Sc3 where sequences of *C. orchidophilum*, *C. fioriniae* and *C. graminicola* are grouped, does not present the sandwich-domain in the C-terminal.

Key words: *Colletotrichum lindemuthianum*, hemicellulose, β -xylosidase, phytopathogen, anthracnose.

1. INTRODUCCIÓN

El fitopatógeno *C. lindemuthianum*, es un hongo hemibiotrófico que en su fase necrotrófica secreta un coctel de enzimas hidrolíticas que participan en la degradación de la pared celular vegetal de su huésped, la cual constituye el principal reservorio de carbono de la naturaleza (De-Silva *et al.*, 2017). La pared celular vegetal está constituida principalmente de celulosa hemicelulosa y pectina, que brinda soporte y rigidez a la célula (Cosgrove, 2005). La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza y está integrado por cadenas lineales de xilosa y glucosa unidas mediante enlaces glicosídicos β -(1 \rightarrow 4) (Scheller and Ulvskov, 2010). Por su heterogeneidad la hemicelulosa requiere para su completa degradación de una mezcla de enzimas hidrolíticas llamadas hemicelulasas, tales como las endoxilanasas, β -xilosidasas, así como glucuronidasas y galactosidasas (Conejo-Saucedo *et al.*, 2011).

Las β -xilosidasas forman parte del complejo enzimático que secreta *C. lindemuthianum* para degradar la pared celular vegetal de su huésped. En la actualidad, estas enzimas son de crucial importancia económica debido a que se utilizan en varios procesos industriales para la degradación de diferentes residuos lignocelulíticos producto de las actividades en el sector agroindustrial (Knob, Terrasan and Carmona, 2010). Las β -xilosidasas se encuentran agrupadas en seis familias de las glicosil hidrolasas (GH3, GH30, GH39, GH43, GH52, GH54, GH116 y GH120) de acuerdo con similitudes del dominio catalítico y a su estructura tridimensional. Las β -xilosidasas catalizan la hidrólisis de residuos de xilosa de extremos no reductores de xilooligosacáridos liberados por la actividad de endoxilanasas (Jordan and Wagschal, 2010).

En el presente trabajo se aisló, identificó y analizó el ADN genómico, y el ADNc del gen *bxyloA* que codifica para una β -xilosidasa de las razas patógena 1472 y no patógena 0 de *C. lindemuthianum*. Se realizaron los análisis bioinformático- molecular, modelaje 3D, perfiles de transcripción y filogenia molecular dentro del género *Colletotrichum*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Pared celular vegetal

Las paredes celulares cambiaron a lo largo de la evolución remodelándose y reconstruyéndose constantemente durante el desarrollo de las plantas, en respuesta a diversos factores entre los que están la respuesta al estrés ambiental o el ataque de patógenos (Sarkar *et al.*, 2009). Conforman una matriz extracelular que define la forma de la células en compartimentos altamente complejos y dinámicos que sustentan muchos aspectos del desarrollo celular, el crecimiento y las propiedades de los órganos (Smith, 2001; Cosgrove, 2005; Campebell and Reece, 2007; Knox, 2008).

La pared celular vegetal (PCV) cumple con diversas funciones mecánicas entre las que se incluyen proporcionar forma y rigidez a la estructura de la planta, propiciando la formación de una barrera física que protege el contenido celular frente a agresiones por patógenos, provee el medio para la circulación y distribución del agua, minerales y otras moléculas pequeñas. Además, contiene moléculas especializadas que regulan el crecimiento y protegen a la planta de las enfermedades (Keegstra, 2001; Somerville *et al.*, 2004; Valenciaga and Chongo, 2004; Sarkar *et al.*, 2009; Houston *et al.*, 2016).

En las células en crecimiento, la pared celular primaria es típicamente una capa delgada y flexible que se compone principalmente de polisacáridos complejos y una pequeña cantidad de proteínas estructurales cuya composición varía dependiendo del tipo de célula, de la especie o del estado de desarrollo de la planta (Carpita and Gibeaut, 1993; Cosgrove, 2005). La estructura de la PCV primaria está constituida por dos fases; una fase fibrilar o esqueleto y una fase amorfa o matriz. La fase fibrilar está integrada por celulosa, mientras que la fase amorfa por hemicelulosas, pectina y glicoproteínas (Smith, 2001; Valenciaga and Chongo, 2004).

Entre las células vegetales jóvenes y áreas en crecimiento activo se encuentra una capa conocida como lámina media que contiene iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} y compuestos pécticos que contribuyen a la adhesión, y se forma en el momento de la división celular. Una pared celular primaria se forma inmediatamente después de la división celular en células con cierta diferenciación y es característica de todas aquellas células que se encuentran en crecimiento (Valenciaga and Chongo, 2004; Peña, 2011). Cuando maduran, las células vegetales dan sostén a la planta o participan en el transporte de líquidos; el protoplasto secreta una pared secundaria después de que la célula ha dejado de crecer. Salvo una pequeña porción de células, en la madera, los protoplastos mueren después de que ha sido

secretada la pared secundaria y su contenido se elimina de las células de modo que sólo queda la pared. Las paredes secundarias suelen ser mucho más gruesas comparadas con las primarias y algunas tienen varias micras de espesor (Salisbury and Ross, 1994).

2.2. Composición química de la pared celular vegetal

La biomasa vegetal es la fuente de carbono renovable más abundante en la tierra (Rytioja *et al.*, 2014), siendo la PCV el primer reservorio de carbono en la naturaleza (McNeil *et al.*, 1984; McNeil, 2002), posee una complejidad química y organización compacta que hace que las plantas sean extremadamente recalcitrantes (Sarkar *et al.*, 2009).

Las PCV son estructuras complejas y dinámicas compuestas principalmente de polisacáridos con pesos moleculares altos, de composición y estructura variable entre los que se encuentran la celulosa, la hemicelulosa y la pectina, ácidos fenólicos, proteínas altamente glicosiladas, iones, agua y lignina, un heteropolímero aromático (Somerville *et al.*, 2004; Valenciaga and Chongo, 2004; Rytioja *et al.*, 2014). Los azúcares más abundantes en la PCV son pentosas y hexosas, principalmente glucosa, seguido por xilosa, arabinosa, ramnosa, manosa, fucosa, entre otros; éstos se unen a las cadenas de celulosa y hemicelulosa, así como a las pectinas, sustancias aromáticas, iones y agua (Sandoval, 2005; Enríquez Guevara *et al.*, 2010).

Las plantas comprenden alrededor de 35 tipos de células, cada una de las cuales se distingue por su tamaño, forma, posición y características de la pared (Cosgrove, 2005). Las PCV primarias varían en grosor y morfología, dependiendo del tipo celular; el 90 % de su peso seco corresponde a los polisacáridos de los cuales aproximadamente el 30% está integrado por la celulosa, seguido por 30% de hemicelulosa, un 35% de pectina y aproximadamente y del 1-5 % a glicoproteínas (Fig. 1) (Cosgrove, 1997; Fry, 2006, 2014). Las PCV secundarias están integradas por aproximadamente 40-80 % de celulosa, 10-40 % de hemicelulosa y 5-25 % de lignina; esta composición química y una organización compacta les confiere una estructura altamente recalcitrante (Sarkar *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2016).

2.2.1. Pectina

Constituye el primer polisacárido presente en las paredes primarias de plantas dicotiledóneas, está integrada por una cadena lineal de moléculas de ácido α -1,4-D-galacturónico (GalpA), cuyos constituyentes principales son tres polisacáridos,

homogalacturonano, galacturonanos sustituidos y ramnogalacturonano-I y II. El contenido de pectina en las plantas varía dependiendo del ambiente, el tejido y especie de planta (Hernández-Silva *et al.*, 2007; Lara-Márquez *et al.*, 2011).

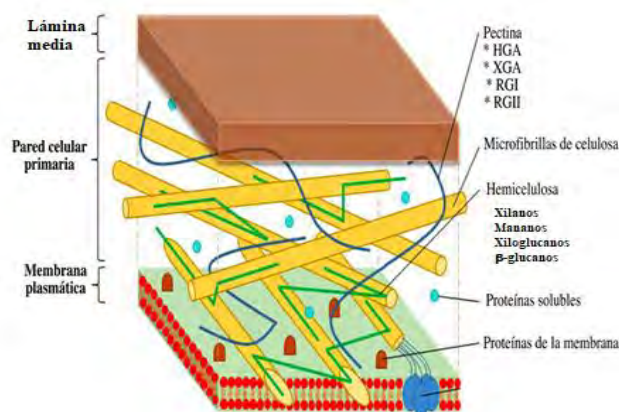


Figura 1. Composición de la pared celular vegetal primaria. Modificado de (Huybrechts *et al.*, 2017).

2.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa, representa un grupo diverso de polisacáridos no celulósicos en tejidos vegetativos y de almacenamiento de plantas anuales y perennes (Ebringerova *et al.*, 2005; Ebringerová, 2006). Estos polímeros complejos de heteropolisacáridos de alto peso molecular representan alrededor de un tercio de la masa seca de las paredes celulares y constituyen del 20 al 30% de la biomasa de las dicotiledóneas y hasta un 50% para algunos tejidos de monocotiledóneas (Scheller and Ulvskov, 2010). La hemicelulosa está integrada por cuatro grupos principales de polisacáridos: xiloglucanos (xilana), xiloglucana, manoglicana (mananos) y β-glucanos de enlaces mixtos, todos ellos ligados mediante enlaces glicosídicos β-1,4 (Ebringerova *et al.*, 2005; Ebringerová, 2006; Meier *et al.*, 2017). Estos polisacáridos se integran principalmente por D-xilosa y L-arabinosa, D-glucosa, D-manosa y D-galactosa unidas por enlaces glucosídicos β-1,4 y ocasionalmente por enlaces β-1,3, usualmente están acetiladas formando cadenas ramificadas (Fig. 2) (Scheller and Ulvskov, 2010). Las ramificaciones laterales son cortas y están formadas de distintos azúcares como arabinanos y galactanos lo que hace que la hemicelulosa sea

menos recalcitrante en comparación con la celulosa (Pérez *et al.*, 2002). La hemicelulosa es insoluble en agua y soluble en álcalis diluidos, por lo que su hidrólisis enzimática representa un verdadero reto para los microorganismos (Mach and Zeilinger, 2003; Scheller and Ulvskov, 2010).

Hemicelulosa

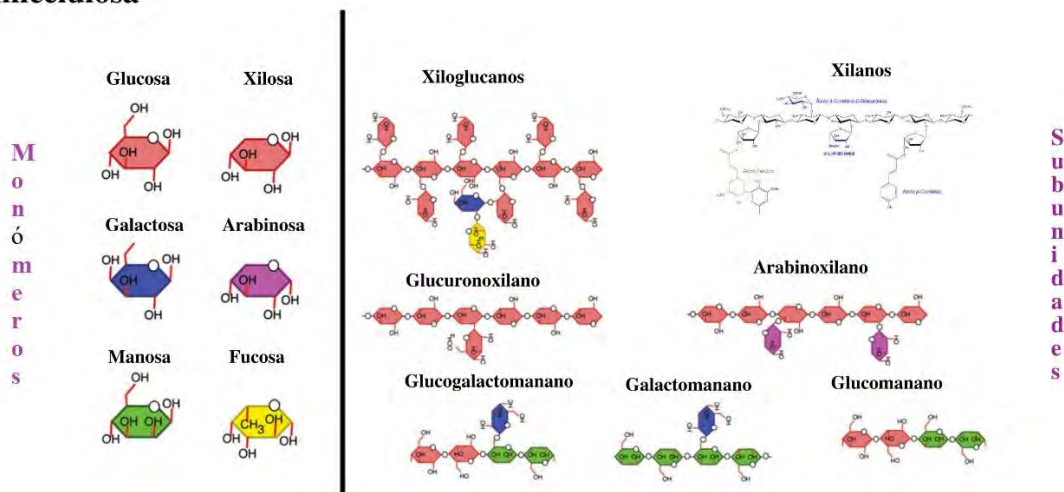


Figura 2. Estructura química de los diferentes componentes de la hemicelulosa en las paredes celulares. Modificado de (Sarkar, Bosneaga and Auer, 2009).

En la actualidad se han identificado dos tipos de hemicelulosa; la que se encuentra en las maderas duras que existen mayormente en forma de xilanos, donde las cadenas homopoliméricas de xilana son de residuos de β -D-xilopiranososa con enlaces 1-4, mientras que las maderas suaves principalmente contienen glucomananos (Martínez-Anaya *et al.*, 2008).

2.2.3. Xilana

La xilana es la principal hemicelulosa, en las PCV de monocotiledóneas y dicotiledóneas constituyendo más del 70% de su composición, constituyen el 25–35% de la biomasa seca de los tejidos leñosos de las dicotiledóneas y un 50 % de los tejidos lignificados de las monocotiledóneas y en algunos tejidos de los granos de cereales (Ebringerová and Heinze, 2000; Quiroz-Castañeda and Folch-mallol, 2006; Quiroz-Castañeda and Folch-Mallol, 2011; Pauly *et al.*, 2013).

La xilana está integrada por una cadena principal de residuos de D-xilosa unidos por enlaces β -1,4 con una gran variedad de cadenas laterales, las cuales además de la xilosa, pueden contener arabinosa, ácido glucurónico, ácido acético, ácido ferúlico o ácidos p-cumáricos. Estas diversas sustituciones son las que originan los arabinoxilanos, glucuronoxilanos y glucuronoarabinoxilanos (Fig. 2). La composición y frecuencia de las ramificaciones dependen del origen de la hemicelulosa (Ebringerova *et al.*, 2005; Quiroz-Castañeda and Folch-mallol, 2006; Adan *et al.*, 2017)

En dicotiledóneas el esqueleto principal de la xilana se encuentra ramificado con ácido glucurónico (GlcA) con enlaces α -(1-2) y ácido 4-O-metilglucurónico (MeGlcA), cuyo polisacárido se denomina glucuronoxilano (GX) y en monocotiledóneas es conocido como glucuronoarabinoxilano (GAX), donde los sustituyentes son α -(1-3) y/o α -(1-2) arabinofuranosilo (Araf) enlazados a α -(1-2) GlcA/Unidades MeGlcA (Kumar, Campbell and Turner, 2016; Meier *et al.*, 2017).

2.2.4. Celulosa

Es el polímero más abundante en la naturaleza, siendo el componente principal de la PCV, constituye el 50% del peso seco de la pared celular está compuesta por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos β -1,4, que forman moléculas de celobiosa las que a su vez forman agregados de largas microfibrillas que forman una estructura cristalina y organizada resistente a la hidrólisis (Cosgrove, 1997; Valenciaga and Chongo, 2004). Es un sustrato muy resistente, que se encuentra entrelazado por puentes de hidrógeno con la hemicelulosa y la lignina, formando una estructura altamente resistente a la degradación, por lo que solo algunos organismos celulolíticos pueden hidrolizarla (Hildén and Johansson, 2004).

2.2.5. Lignina

Es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, después de la celulosa y la hemicelulosa, es la forma más abundante de material aromático en la biósfera, se encuentra dentro de las paredes celulares, actúa como cementante entre las fibras de celulosa y los demás componentes de la pared celular. Es altamente resistente a la degradación química y biológica debido a que contiene alrededor de 10-20% de grupos hidroxilo fenólicos, los cuales le confieren rigidez a la pared celular de las plantas y además las protege del ataque

de organismos patógenos (Davila and Vázquez-Duhalt, 2006; Kumar, Campbell and Turner, 2016).

2.2.6. Proteínas

Están presentes en pequeñas cantidades (menos del 10 %) recubriendo a la pared primaria, la mayoría son glicoproteínas y se pueden ubicar en una de cuatro clases según la abundancia de ciertos aminoácidos o motivos de glicanos en su secuencia. Estas son proteínas ricas en glicina (GRPs), proteínas ricas en prolina (PRPs), proteínas ricas en arabinogalactano (AGPs) y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs o extensinas) (Cosgrove, 1997; Sandoval, 2005; Kumar, Campbell and Turner, 2016).

2.3. *Colletotrichum lindemuthianum*

Colletotrichum es un género de hongos Ascomicetos, integrado por un grupo altamente diverso de aproximadamente 100 especies de patógenos, que infectan una amplia gama de plantas hospederas agrupadas en varios complejos de especies que comprenden una extensa gama de variaciones morfológicas y patológicas (Perfect *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2015; De-Silva *et al.*, 2017). Debido a lo anterior, las especies del género *Colletotrichum* son un modelo útil para el estudio de la evolución de la especificidad del huésped, la especiación y los comportamientos reproductivos (Baroncelli *et al.*, 2016).

Los miembros del género *Colletotrichum* son los principales causantes de la enfermedad de antracnosis que ocasiona grandes pérdidas en cultivos importantes, especialmente en frutas, vegetales y plantas ornamentales (O'Connell *et al.*, 2012). La palabra antracnosis se deriva de una palabra griega que significa «carbón», es el nombre común de enfermedades de las plantas que se caracterizan por lesiones oscuras, hundidas, que contienen esporas (Than *et al.*, 2008). La antracnosis es una de las enfermedades más extendidas y económicamente importantes del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) (Liu *et al.*, 2012). Puede conducir a pérdidas significativas en la producción de frijol, especialmente cuando las condiciones climáticas favorecen el desarrollo de enfermedades, ocasionando pérdidas de hasta el 100% si se siembran semillas severamente infectadas bajo las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, en países de África, Oceanía, Asia y países de América como México, Guatemala, Colombia y Brasil (Schwartz *et al.*, 1981; Halvorson *et al.*, 2016).

Entre las especies que comprenden este género se encuentra *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) (Mordue, 1971), el hongo filamentoso causal de la antracnosis del frijol común. Este hongo infecta especies del género *Phaseolus*, siendo *P. vulgaris* su huésped principal (Schwartz *et al.*, 1981). *C. lindemuthianum* es reconocido como anamorfo, aunque también presenta un estado teleomorfo conocido como *Glomerella lindemuthiana* (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2005; Réblová, Gams and Seifert, 2011; Cannon *et al.*, 2012; Dean, Lichens-Park and Kole, 2014). *C. lindemuthianum* ha sido considerado como modelo de estudio dentro de los hongos patógenos de plantas por su estilo de vida hemibiotrófico (Perfect *et al.*, 1999). Con base en su importancia científica y económica, este hongo fue elegido como el octavo más importante entre los hongos patógenos de plantas (Cannon *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012).

2.3.1 Razas de *C. lindemuthianum*

Actualmente, se conocen dos tipos de variación patogénica en hongos con respecto al rango de plantas hospederas. En uno, diferentes aislados de una misma especie fitopatogena infectan diferencialmente a un grupo de especies hospederas; en el otro, diferentes cepas de una especie o formas especiales, infectan diferencialmente un grupo de cultivares de una misma especie hospedera. En el primer caso las poblaciones de la especie fitopatogena se agrupan en formas especiales, mientras que en el segundo se agrupan en razas, razas fisiológicas o patotipos, éste es el caso de *C. lindemuthianum* (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2006).

C. lindemuthianum muestra gran diversidad patogénica alrededor del mundo, en México se han identificado 56 patotipos en base a la virulencia en confrontación con 12 cultivares diferenciales de *P. vulgaris*, presentando una mayor extensión en América Central que en Sur o Norte América (Balardin, Jarosz and Kelly, 1997; Rodríguez-Guerra *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009). Dentro de la diversidad de patotipos o razas de *C. lindemuthianum*, la raza 1472 es considerada entre una de las más virulentas (Pérez-González *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 2000), encontrándose en ocho de los 256 aislados realizados en México. Entre los 12 cultivares de frijol analizados de origen andino y mesoamericano, la raza 1472 infecta principalmente a cuatro cultivares de origen mesoamericano (México 222, PI 207262, To y AB 136). Los aislados de esta raza fueron encontrados en las regiones Norte-Centro, Pacífico-Centro y Centro, en los estados de Zacatecas, Hidalgo y México (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2006). Por otro lado, la raza 0 es considerada como saprófito

incapaz de infectar alguno de los 12 cultivares diferenciales y sus aislados se encontraron en compañía de otras razas a lo largo de todo el territorio mexicano, sin embargo, uno de estos aislados se obtuvo en el estado de Michoacán (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009).

2.3.2 Mecanismo de infección de *C. lindemuthianum*

La penetración del tejido de la planta es siempre un paso crucial para las interacciones planta-hongo, ya que marca inicio del ciclo de infección y determina el desarrollo o la falta de una enfermedad (Veneault-Fourrey, Lauge and Langin, 2005). La resistencia a las enfermedades de las plantas es una consecuencia de la interacción huésped-patógeno explicada por el concepto de gen por gen, por lo que la resistencia se activa por un reconocimiento específico del huésped hacia el patógeno invasor (Mahasuk, Chinthaisong and Mongkolporn, 2013). La penetración del hongo en el tejido vegetal es un proceso activo que ocurre a través de la superficie de las plantas intactas mediante una hifa fina que se produce directamente por el conidio, el micelio o por medio de una clavija de penetración producida por un apresorio (Veneault-Fourrey, Lauge and Langin, 2005). Adicionalmente a la penetración mecánica, los fitopatógenos secretan un cóctel de enzimas hidrolíticas tales como celulasas, hemicelulasas, pectinasas, entre otras que le ayudan en la colonización de la planta (Knogge, 1996, 1998).

El proceso de infección de las especies hemibiótopas de *Colletotrichum* muestra dos fases. En su primera fase se comportan como biótrofos, nutriéndose de las células vivas del hospedero y en su segunda fase se comportan como necrótrofos causando la muerte de la planta huésped, en esta fase secreta un coctel enzimático para degradar la pared celular vegetal (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007; Latunde-Dada and Lucas, 2007; Pellier *et al.*, 2007; Münch *et al.*, 2008).

La interacción entre un cultivar susceptible de frijol común y cualquier raza virulenta de *C. lindemuthianum*, comienza con la adhesión de conidios a las partes aéreas de la planta (Dufresne *et al.*, 2000). La infección inicial causada por fitopatógenos hemibiótrofos implica una serie de procesos que incluyen la unión de esporas a superficies de las plantas, su germinación, la producción de apresorios adhesivos, la penetración de la epidermis, el crecimiento y colonización de tejido, y por último la muerte de la planta por necrosis (Fig. 3) (S. Perfect *et al.*, 1999; Münch *et al.*, 2008).

En el proceso de infección de *C. lindemuthianum* esquematizado en la figura 3, las esporas unidas a la superficie de la planta crecen formando un tubo germinal corto, que después dan paso a la formación de un apresorio (A) en forma de cúpula melanizada. El apresorio se desarrolla 24 h después de la germinación del conidio y a partir de éste se desarrollan hifas de penetración (PE) que por presión mecánica perforan la cutícula de la pared celular y se internalizan en las células epidérmicas de la planta. Una vez dentro, estas hifas se ensanchan formando vesículas de infección (V), en los siguientes 2 a 3 días, las cuales posteriormente se diferencian en hifas primarias. Tanto la vesícula como la hifa primaria están rodeadas por una matriz interfacial que separa el hongo del hospedero. En esta etapa de interacción, el protoplasto del hospedero permanece vivo, por lo que se le conoce como fase biotrófica. Este proceso termina cuando se desarrollan hifas secundarias estrechas (SH). Las hifas primarias colonizan progresivamente nuevas células de la epidermis después de la penetración, repitiendo el mismo proceso de una fase biotrófica transitoria seguido por una fase de necrosis. Este proceso termina después de las 40 o 72 horas de inoculación cuando se desarrollan hifas secundarias estrechas (SH). A continuación empieza la fase necrotrófica, en la cual se forman hifas secundarias que carecen de una matriz interfacial y comienzan a penetrar la membrana plasmática, la matriz circundante y la pared celular de la planta comienza a desintegrarse debido a la secreción de grandes cantidades de enzimas hidrolíticas secretadas por las hifas secundarias, las cuales crean una rápida expansión de las lesiones necróticas y la muerte celular del huésped. El ciclo de infección se completa dentro de 7 a 8 días con la producción de la nueva generación de conidios. La aparición de tales estructuras especializadas bien definidas, que difieren en morfología, fisiología y función, indica que el hongo sigue programas genéticos altamente organizados (Fig. 3) (Perfect *et al.*, 1999; Mendgen and Hahn, 2002; Veneault-fourrey, Lauge and Langin, 2005).

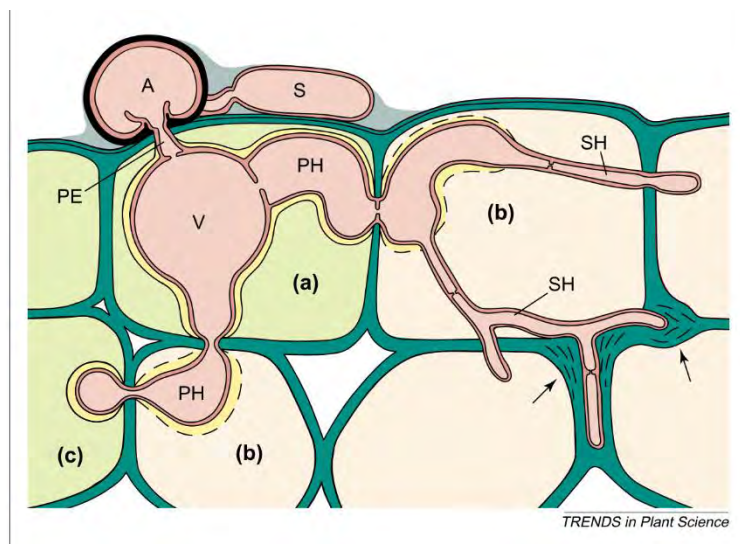


Figura 3. Mecanismo de infección de *C. lindemuthianum*; A: apresorio, S: espora, PE: hifa de penetración, V: vesícula de infección, PH: hifa primaria, SH: hifa secundaria, a: protoplasto vivo en fase biotrófica, b: células muertas (Mendgen and Hahn, 2002).

2.4 Degradación enzimática de la pared celular vegetal

La degradación de la PCV es un fenómeno co-evolutivo entre los mecanismos de defensa de las plantas y las estrategias de los microorganismos patógenos por evadirlos y degradar sus componentes durante las infecciones, lo cual es necesario para la penetración, la liberación de nutrientes y la generación de moléculas de señalización (Sarkar, Bosneaga and Auer, 2009). La degradación de la biomasa vegetal por hongos tiene dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: el sistema hidrolítico, que produce hidrolasas que son responsables de la degradación de polisacáridos; y un sistema ligninolítico oxidativo y extracelular único, que degrada la lignina y abre los anillos de fenilo. Ambos procesos determinan que se requiere de un conjunto diverso de enzimas secretadas extracelularmente que contribuyen significativamente al ciclo global del carbono (Sánchez, 2009; Glass *et al.*, 2013).

Los hongos involucrados en la degradación de materias primas que contienen lignocelulosa compleja expresan un amplio espectro de enzimas. Las enzimas fúngicas actúan de manera sinérgica y coordinada para llevar a cabo una deslignificación más eficiente, entre las que se encuentran las cutinasas, pectinasas, hemicelulasas, que liberan a las microfibrillas de celulosa sobre las que actúan las celulasas (Tabla 1) (Rytioja *et al.*, 2014; Jurado Téllez *et al.*, 2016; Villa-Rivera *et al.*, 2017; Ludwig *et al.*, 2018).

Tabla 1. Descripción general de enzimas de hongos involucradas en la modificación y degradación de la PCV (Glass *et al.*, 2013; Kubicek, Starr and Glass, 2014; Ludwig *et al.*, 2018).

Enzima	Código	Familia CAZy
Enzimas que degradan lignina		
Lacasas	EC 1.10.3.2	AA1
Peroxidasa de manganeso	EC 1.11.1.13	AA2
Peroxidasa de lignina	EC 1.11.1.14	AA2
Peroxidasa versátil	EC 1.11.1.16	AA2
Peroxidasa horseradish	EC 1.11.1.7	AA2
Aril-alcohol deshidrogenasa	EC 1.1.1.90	AAD
Glioxilato oxidasa	EC 1.2.3.5	AA5
Celobiosa deshidrogenasa	EC 1.1.99.18	AA3
Quinona reductasa	EC 1.6.5.2	QR
Alcohol oxidasa	EC 1.1.3.7	AA3
Piranosa 2-oxidasa (glucosa 1-oxidasa)	EC 1.1.3.4	AA3
Tirosinasas	EC.1.14.18.1	NO DEFINIDA
Catecol oxidasas	EC 1.10.3.1	NO DEFINIDA
Enzimas que degradan pectina		
Poligaracturonasas	E.C. 3.2.1.15	GH28
Ramnogalaturonasa	EC 3.2.1.171	GH28
Polisacarido-liasas	E.C. 4.2.2.-	PL1,PL2 y PL3
Ramnogalacturonan- endoliasas	EC 4.2.2.23	PL4
Pectin-merilesterasas	EC 3.1.1.11	CE8
Pectin-acetilesterasas	EC 3.1.1.-	GE12, CE13
Ramnogalacturonan-acetilesterasas	EC 3.1.1.-	CE12
Arabinasas	EC 3.2.1.99	GH43,GH93
α -L-arabinofuranosidasas	EC 3.2.1.55	GH3, GH43, GH51, GH54 y GH62
Galactanasas	EC 3.2.1.164	GH5, GH16, GH30, GH35, and GH53
α y β -galactosidasas	EC 3.2.1.23	GH1, GH2, GH4, GH16, GH27, GH35, GH36, GH42, GH43y GH53
β -glucuronidasas	EC 3.2.1.31	GH1, GH2 y GH79
Ferulesterasas	EC 3.1.1.73	CE1
Enzimas que degradan hemicelulosa		
Endo-1,4- β -xilansas	EC 3.2.1.8	GH5, GH7, GH8, GH10, GH11, GH43
Exo-1,4- β -xilosidasas	EC 3.2.1.37	GH3, GH39, GH43, GH52, GH54
Endo- β -1,4.manosidasas	EC 3.2.1.78	GH5, GH26, GH113
Exo β -1,4.manosidasas	EC 3.2.1.25	GH1, GH2, GH5
Feruloil esterasa	EC 3.1.1.73	CE1
p-Coumaroil esterasa	EC 3.1.1.B10	CE1
Endo- α -1,5-arabinanasa	EC 3.2.1.99	GH43
α -L-arabinofuranosidasa	EC 3.2.1.55	GH43, GH51, GH62
α -glucuronidasa	EC 3.2.1.139	GH67
Xilan α -1,2-glucuronosidasa	EC 3.2.1.131	GH67
α -galactosidasa	EC 3.2.1.22	GH4, GH27, GH36, GH57, GH97, GH110
Endo-galactanasa	EC 3.2.1.89	GH53
β -glucosidasa	EC 3.2.1.21	GH1, GH3
Acetil esterassas	EC 3.1.1.6	CE16
Acetilxilan esterassas	EC 3.1.1.72	CE1, CE2, CE3, CE4, CE5, CE6, CE7, CE12, CE16
Glucuronometil esterassas	EC 3.1.1	CE15

Enzimas que degradan celulosa		
Endoglucanasas	EC 3.2.1.4	GH5, GH6, GH7, GH9, GH12, GH45, GH74
Exoglucanasas	EC 3.2.1.91	GH5, GH6, GH9
β -glucosidasas	EC 3.2.1.21	GH1, GH2, GH3, GH5, GH9, GH30, GH39, GH116
1,6- β -d-Glucosidasa	EC 3.2.1.75	GH5, GH30
1,3- β -d-Glucosidasa	EC 3.2.1.39	GH5, GH16, GH17, GH55, GH64, GH81, GH128
Exo-1,3- β -glucanasa	EC 3.2.1.58	GH3, GH5, GH16, GH17, GH55
1,3-1,4- β -d-Glucosidasa	EC 3.2.1.73	GH16, GH50, GH86, GH118

2.4.1 Degradación de la hemicelulosa

La hidrólisis de la hemicelulosa exige la acción cooperativa de varios tipos de enzimas denominadas hemicelulasas que trabajan a diferentes niveles de la matriz hemicelulósica para biodegradarla hasta azúcares monoméricos y ácido acético, estas enzimas se clasifican frecuentemente según su acción en distintos sustratos (Sánchez, 2009). Esta actividad sinérgica es necesaria no solo por la complejidad de la hemicelulosa sino también por su conexión con los otros componentes de la pared celular de la planta (Ludwig *et al.*, 2018). Las enzimas cruciales en la despolimerización de la hemicelulosa son enzimas accesorias y desramificantes como las xilan-esterasas, feruloil-esterasas y p-coumarínicas, α -L-arabinofuranosidasas, α -4-O-metil glucuronosidasas y β -galactosidasas entre otras, que actúan de forma sinérgica. Las endo- β -1,4 xilanasas rompen los enlaces β -1,4 glicosídicos de la cadena principal, generando mezclas de xilooligosacáridos, los cuales a su vez son convertidos en D-xilosa por la acción hidrolítica de enzimas como las manosidasas y xilosidasas (Kormelink *et al.*, 1993; Conejo-Saucedo *et al.*, 2011).

2.4.2 Degradación de la xilana

Debido a la complejidad estructural de la xilana, las ramificaciones de la cadena principal obstaculizan el acceso de las endoxilanasas al polímero. Las cadenas laterales no afectan la geometría del enlace glicosídico, pero lo hacen determinando la solubilidad, la conformación física y reactividad de la molécula de xilano con otros componentes de la hemicelulosa, lo que afecta en gran medida el modo de degradación enzimática (Karboune *et al.*, 2009). Por lo tanto, requiere de enzimas que rompan los enlaces glicosídicos internos (acción despolimerizante) y enzimas que rompan los obstáculos espaciales (puntos de ramificación) que limitan la formación del complejo enzima-sustrato en el esqueleto de polisacárido (Moreira and Filho, 2016). Las cadenas laterales de la xilana deben ser

removidas por arabinofuranosidasas, esterases y glucuronidasas antes de que la cadena principal de xilana se pueda hidrolizar por la acción de endoxilanasas (Lewis *et al.*, 2012; Kubicek, Starr and Glass, 2014). Las enzimas desramificadoras trabajan de manera sinérgica en la descomposición de la xilana, permitiendo el acceso de xilanasas a la cadena principal, mientras que las enzimas accesorias liberan los sustituyentes secundarios más fácilmente a partir de fragmentos de xilana (Fig. 4) (Conejo-Saucedo *et al.*, 2011; Biely, Singh and Puchart, 2016; Ludwig *et al.*, 2018).

Se necesitan diferentes enzimas para la degradación del arabinoxilano (AX) entre las que están las endoxilanasas (EC 3.2.1.8) que hidrolizan la cadena principal del polisacárido, actuando de manera endo en la cadena, pero su actividad es frecuentemente obstaculizada por las sustituciones de arabinosa, sobre la que actúan las α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) que escinden la arabinosa de la de la cadena principal y actúan en sinergia con las endoxilanasas. Para completar la degradación de AX, se necesitan β -xilosidasas (EC 3.2.1.37) que escinden residuos de xilosa desde el extremo no reductor de la cadena de xilosa.

La cadena principal de la xilana se hidroliza por la acción de endoxilanasas que liberan xilobiosa y xilooligosacáridos de diferente longitud que eventualmente son hidrolizados a xilosa por las β -xilosidasas (Fig. 5) (Saha, 2003; Peixoto-Nogueira and Joa, 2012; Ravanal *et al.*, 2013). Las β -xilosidasas y las endoxilanasas actúan en sinergia, ya que las endoxilanasas generan más extremos reductores para la acción de las β -xilosidasas y estas eliminan los productos finales que inhiben a las endoxilanasas (Lagaert *et al.*, 2014; Biely, Singh and Puchart, 2016).

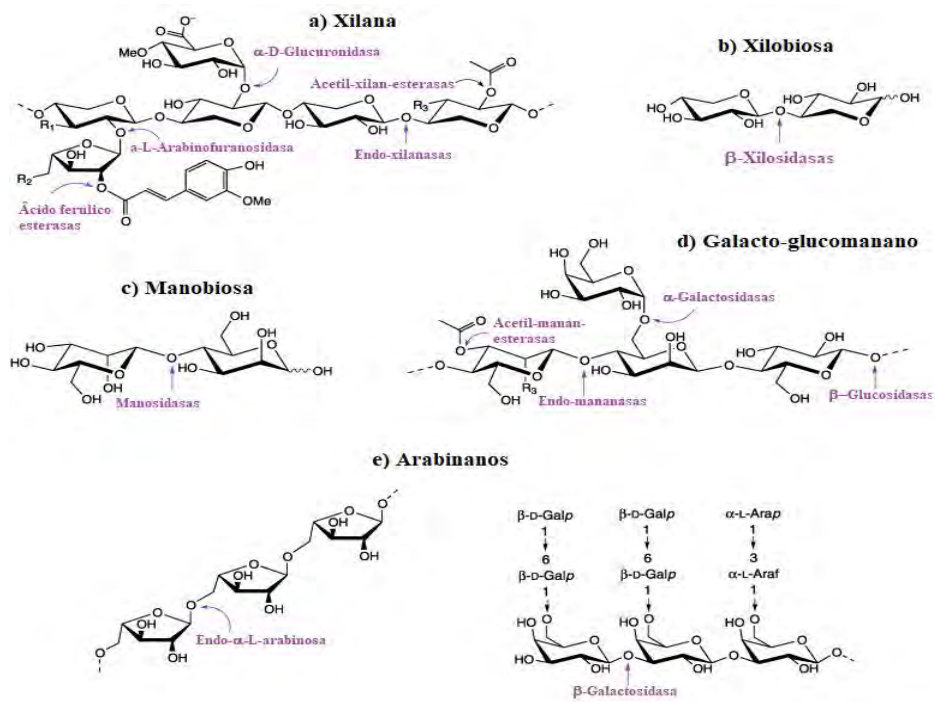


Figura 4. Degradación enzimática de la hemicelulosa. A) Composición de la cadena principal por xilano, la actividad de endoxilanasas y la eliminación de las cadenas laterales por enzimas desramificadoras. B, C, D y E, hidrólisis de xilobiosa, manobiosa, galacto-glucomanano y arabinano (Shallom and Shoham, 2003).

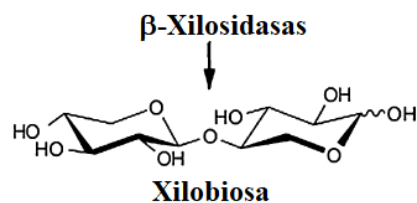


Figura 5. Representación esquemática de las β -xilosidasas que liberan xilosa a partir de la xilobiosa (Mustafa *et al.*, 2016).

2.4.3 Características de las β -xilosidasas

Las xilosidasas actualmente se agrupan en base en las similitudes de sus secuencias de aminoácidos en seis familias de glicosil hidrolasas (GH3, GH30, GH39, GH43, GH52, GH54, GH116 y GH120). Los miembros de la familia GH43 de las glicosil hidrolasas, actualmente están integrados por las enzimas L-arabinofuranosidasa, D-xilosidasa, L-arabinanasa y D-galactosidasa (<http://www.cazy.org>), las cuales se han clasificado en 37 subfamilias individuales, siendo las L-arabinofuranosidasas y las xilosidasas las que constituyen la mayoría de las enzimas GH43 caracterizadas (Lagaert *et al.*, 2014; Mewis *et al.*, 2016). Además, la familia GH43 se caracteriza por estar integrada con un gran número

de enzimas bifuncionales, que en su mayoría son de origen bacteriano, sin embargo también incluye enzimas de arqueas y plantas superiores (Lagaert *et al.*, 2014). Las β -xilosidasas GH43 actúan por el mecanismo de inversión, tienen como base catalítica general un aspartato, como ácido catalítico general un glutamato y otro aspartato que es responsable de la orientación del ácido catalítico (Jordan and Wagschal, 2010; Moraïs *et al.*, 2012).

Una característica estructural común de las enzimas de la familia GH43 es una estructura tridimensional con dos dominios, uno de ellos contiene cinco láminas- β dispuestas en forma de hélice, por lo que a este dominio se le denominó β -hélice, donde se ubican los ácidos catalíticos y la base catalítica. El segundo dominio, adopta una topología de β -sándwich en el C-terminal, cuya función es cerrar una parte del sitio activo para formar un bolsillo. La cavidad del sitio activo está formado por dos subsitios que tienen una capacidad de unión de dos moléculas de monosacáridos y una sola ruta de acceso para pequeñas moléculas, como sustrato (Brüx *et al.*, 2006; Brunzelle *et al.*, 2008). Sin embargo estas enzimas no conservan la misma orientación en sus estructuras, lo cual muestra especificidad hacia ciertos sustratos (Lagaert *et al.*, 2014).

2.5 Reguladores transcripcionales de xilanasas

En los hongos la expresión de las enzimas extracelulares hidrolíticas esta regulada coordinadamente por activadores y represores transcripcionales (Aro, Pakula and Penttilä, 2005; Villa-Rivera *et al.*, 2017). La expresión de genes que codifican xilanasas está sujeta a represión catabólica a través de la acción de CreA bajo una fuente de carbono de glucosa, y la activación es a través de la acción de XlnR bajo una fuente de carbono de polisacáridos complejos (Chung *et al.*, 1999; Tani, Kawaguchi and Kobayashi, 2014; Villa-Rivera *et al.*, 2017) El activador transcripcional XlnR regula a los genes que codifican enzimas xilanolíticas y celulolíticas, y regula el uso de D-xilosa y L-arabinosa via la ruta catabólica de las pentosas (Battaglia *et al.*, 2011; Goldman *et al.*, 2013). Se han encontrado homólogos de XlnR en los genomas de la mayoría de los hongos ascomicetos por lo que se asume que tienen la misma función (Battaglia *et al.*, 2011).

Sustratos como la celulosa, xilana, soforosa, xilobiosa o L-arabitol, actúan como inductores de represión de estas enzimas xilanolíticas si se encuentra en altas concentraciones o como inductores de activación a bajas concentraciones. Adicionalmente, el pH del medio es otro factor que juega un papel importante en la regulación de la

expresión (Pérez-González *et al.*, 1998; Mach and Zeilinger, 2003; Aro, Pakula and Penttilä, 2005).

2.6 Genes de β -xilosidasas en hongos

Debido al conocimiento de que los hongos filamentosos son productores eficientes de enzimas xilanolíticas y que la degradación natural de la xilana por diversos microorganismos requiere la acción coordinada de varias enzimas, incluyendo endoxilanasas y β -xilosidasas: estas últimas también han sido de considerable interés para varias aplicaciones biotecnológicas (La Grange *et al.*, 2001). Sin embargo, hasta ahora hay pocos estudios que aborden el aislamiento y la caracterización molecular de genes de β -xilosidasas de hongos filamentosos (Tabla 3).

Tabla 2. β -xilosidasas caracterizadas en hongos.

Hongo	Aportación	Año	Cita
<i>Trichoderma reesei</i>	Aislamiento, expresión y actividad de un gen que β -xilosidasa expresado en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1996	Margolles-Clark <i>et al.</i> , 1996
<i>Aspergillus nidulans</i>	Clonación molecular y análisis de la regulación transcripcional de una β -xilosidasa	1998	Pérez-González <i>et al.</i> , 1998
<i>Cochliobolus carbonum</i>	Aislamiento del gen de β -xilosidasa	1999	Wegener, Ransom and Walton, 1999
<i>Aspergillus oryzae</i> KBN616	Análisis de la secuencia de un gen de β -xilosidasa	1999	Kitamoto <i>et al.</i> , 1999
<i>Aspergillus niger</i> 90196	Amplificación de un gen de una β -xilidasa y su posterior expresión y coexpresión en <i>S. cerevisiae</i>	2001	La Grange <i>et al.</i> , 2001
<i>Penicillium herquei</i>	Secuenciación de dos genes de β -xilosidasas	2003	Ito <i>et al.</i> , 2003
<i>Talaromyces emersonii</i>	Caracterización molecular y análisis de un gen que codifica una β -xilosidasa	2003	Reen, Murray and Tuohy, 2003
<i>Aspergillus awamori</i> K4	Secuenciación de un gen de β -xilosidasa	2005	Kurakake <i>et al.</i> , 2005
<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 20524	Aislamiento, propiedades y caracterización de un gen que codifica a una β -xilosidasa	2010	Ohta <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus japonicus</i>	Análisis de secuencia del gen que codifica a una β -xilosidasa	2010	Wakiyama <i>et al.</i> , 2010
<i>Paecilomyces thermophila</i>	Clonación en <i>E.coli</i> de un nuevo de gen de β -xilosidasa y análisis de sus características.	2011	Teng <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Expresión heteróloga del gen de β -xilosidasa en <i>Pichia pastoris</i> .	2013	Ravanel <i>et al.</i> , 2013
<i>Aspergillus awamori</i> 2B.361 U2 / 1	Ensayos de actividad β -xilosidasa	2013	Gottschalk <i>et al.</i> , 2013
<i>Colletotrichum graminicola</i>	Producción de β -xilosidasa para la fermentación de residuos sólidos	2013	Zimbardi <i>et al.</i> , 2013
<i>Penicillium janthinellum</i> MTCC 10889	Producción de β -xilosisas para la fermentación de cítricos	2013	Kundu <i>et al.</i> , 2013
<i>Aspergillus oryzae</i>	Expresión heteróloga de una β -xilosidasa en <i>Pichia pastoris</i>	2014	Kirikyali, Wood and Connerton, 2014
<i>Humicola insolens</i>	Identificación de un nuevo gen de β -xilosidasa	2015	Xu <i>et al.</i> , 2015

<i>Penicillium oxalicum</i>	Análisis de actividad y expresión de un gen de β -xilosidasa	2016	Li <i>et al.</i> , 2016
<i>Penicillium oxalicum</i>	Expresión y caracterización de un gen de β -xilosidasa en <i>Pichia pastoris</i>	2017	Ye, Li and Zhao, 2017
<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	Análisis bioquímico molecular de un gen de β -xilosidasa	2018	Li <i>et al.</i> , 2018

2.7 β -xilosidasas en *C. lindemuthianum*

Como antecedente directo de este trabajo, a partir de ADN genómico se aisló un fragmento de 1710 pb cuyo análisis permitió la identificación del gen *bxyloA* que codifica para una β -xilosidasa de *C. lindemuthianum* raza 1472. El análisis de comparación de la secuencia del fragmento de *bxyloA* con bases de datos internacionales (Blast, NCBI), mostró altos porcentajes de similitud (94%) e identidad (92%) con una secuencia de *C. orbiculare*. La comparación con las secuencias de enzimas de especies de *Colletotrichum* mostró un rango de valores de similitud (94-60%) e identidad (92-47%) que sugieren una alta diversidad genética (Campos-Díaz, 2016). Adicionalmente, de manera preliminar se detectó la actividad β -xilosidasa secretada por las razas 0 y 1472 de *C. lindemuthianum* en cultivos con medio mínimo Mathur suplementado con paredes celulares de *P. vulgaris* como única fuente de carbono. La actividad de β -xilosidasa en ambos patotipos alcanzó un máximo nivel después de 8 días de incubación en una cinética de 1-12 días. Sin embargo, la actividad de la raza patógena 1472 fue 1.6 veces más alta que la de la raza no patógena 0 ($P < 0.0001$) (21 vs 13.2 nmoles of MU/min/mg proteína), sugiriendo una expresión diferencial de la β -xilosidasa entre ambos hongos (Piñón-Escobedo, 2005)

2.8 Aplicaciones biotecnológicas de las β -xilosidasas

La abundancia de la biomasa lignocelulósica procedente de la madera, los pastos, los residuos agrícolas, forestales y los residuos sólidos municipales en la naturaleza, ofrece diversas posibilidades para ser utilizada después de su bioconversión (Fig. 6) (Kumar, Gautam and Dutt, 2016). Estos materiales potencialmente valiosos se han tratado durante mucho tiempo como desechos en todo el mundo, causando problemas económicos y ambientales. Por lo que en la actualidad se trabaja para convertir los residuos lignocelulolíticos en productos de valor agregado, incluidos los biocombustibles, los productos químicos, la fabricación de papel y la alimentación animal (Conejo-Saucedo *et al.*, 2011).

La gran cantidad de xilana en la naturaleza ofrece diferentes posibilidades para ser utilizada después de su bioconversión en xilooligosacáridos y xilosa, por lo que su degradación tiene el potencial de ser una fuente de energía en el futuro. Debido a que las β -xilosidasas son enzimas clave en el sistema xilanolítico, tienen un gran potencial en una amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas. Actualmente, estas enzimas se obtienen de fuentes bacterianas de los géneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus* y *Thermomonospora* y de fuentes fúngicas a partir de géneros de *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Sun and Cheng, 2001).

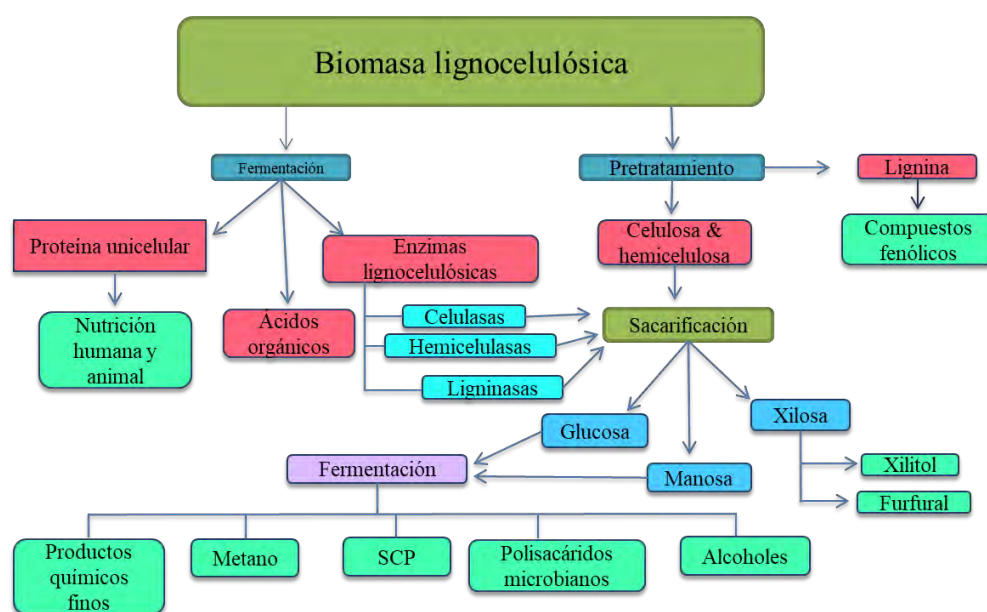


Figura 6. Bioconversión de biomasa lignocelulósica en productos de valor agregado, a través de la fermentación y el pretratamiento por medio de enzimas, para la obtención de diversos productos con valor agregado y de gran utilidad en diversas industrias. Modificado de (Kumar, Gautam and Dutt, 2016).

Desde hace algunas décadas, las β -xilosidasas se han utilizado en varios procesos industriales convencionales, sus reacciones hidrolizantes y de transglicosilación son útiles en la degradación de toneladas de residuos lignocelulósicos (Sánchez Riaño *et al.*, 2010). En estos procesos biotecnológicos se ha hecho uso de un grupo de enzimas de hongos con actividades de celulasas y xilanas que se han modificado utilizando diversas estrategias físicas, químicas y biológicas (Fig. 6). Las estrategias de clonación han revolucionado el uso de hemicelulasas fúngicas en los procesos industriales, sin embargo, el uso de las enzimas de manera individual en estos procesos sólo permite la hidrólisis de un sustrato

único y con ello la generación de un solo producto. La adición de cocteles enzimáticos para la hidrólisis del complejo hemicelulósico es una solución potencial a esta limitación, pero aumentaría el costo (Conejo-Saucedo *et al.*, 2011).

En la actualidad, la aplicación industrial de las enzimas xilanolíticas es creciente, las β -xilosidasas se utilizan a escala cuando se incluyen en cócteles de xilanasas, por ej. En la producción de etanol por fermentación a partir de xilosa (Leslie and Bribiesca, 2013). Además, este azúcar también se utiliza para la producción de xilitol como edulcorante de alimentos, así como sustituto de azúcar para los diabéticos (Knob, Terrasan and Carmona, 2010).

En particular, las β -xilosidasas de hongos filamentosos son más ventajosas que las de otros microorganismos y plantas, debido a su alta estabilidad y bajo costo comercial, por lo que también se emplean en la industria farmacéutica. En relación con la salud humana se consideran prebióticos que ayudan a prevenir las infecciones gastrointestinal, e inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (Knob, Terrasan and Carmona, 2010).

En cuanto a la agroindustria, las enzimas lignocelulolíticas se adicionan a los cereales para facilitar su digestión en los animales, y en la industria del Kraf son adicionadas en los procesos para el blanqueamiento de la pulpa del papel. En la industria alimentaria se utilizan pectinasas, celulasas, xilanasas y β -xilosidasas en la extracción y la clarificación de jugos, con ventajas en relación con el rendimiento, el funcionamiento y la calidad del producto final. En la industria cervecera las β -xilosidasas y xilanasas se utilizan para reemplazar los aditivos habituales como emulsionantes, antioxidantes, ya sean de malta de cebada o trigo, los cuales pueden ser fácilmente sustituidos por procesos enzimáticos.

En la industria de la panificación, mejoran la manipulación de la pasta permitiendo la obtención de un producto final con más volumen y calidad. Además, las β -xilosidasas también se pueden aplicar con xilanasas, celulasas y/o pectinasas en la elaboración del vino, para reducir una concentración de β -glucanos que aumentan la viscosidad del mosto que daña la etapa de filtración en la clarificación. Otras aplicaciones potenciales de las β -xilosidasas, así como de otras hemicelulasas, incluyen el procesamiento de café, maceración vegetal, preparación de alto contenido de fibra en los productos horneados y pigmentos, condimentos, extracciones de aceite vegetal y almidón, y en la industria de los detergentes (Division, 2002; Octavio, 2002; Jordan and Wagschal, 2010; Knob, Terrasan and Carmona, 2010; Sánchez Riaño *et al.*, 2010; Juturu and Wu, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

El aumento en la creciente población ha generado una sobreexplotación de los recursos agropecuarios, dando como resultado el incremento de residuos agrícolas y creando la necesidad de aplicar métodos de biorremediación amigables con el ambiente. La utilización de diversos microorganismos con facultades degradantes ha sido de gran ayuda en el tratamiento de residuos biológicos, el uso de hongos es el más frecuente debido a que su producción tiene costos bajos y degradan fácilmente la pared celular vegetal mediante el uso de complejos enzimáticos.

El fitopatógeno *C. lindemuthianum*, es un hongo hemibiotrófico que secreta enzimas hidrolíticas para la degradación de la pared celular del frijol común. Este tipo de enzimas se han convertido en una importante herramienta para la obtención industrial de diversos productos, en la industria alimenticia, la química o la farmacéutica entre otras. Adicionalmente, tienen un fuerte potencial de aplicación en la degradación de residuos lignocelulíticos que causan daños considerables en las actividades económicas en el sector agroindustrial y el medio ambiente. El análisis preliminar de la actividad de β -xilosidasa secretada por las razas 0 y 1472 de *C. lindemuthianum* creciendo en medio con paredes celulares de *P. vulgaris* sugiere una expresión diferencial entre ambos hongos. Por lo anterior, el aislamiento, identificación y caracterización del gen de β -xilosidasa de *Colletotrichum lindemuthianum* de las razas 0 y 1472 aportará información significativa al incremento del conocimiento del sistema hemicelulolítico de *C. lindemuthianum*. A futuro, este conocimiento puede ayudar a la detección de productos con potencial biotecnológico.

4. HIPÓTESIS

El gen *bxyloA* de *Colletotrichum lindemuthianum*, que codifica para una β -xilosidasa, se expresa de manera diferencial dependiendo del estilo de vida del hongo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Realizar el análisis bioinformático y molecular de un gen de β -xilosidasa de *Colletotrichum lindemuthianum*.

5.1.1 Objetivos específicos:

- 1 Realizar la caracterización bioinformático-molecular de la secuencia del ADNc de *bxyloA* de *C. lindemuthianum*.
- 2 Analizar el perfil de transcripción de *bxyloA* en una raza patógena (1472) y una no patógena (0) de *C. lindemuthianum*.
- 3 Analizar las relaciones filogenéticas y estructura 3D de la proteína BXYLOA de *C. lindemuthianum* dentro del género *Colletotrichum*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

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

6.2. Medios de Cultivo

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

El hongo *C. lindemuthianum* se mantuvo de forma rutinaria en medio sólido Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Para la preparación se lavaron y cortaron en cuadros pequeños 250 g de papas, se cocieron en 500 ml de agua destilada y posteriormente se filtró a través de gasa. Se agregaron 15 g de dextrosa previamente disueltos en agua destilada y 20 g de agar. Posteriormente se esterilizó el medio durante 15 minutos a 15 libras de presión (PRESTO Olla Express). Para la preparación del medio Papa-Dextrosa (PD) se realizó el mismo procedimiento solo que en este caso no se adicionó agar (French and Hebert, 1980).

6.2.2 Medio mínimo Mathur

Para realizar las inducciones de micelio de *C. lindemuthianum* se preparó medio mínimo Mathur como sigue; en un matraz de un litro se adicionaron 500 ml de agua destilada, desionizada (H_2O_{dd}), 2.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.75 g KH_2PO_4 , 5.28 g de ácido L-glutámico y 2.5 % de pared celular vegetal de *P. vulgaris* como fuente de carbono. Se disolvió por agitación y se ajustó el pH a 5.2 con NaOH 10 (Potenciómetro: ORION 3 STAR pH Benchstop, Thermo Scientific), se aforó a un litro con H_2O_{dd} y se esterilizó por 15 min a 15 lb de presión.

6.3 Purificación de pared celular vegetal.

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

con acetona. Se filtró la acetona y el precipitado se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente (Fry, 2006).

6.4 Ensayos de inducción

Seis piezas de 0.6 cm de diámetro de micelio crecido en placas de PDA se inocularon en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio PD y se incubaron a 18 °C durante diez días a 250 rpm en una incubadora orbital con refrigeración (ThermoFisher). Transcurrido el tiempo de incubación el micelio se filtró a través de un papel filtro previamente esterilizado y se lavó con agua destilada, desionizada, estéril (H₂O_{dde}) para eliminar los residuos de PD y se transfirió a medio Mahtur modificado adicionados con 2.5 % de glucosa o pared celular de *P. vulgaris*. Los cultivos con glucosa se incubaron durante ocho horas y los cultivos con PCV se incubaron 0, 6, 48 h, y 5 y 9 días. A continuación, el micelio se recuperó por filtración y se almacenó a -80 °C.

6.5 Purificación de ADN

Para la extracción de ADN, se siguió el protocolo propuesto por Kuramae-Izioka 1997. Se tomó 0.1 g de micelio congelado a -80°C y se maceró con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. Se pasó a un microtubo de 1.5 ml, se agregó 1 ml de buffer de extracción (Tris-HCl pH 8.0 100mM, EDTA pH 8.0 50mM, NaCl 500mM y SDS 1%) y se mezcló por inversión. Se incubó durante 40 min a 65°C (Thermomixer eppendorf AG 22331 Hamburg). Posteriormente se agregó medio volumen de acetato de potasio 5M, se mezcló gentilmente y se incubó en hielo durante 30 min. La muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C (Termo scientific sorvall legend micro 17R centrifuge). Se separó la fase acuosa y se pasó a un microtubo de 1.5 ml estéril y se agregó un volumen igual de cloroformo, se mezcló perfectamente y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a otro microtubo estéril de 1.5 ml, se precipitó la muestra adicionando un volumen igual de isopropanol frío (-20°C), se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min descartando el sobrenadante y conservando el precipitado. Por último, se evaporó el isopropanol en un ultraconcentrador al vacío (miVac DNA concentrador Genevac Model DNA-2166-COO) por 15 min a 50°C y se resuspendió en 30 µl de agua destilada desionizada estéril (H₂O_{dde}). Se agregó 1 µl de RNAsa a una concentración de 40 µg/ml (libre de DNAsas) y se incubó 3 horas a 37 °C en termomix (Thermomixer eppendorf AG 22331 Hamburg). Se corroboró la integridad del DNA mediante electroforesis en gel de

agarosa al 1%, en TAE 1X con buffer se carga 1X, teñido con Sybr safe 1X (Invitrogene). Para calcular la concentración del ADN se realizó tomo 1 μ l y se midió la absorbancia (Abs) de la muestra a 260 nanómetros (nm) (Nanodrop One, ThermoFisher).

6.6 Purificación de ARN

La extracción de ARN total se realizó mediante lo establecido por el método TRIzol[®], para lo cual se tomó 0.1 g de micelio congelado a -80 °C, se agregó nitrógeno líquido y se maceró en un mortero esteril hasta que se obtuvo un polvo fino. Se pasó a un microtubo de 1.5 ml estéril con 1 ml de TRIzol[®], se agitó vigorosamente con vortex y se incubó 5 min en hielo, se agregaron 200 μ l de cloroformo, se mezcló con vortex brevemente y se incubó 5 min en hielo. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4°C (Termo scientific sorvall legend micro 17R centrifuge). Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 500 μ l de isopropanol frío (-20 °C), se mezcló por inversión y se incubó a -20 °C por 2 h. Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C y se retiró el isopropanol. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol frío (-20 °C) al 75% y se centrifugó 5 min a 7500 rpm a 4°C. Se retiró el etanol y la pastilla se secó a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente se resuspendió en 60 μ l de H₂O ultrapure™ (Thermomixer Eppendorf AG 22331). Para eliminar restos de ADN a la muestra se le adiciono 1 μ M de buffer de reacción 1X para Dnasa I (20 mM Tris-Hcl pH 8.4, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl) y 1 μ l de Dnasa I, se mezcló brevemente, se incubó 15 min a temperatura ambiente, se inactivo mediante la adición de 1 ml de EDTA 25 mM e incubación a 65 °C durante 10 min.

6.7 Electroforesis en gel de agarosa

La integridad del ARN se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8) con buffer de carga 1X tipo III 6X (Bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook and Russell, 2001), teñido con Sybr safe 1X (Invitrogen), con una corriente de 80 voltios (Electroforesis Power Suppliy-EPS 301) durante 30 min. Los geles fueron visualizados en un fotodocumentador (Gel Logic 200 Imagen System). Finalmente, se midió la concentración del ARN purificado por espectrofotometría a 260 nm (Nanodrop One, ThermoFisher).

6.8 Síntesis de ADNc

A partir del ARN total purificado se realizó síntesis de ADNc mediante el protocolo SuperScript III (Invitrogene) como sigue; en un microtubo de 0.2 ml y libre de nucleasas, se agregaron 10 µl de ARN total (1 µg), 1 µl de oligo dT (1 µM), y 1 µl de DNTPmix (10 mM). La reacción se incubó a 65 °C durante 5 min, transcurrido ese tiempo se pasó a hielo por 1 min y se agregaron 4 µl de buffer 5x first-strand, 1µl de DDT (0.1 M), 0.5 µl de RNAsa OUT (40 u/µl) y 0.5 µl de SuperScript III RT (Invitrogene). Se mezcló gentilmente por pipeteo y se incubó a 50°C por 50 min (Thermomixer Eppendorf AG 22331), se inactivó por calor a 70°C por 15 min, se pasó a hielo. Para remover el ARN se adicionó 1 µl de RNAsa H (2 U/µl) de *E. coli* y se incubó a 37 °C durante 20 min. Por último las muestras se guardaron a -20°C.

6.9 Amplificación por PCR de punto final

Para corroborar la integridad del ADNc después de la síntesis, se realizó una PCR control utilizando un par de oligonucleótidos específicos de los genes de expresión constitutiva GPDH3-D, GPDH3-R y β -tub1D, β -tub1R (Conejo Saucedo *et al.*, 2016). Para la amplificación del gen de la β -xilosidasa se utilizaron diferentes juegos de oligonucleótidos (Tabla 4), que amplifican dos fragmentos de aproximadamente 1500 y 700 pb, diseñados previamente a partir de una secuencia de β -xilosidasa putativa del genoma de *C. lindemuthianum* raza 0.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *bxiloA*.

Oligo directo	Oligo reverso	Tm	Tamaño de fragmento esperado
Clxilo1D	Xilo1qR	57 °	700 pb
Xilo qD	Clxilo1R	59 °	1500 pb

Para la reacción de PCR se mezcló 2.5 µl de Buffer PCR 10X, 0.75 µl de MgCl₂ (50 mM), 1µl de oligonucleótido directo (10 pm/µl), 1µl de oligonucleótido reverso (10 pm/µl), 1µl de dNTPmix (2.5 mM), 0.1 µg de ARN y 0.3 µl (1 U) de Platinum *Taq* DNA polimerasa (Invitrogene) en un volumen final de 25 µl. La reacción se incubó en un termociclador (Termo Veriti 96 well thermal cycler AB Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de

desnaturalización 94°C durante 30 seg, alineamiento 59 °C por 45 seg y extensión 72°C durante 30 seg. Por último una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con Sybr safe 1X.

6.10 Análisis de expresión 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 inducido con pared celular e incubado por 0, 6 y 48 h, 5 y 9 días. 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 *bxiloA* se utilizó el juego de oligonucleótidos específicos Xiloq-1D y Xiloq-1R, diseñados a partir de la secuencia genómica de la raza 0 de *C. lindemuthianum*, para la amplificación de un fragmento de 162 pb. 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 -0.83 y R² de 0.8793 con una eficiencia del 3.3376 %.

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 EXPRESS SYBR GreenER qPCR Supermix Universal (Invitrogen) y 25 μ M de ROX Colorante de referencia (Invitrogen). 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 STEPONEPLUS (Applied Biosystems). Las amplificaciones se realizaron en las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de 95 °C durante 40 seg, 57.7 °C durante 40 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 ($\Delta\Delta$ Ct). Los datos se obtuvieron por triplicado y fueron analizados en Excel. Se realizó análisis de varianza (ANOVA). Los resultados se reportaran como las medias con errores estándar (SE). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

6.11 Secuenciación y análisis de secuencias

Los productos de PCR de ADN y ADNc se secuenciaron por el método dideoxy (Sanger *et al.*, 1977), mediante el servicio comercial de 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, NCBI). Se editaron con el software Chromas 2.5.1 y con el software Augustus (Stanke *et al.*, 2004). Se realizaron alineamientos de las secuencias de las β -xilosidasas putativas de los genomas de especies de *Colletotrichum* disponibles en bases de datos, utilizando los software BioEdit 7.2.5.0 (Hall, 2004), Clustal Omega de European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y Clustal X 2.1 (Larkin *et al.*, 2007). Para el análisis de los posibles dominios de la proteína se accedió a la plataforma en línea Pfam <https://pfam.xfam.org/> (El-Gebali *et al.*, 2019).

6.12 Modelaje 3D y estructura secundaria

Existen varias estrategias de cómputo que se aproximan a la predicción de la estructura tridimensional real de una proteína a partir de la información de la secuencia de aminoácidos, sin embargo, la de mayor éxito es el modelado por homología. Los modelos se construyen sobre la base de la alineación con plantillas mediante ProMod3. Las coordenadas que se conservan entre el objetivo y la plantilla se copian de la plantilla para el modelo. Las inserciones y deleciones son remodeladas utilizando una biblioteca de fragmentos. Después las cadenas laterales son reconstruidas. Por último, la geometría del modelo resultante se regulariza mediante el uso de un campo de fuerza mediante los software en línea Swiss Model (Biasini *et al.*, 2014). El software I-TASSER (Yang *et al.*, 2015) da un enfoque jerárquico de la estructura de proteínas y la función de predicción. Por último, las ideas de función del objetivo se derivan plegando los modelos 3D a través de la base de datos de proteínas BioLiP. La edición del modelo tridimensional se llevó a cabo con el software UCSF Chimera 1.10.2 (Pettersen *et al.*, 2004). Se realizó sobreposición de estructuras 3D utilizando el software en línea iPBA webserver http://www.dsimb.inserm.fr/dsimb_tools/ipba/ (Brevern, Etchebest and Hazout, 2000). La predicción de estructura secundaria se realizó mediante el software en línea PROMALS3D (<http://prodata.swmed.edu/promals3d/promals3d.php>) (Pei and Grishin, 2007).

6.13 Análisis filogenético

Se realizó un análisis filogenético de los aminoácidos deducidos de la β -xilosidasa de *C. lindemuthianum*, 27 β -xilosidasas putativas localizadas en los genomas de *Colletorichum* sp. y una secuencia del basidiomiceto *P. ostratus* como grupo externo. Las secuencias de aminoácidos deducido se alinearon con el software ClustalX (Larkin *et al.*, 2007), utilizando parámetros por default. Antes del análisis filogenético, se excluyeron las secuencias del péptido señal y los extremos N- y C-terminales. La construcción de árboles filogenéticos se realizó con los métodos de Máxima verosimilitud (ML) mediante el software Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013) e Inferencia Bayesiana (IB) utilizando el software Mr. Bayes 3.2.2 (Ronquist, Huelsenbeck and Teslenko, 2011). El soporte de las ramas se estimó por análisis bootstrap (PB) y probabilidad posterior (PP) de 1000 réplicas. Las ejecuciones de MrBayes se realizaron con los siguientes parámetros: modelo de evolución de amino WAG+G+I con corrección gamma, cuatro ejecuciones independientes de cuatro cadenas cada una (una cadena de frío y tres cadenas calientes) para 10 millones de generaciones con muestreo cada 1000 generaciones. Los árboles y los parámetros se resumieron después de descartar el 25% de los datos. Los árboles remanentes se resumieron en un árbol consenso de mayoría y se visualizaron mediante el software FigTree v1.4.0 (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

7. RESULTADOS

7.1 ADN total purificado

En la figura 7 se muestra la integridad del ADN genómico extraído de la raza 1472 de *C. lindemuthianum*. La evaluación de la concentración de ADN mostró 180 ng/ μ l.

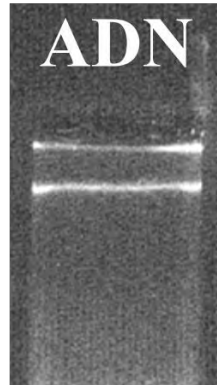


Figura 7 Electroforesis de ADN total purificado de *C. lindemuthianum*. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X, teñido con Sybr safe 1X. Carril 1 ADN genómico de la raza 1472.

7.2 ARN total purificado

En la figura 8A se muestra la integridad del ARN total de micelio de *C. lindemuthianum* de las razas 0 y 1472 inducido con pared celular de *P. vulgaris* durante 48 h, el cual se utilizó para la síntesis de ADNc del gen *bxyloA*. En las figuras 8 B y C se muestra el ARN total de micelio de las razas 1472 y 0 correspondientemente, inducidos con pared celular de *P. vulgaris* durante 0, 6 y 48 h, 5 y 9 días, y del control crecido con glucosa durante 8 h. Se evaluó la concentración de cada muestra por espectrofotometría (Tabla 5).

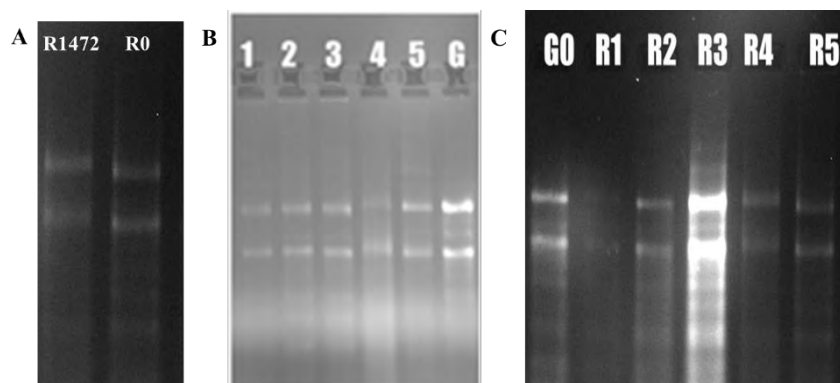


Figura 8. Integridad del ARN total purificado de *C. lindemuthianum* razas 0 y 1472. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X, teñido con SybrSafe 1X. a) En el gel se muestran los carriles R1472 y R0 donde se localizan las muestras de ARN de la raza 1472 y raza 0 correspondientes las inducciones por 48 h con pared celular de *P. Vulgaris* con pared celular vegetal. b) En el gel se muestran los carriles 1,2, 3, 4 , 5 y G correspondientes al ARN total de la raza 1472 de los siguientes tiempos de inducción: 0, 6, y 48 h, 5 y 9 días de inducción con pared celular de *P.*

Vulgaris y en el carril G la inducción con glucosa durante 8 h y en el gel c) se muestra el ARN total de la raza 0 en los mismos tiempos de inducción nombrados R1, R2, R3, R4, R5 Y G0.

Tabla 4. Concentración de ARN total purificado

Muestra	Concentración (ng/μl)
R1472	2342
R0	2015
1	1525
2	1697
3	3929
4	1223
5	3577
G	6378
R1	1494
R2	1612
R3	1587
R4	1898
R5	1036
G0	2719

7.3 Análisis bioinformático-molecular del gen *bxyloA* de *C. lindemuthianum*

La secuencia del producto de amplificación de la región estructural del gen *bxyloA* a partir de ADN genómico de micelio de la raza 1472 de *C. lindemuthianum* mostró un tamaño de 1860 pb, y el análisis de comparación de esta secuencia con la correspondiente en el genoma de la raza 0 con la cual ya se contaba, corroboró su identidad como codificante de una β-xilosidasa. Posteriormente, el análisis de comparación a nivel de nucleótidos de ambas secuencias mostró 100% de identidad (Fig. 9), por lo cual en los siguientes análisis se utilizó solo una secuencia. Como resultado del análisis de la secuencia del ADN genómico comparable entre ambas razas, se detectó un UTR5' de 199 pb, cuatro exones con un marco de lectura de 1709 pb, tres intrones y un UTR3' de 237 pb (Fig. 10).

En la figura 11 se muestran los productos de amplificación de ADNc del gen *bxyloA* de micelio de ambas razas de *C. lindemuthianum* inducido por 48 h con pared celular de *P. vulgaris*. El gen se obtuvo en dos fragmentos mediante el uso de dos juegos de oligonucleótidos (Tabla 2), con un tamaño esperado de aprox. 1500 y 700 pb.

Para verificar la identidad de la secuencia de los dos fragmentos de ADNc del gen se *bxyloA* de manera preliminar se realizó una comparación con bases de datos internacionales (Blast, NCBI). A continuación el ensamble y edición de la secuencia resultó en 1709 pb para ambas razas con una identidad de 100% (Fig 12).

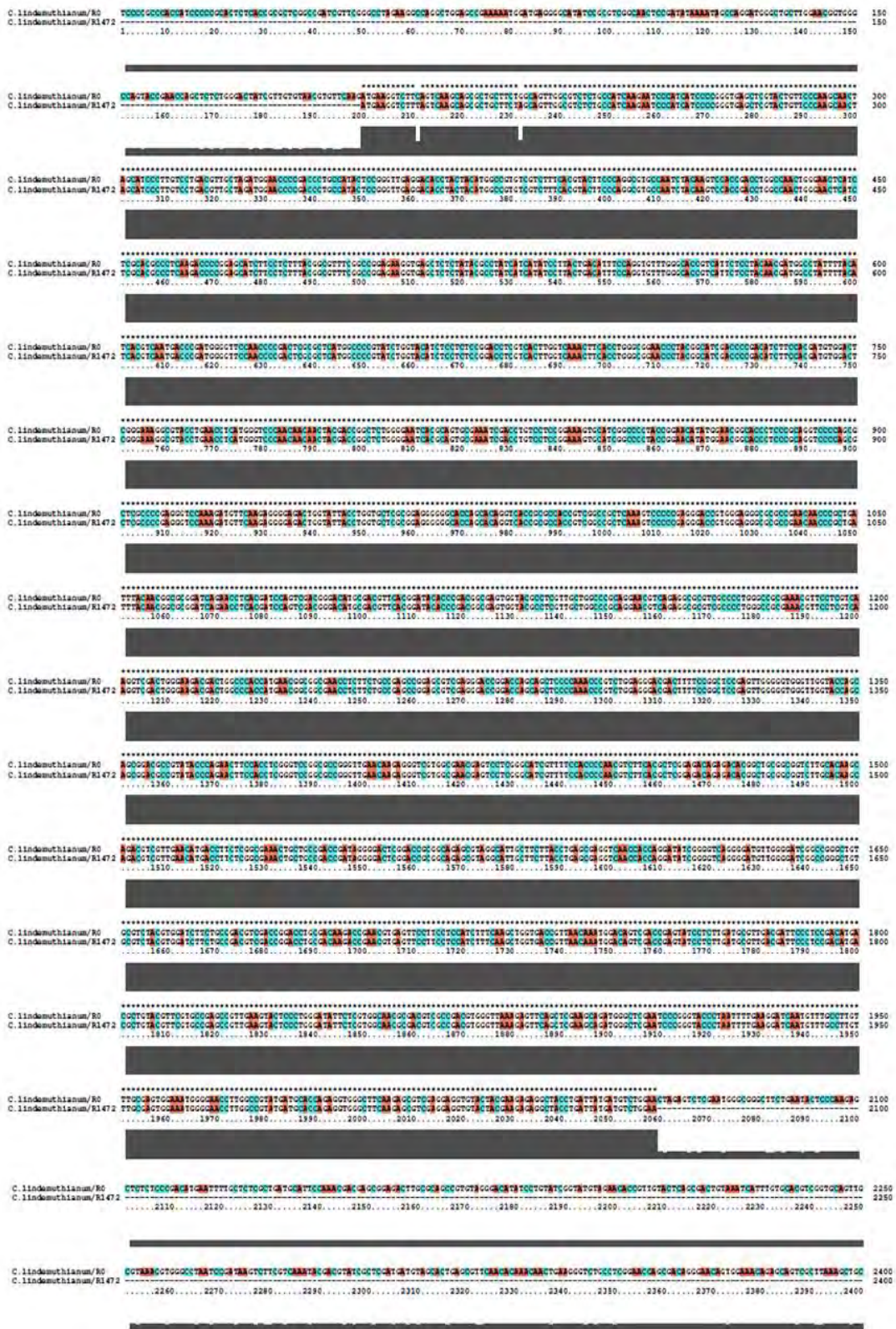


Figura 9. Análisis comparativo de las secuencias genómicas (ADN) del gen *bxyloA* ambas razas de *C. lindemuthianum*.

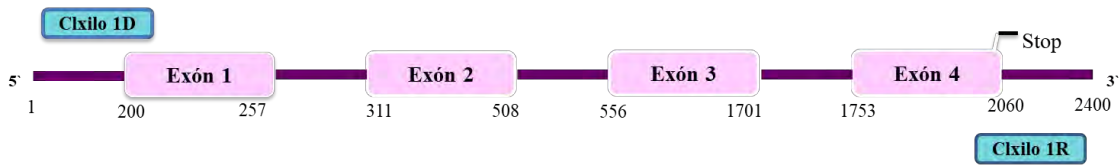


Figura 10. Esquema de la estructura del gen *bxyloA*.

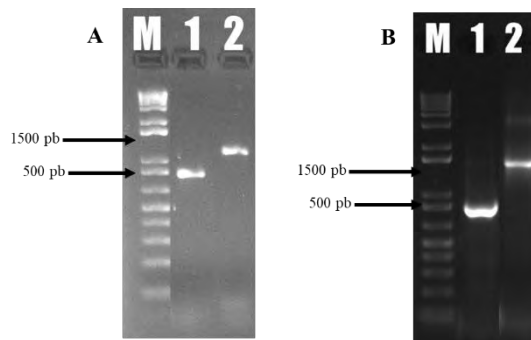


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X, teñido con Sybr safe 1X. Carril M, marcador de tamaño molecular de 1Kb Plus Ladder. A) Productos de amplificación del gen de *bxyloA* de la raza 1472. B) Productos de amplificación del gen de *bxyloA* de la raza 0.

El marco de lectura abierto de la secuencia de BXYLOA reveló 570 aa (Fig. 13), con un péptido señal en el extremo amino con sitio de corte entre S¹⁷ e I¹⁸ (Fig. 14) que genera una proteína madura de 552 aa, de acuerdo al análisis con el software en línea SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), la cual tiene un peso molecular aproximado de 61247 Daltones según el software en línea (<http://www.lab314.com/genmol/unaletraproteina.htm>). Adicionalmente, mediante comparación con la base de datos Pfam, se identificó en la secuencia de la proteína el dominio catalítico con los residuos de aa D¹² D¹²⁵E¹⁸⁷ característicos de las glicosil hidrolasas (GH) de la familia 43 (Fig. 13). De acuerdo a la predicción mediante el software en línea NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), se identificaron cinco posibles sitios de N-glicosilacion N^(132, 192, 258, 468 y 502) (Fig. 15).

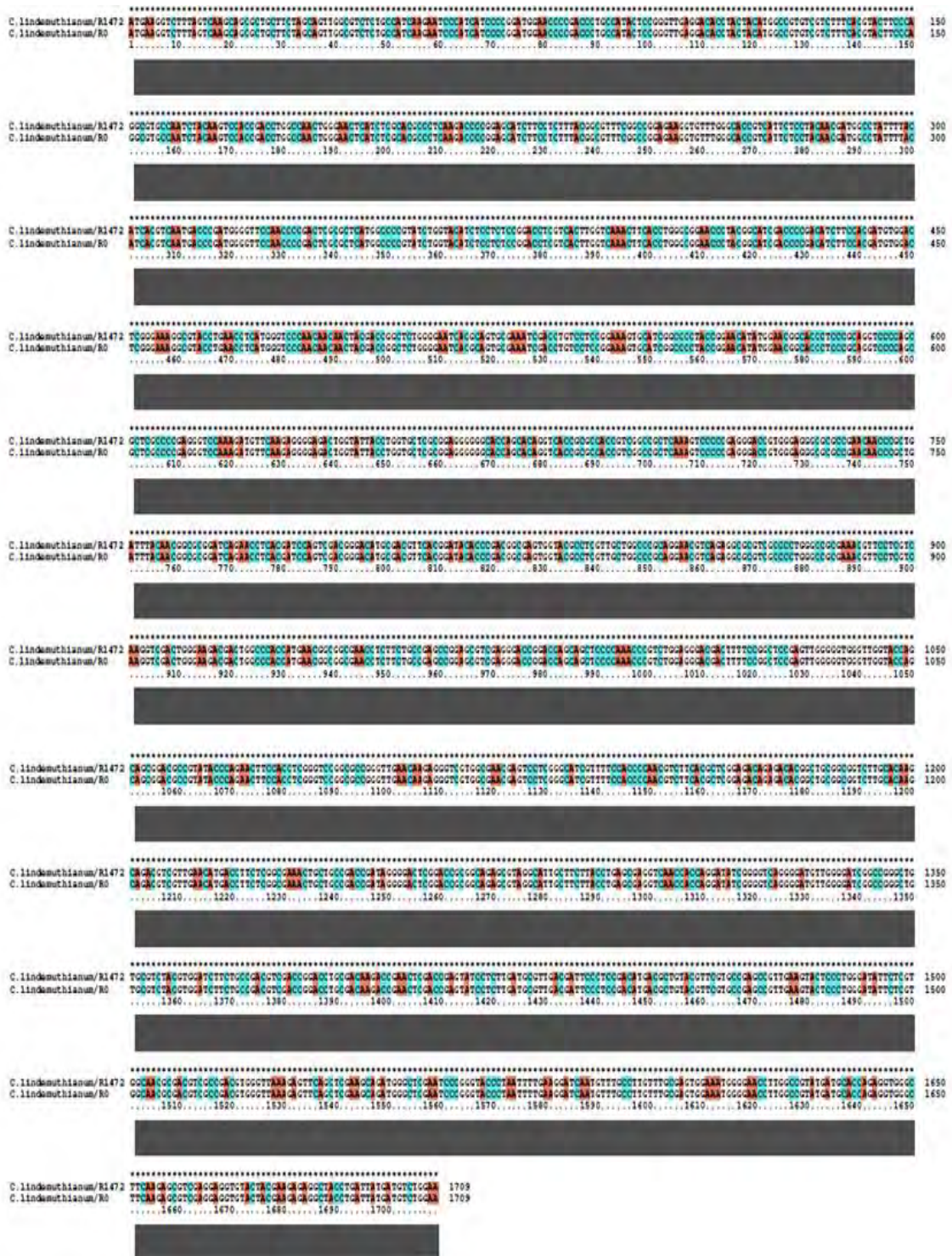


Figura 12. Análisis comparativo de las secuencias de ADNc del gen *bxyloA* ambas razas de *C. lindemuthianum*.

MKVFSQAALLLAVGVSAIKNPIIPGWNPDPAILRVEDTY^YMAVSSFTYFPGVPI
 YKSTDLANWELISHALKTPEHLPLYGVSA GEGVWAPSFSYNDGLFYITSMTRW
 GSNPDSRSWPRIWYISSPDLVTWSNFTWAEPYGIDPDIFHDVDSGKAYLNLMG
 PNNNYDRLWGITQCEIDLSSGKCIGPYRNIWNGTLPQVPSARPEEGPKMFKRGD
 WYYLVLAEGGTSTGHRATVGRSKSPEGPWEGAPNNPLIYNGADQNLTIQSTG
 HATFTDTPDGEWYASLLARRNVRGASPLGRETFLVKVDWEDDWPTMNGGEP
 LLPSRSVEGPDQQLPKPVWRDDFSGSELGVGWYQQRTPYTQNFHLGSGAGLN
 KRVVANESSGIVFHPNVFTLGDRDTAAAVLHKQTSLNMTFSAKLLPTDRGLGP
 RQSVGIASYLEVNHQDIGVRGCWGSAGLCVYVDLLPTSTGPATRPNSTEYPL
 DALTIPSDMTLYVRAEPLKYSLGYSRGNATSPTWVKEFSSKQMGSNPGYPNFE
 GSMFALFASGN GEPWPYDAPEVGFKSV^EEVYEEERLPDYDVW*

Figura 13. Secuencia deducida de aminoácidos de la β-xilosidasa de *C. lindemuthianum* razas 0/1472. Las letras en rosa indican los aminoácidos correspondientes al péptido señal; D y E indican los residuos de aminoácidos catalíticos conservados en las β-xilosidasas GH43; el * indica el codón detención.

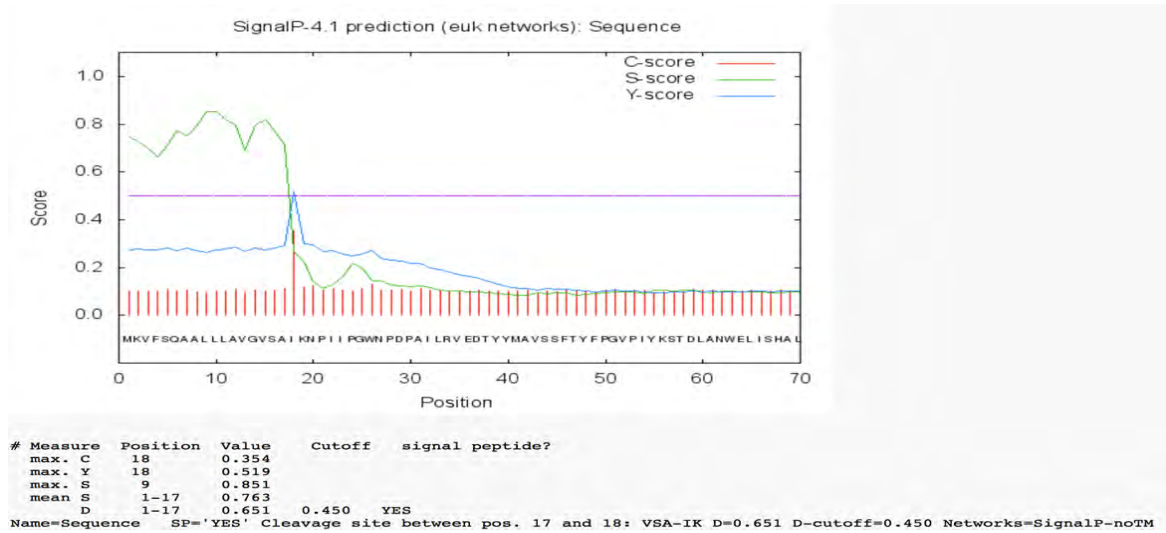


Figura 14. Representación gráfica del sitio de corte del péptido señal de BXYLOA de *C. lindemuthianum*.

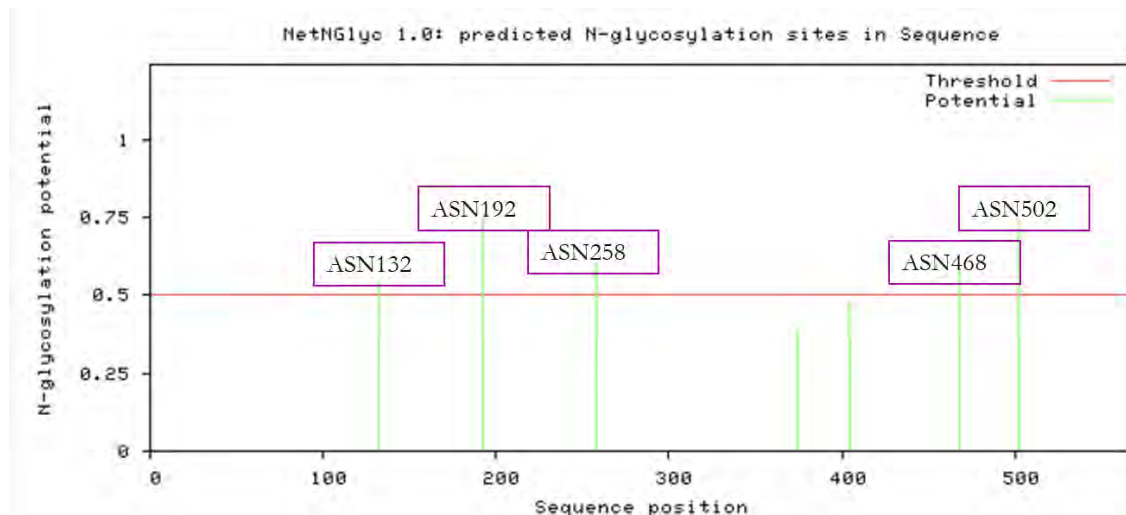


Figura 15. Ubicación de los sitios de posible N- glicosilación en BXYLOA de *C. lindemuthianum*.

El análisis comparativo de la secuencia deducida de aminoácidos (BXYLOA) del gen *bxyloA* con 26 secuencias de genes putativos codificantes para BXYLOA identificados en los genomas de las especies de *Colletotrichum* disponibles en bases de datos internacionales (BLAST NCBI) mostró dos grupos, uno con altos porcentajes de similitud (98-83%) e identidad (97-76%) y otro donde se observaron secuencias con bajos porcentajes de similitud (69-34%) e identidad (65-23%), indicando una gran diversidad entre las β -xilosidasas (Tabla 5). Es importante mencionar que para la mayoría de las especies se localizó un solo gen putativo para una β -xilosidasa similar a la de este estudio, sin embargo, hubo algunas especies como *C. higginsianum*, *C. forinae* y *C. gloesporoides* donde se identificaron dos, tres y cuatro copias de este gen, las cuales fueron numeradas para su identificación en cada especie. La secuencia de BXYLOA de *C. lindemuthianum* presentó altos porcentajes de identidad y similitud (98 y 94 % respectivamente) con una secuencia correspondiente detectada en el genoma de *C. lindemuthianum* raza 83 de origen Colombiano, disponible en bases de datos.

El alineamiento clustal de las secuencias de *C. lindemuthianum* (1472/0) y 26 secuencias de genes de β -xilosidasas putativas identificadas en los genomas de especies del género *Colletotrichum* reveló pocas regiones conservadas entre las secuencias (Fig.14). Sin embargo, en la mayoría de las secuencias se identificaron los residuos del sitio catalítico característico de las proteínas pertenecientes a la familia GH43, dos residuos de ácido aspártico (D) y uno de glutámico (E). En algunas de las secuencias se detectaron residuos de G, R, Q o K en lugar de D y E, que cumplen con las características físico químicas de

los residuos polares para ser funcionales. También se identificó el dominio β -sandwich y el dominio β -hélice, característicos de las proteínas GH43 (Fig. 16).

Tabla 5. Similitud e identidad de la secuencia del gen *bxyloA* de *C. lindemuthianum* con secuencias de genes de *Colletotrichum* spp.

Especie	Similitud %	Identidad %	Ubicación en el genoma	Sitio de corte del PS	Núm. De acceso
<i>C. lindemuthianum</i> 89	98	97	248067-247993;305565-305702;247969-247757;247712-246552	17-18	MASP02000295.1
<i>C. orbiculare</i> BXYLO1	98	96		17-18	ENH85484.1
<i>C. higginsianum</i> BXYLO1	92	85		17-18	XP_018163390.1
<i>C. higginsianum</i> BXYLO2	92	85		17-18	CCF34883.1
<i>C. incanum</i> BXYLO	91	85		17-18	KZL85686.1
<i>C. tofieldiae</i> BXYLO1	91	86		17-18	KZL77679.1
<i>C. coccodes</i> BXYLO	90	85	53664-53738;53792-54997;54998-55129	17-18	LECQ01000063.1
<i>C. sansevieriae</i> BXYLO	89	82	1569-1643;1692-3020;3073-3375	17-18	NJHP01000941.1
<i>C. gloeosporioides</i> BXYLO1	88	80		18-19	ELA28577.1
<i>C. orchidophilum</i> BXYLO1	88	80		17-18	XP_022471653.1
<i>C. fioriniae</i> BXYLO1	86	77		17-18	EXF78344.1
<i>C. simmondsii</i> BXYLO1	86	77		17-18	KXH40195.1
<i>C. salicis</i> BXYLO	84	76		17-18	KXH68037.1
<i>C. simmondsii</i> BXYLO2	69	55		20-21	KXH47768.1
<i>C. tofieldiae</i> BXYLO2	63	51		21-22	KZL71894.1
<i>C. gloeosporioides</i> BXYLO4	56	39		16-17	ELA30413.1
<i>C. fioriniae</i> BXYLO2	56	33		19-20	EXF81654.1
<i>C. orbiculare</i> BXYLO2	50	35		18-19	ENH85503.1
<i>C. orchidophilum</i> BXYLO2	48	32		20-21	XP_022467583.1
<i>C. higginsianum</i> BXYLO3	46	30		34-35	XP_018152601.1
<i>C. fioriniae</i> BXYLO3	46	32		18-19	EXF83039.1
<i>C. graminicola</i>	40	25		20-21	XP_008097014.1

<i>BXYLO2</i>					
<i>C. graminicola</i> <i>BXYLO3</i>	40	25		18-19	XP_008096518.1
<i>C. graminicola</i> <i>BXYLO1</i>	39	26		19-20	XP_008100238.1
<i>C. gloeosporioides</i> <i>BXYLO3</i>	38	24		17-18	ELA26163.1
<i>C. gloeosporioides</i> <i>BXYLO2</i>	34	23		18-19	ELA24206.1

A continuación se realizó la predicción del péptido señal para todas las secuencias del alineamiento, mediante el software en línea SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) observando que éste es de tamaño variable y diverso entre la mayoría de las secuencias (de 17 aa en la mayoría y en una es de hasta 34 aa) (Tabla 6).

7.4 Modelo 3D y estructura secundaria de BXYLOA

Para el modelaje de la proteína BXYLOA por homología, el software seleccionó como templados las β -xilosidasas cristalizadas de las especies bacterianas *Geobacillus thermoleovorans IT-08*, *Clostridium acetobutylicum* y *Bacillus subtilis*, debido a que no existen proteínas de β -xilosidasas de hongos cristalizadas. Sin embargo, la secuencia de *G. thermoleovorans IT-08* (PDB [5z5d.1.A](#)) que presentó 29.78% de identidad y 35% de similitud con BXYLOA de *C. lindemuthianum*, mostró los mejores parámetros de calidad del modelado generados por ITASSER y Swis-model: C-score=0.39, TM-score=0.73 \pm 0.11, RMSD=7.3 \pm 4.2 Å. Como se observa en la figura 17, la estructura 3D de BXYLOA mostró la topología característica de las β -xilosidasas de la familia GH43. La β -xilosidasa cristalizada de *G. thermoleovorans IT-08* es un homodimero. Cada subunidad, presenta dos dominios, uno de ellos contiene cinco láminas β dispuestas en forma de hélice que corresponden al dominio β -hélice, donde se ubican los tres residuos del sitio catalítico DDE (Fig. 17). El segundo dominio adopta una topología de β -sandwich en el C-terminal, cuya función es cerrar una parte del sitio activo para formar un bolsillo en el dominio β -hélice donde se localizan los tres residuos del sitio catalítico (Rohman *et al.*, 2018).

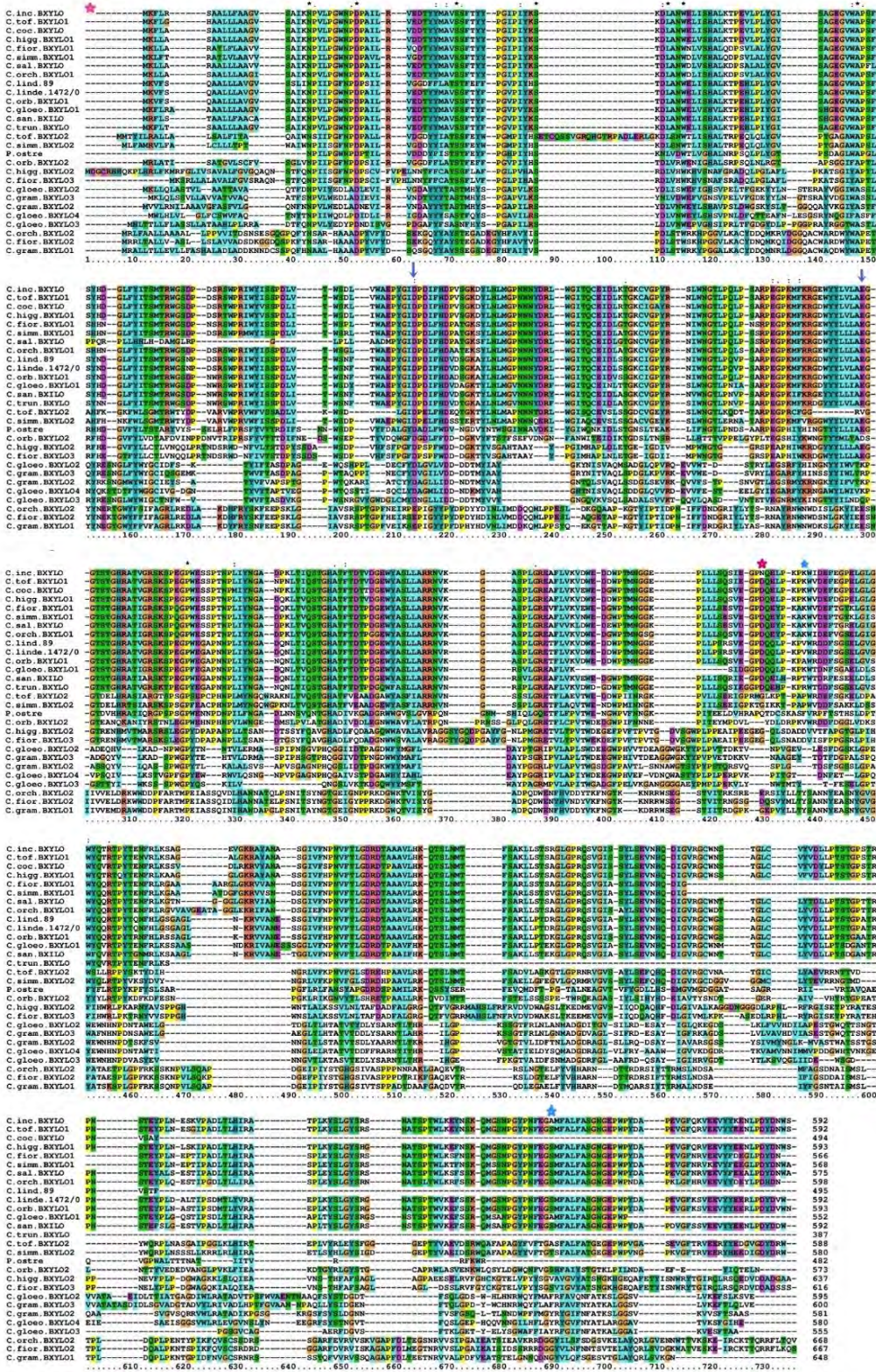


Figura 16. Alineamiento clusal de secuencias de β -xilosidasas de *Colletotrichum* spp. La línea superior indica la localización del péptido señal de las proteínas, las flechas indica los residuos catalíticos conservados, las estrellas en rosa indican la localización del dominio β -hélice y las estrellas en azul el dominio β -sándwich.

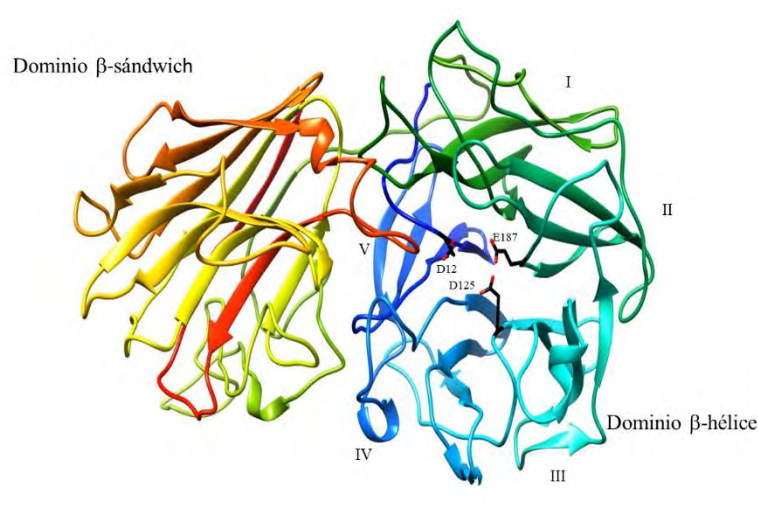


Figura 17. Modelaje tridimensional de la β -xilosidasa de *C. lindemuthianum* raza 1472. Se muestran los dos dominios de la proteína. En el dominio β -hélice que consta de cinco β -láminas (I-V) donde se ubica el sitio catalítico y el dominio de β -sándwich.

Para comparar la topología de la estructura tridimensional predicha para la BXYLOA de *C. lindemuthianum* con la proteína cristalizada de *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 así como la posición de los aminoácidos del sitio catalítico, se llevó a cabo la sobreposición de estructuras tridimensionales (Fig. 18). Los resultados de este análisis mostraron que excepto por algunas regiones de la proteína, ambas estructuras son similares. Los residuos de aa del sitio catalítico se ubican en la misma posición en ambas estructuras, sin embargo, el residuo de Asp¹² muestra una ligera diferencia en la orientación.

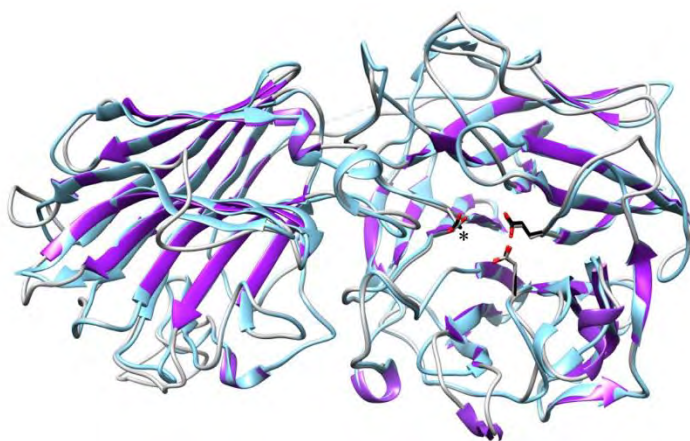


Figura 18. Sobreposición de las estructuras 3D de las β -xilosidasas de *C. lindemuthianum* (morado) y *G. thermoleovorans* IT-08 (azul). El asterisco (*) que el Asp¹² muestra una orientación ligeramente diferente.

Los resultados del alineamiento y predicción de la estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos de BXYLOA de *C. lindemuthianum* y el templado seleccionado para el análisis *G. thermoleovorans IT-08* (Fig. 19) mostró dominios de estructura secundaria de β -láminas muy conservados.



Figura 19. Alineamiento de la estructura secundaria de la β -xilosa de *C. lindemuthianum* y *G. thermoleovorans IT-08*. En el alineamiento los valores correspondientes al índice de conservación son indicados como 9, los cuales de acuerdo a la escala de 0-9 son los valores más altos; para la secuencia consenso de aminoácidos, se muestran los símbolos de consenso donde los aminoácidos conservados están en negrita y en mayúsculas; alifáticos (I, V, A): l; aromático (Y, H, W, F): @; hidrofóbica (W, M, Y, M, L, I, V, A, C, T, H): h; alcohol (S, T): O; residuos polares (D, E, H, K, N, Q, R, S, T): p; pequeña (A, G, C, S): t; pequeño (A, G, C, S, V, N, D, T, P): s; residuos voluminosos (E, F, I, K, L, M, Q, R, W, Y): b; con carga positiva (K, R, H): +; cargado negativamente (D, E): -; cargados (D, E, K, R, H).

7.5 Análisis de expresión por qPCR

Como se puede observar en la figura 20, los perfiles de transcripción de *bxyloA* fueron diferentes entre las razas no patógena (0) y patógena (1472) de *C. lindemuthianum*. En la raza 1472 el transcrito de *bxyloA* se incrementó a los pocos minutos de inducción (aprox. 15 min) a altos niveles de expresión relativa (seis veces), alcanzando un máximo hacia las 6 h (13.66 veces) y disminuyendo drásticamente hacia las 48 h (0.8 veces), y a partir de entonces la expresión fue baja (2 veces). En contraste, la raza 0 exhibió niveles de expresión basales (0.4 veces) similares a los observados con glucosa a las 0 y 6 h, posteriormente se observa un ligero incremento del transcrito hacia las 48 h y 9 días (2 veces).

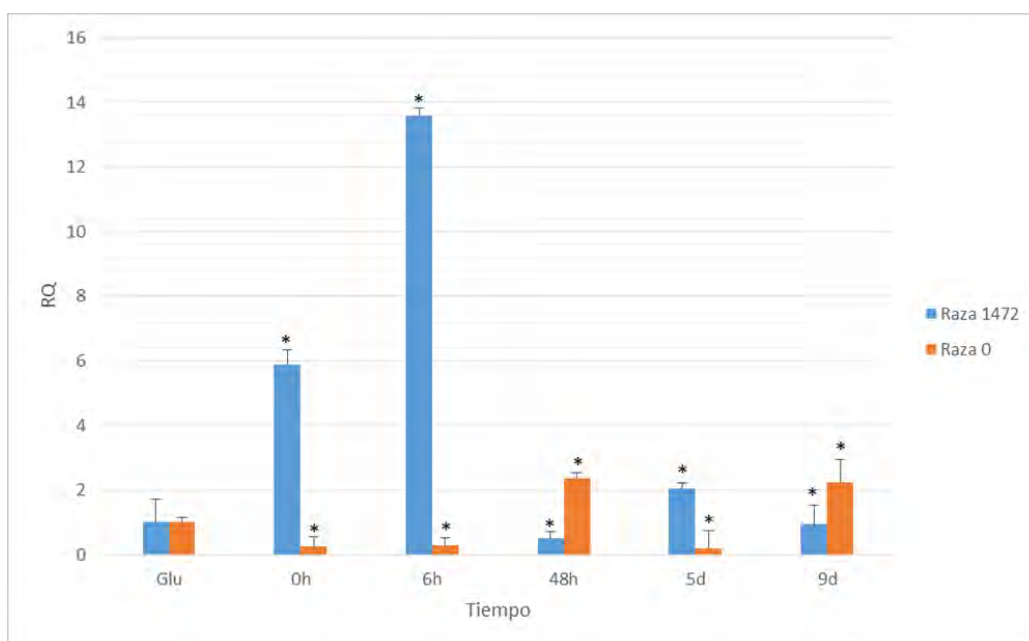


Figura 20. Análisis de la expresión relativa por qPCR, de *bxyloA* en las razas patógena (1472) y no patógena (0) de *C. lindemuthianum* inducidas con paredes celulares de frijol. Barras azules, raza patógena 1472; Barras naranjas, de raza no patógena 0. Cada barra muestra la media de triplicados \pm SE del experimento. El símbolo "*" indica cambios significativos ($P < 0.05$) en relación con el control de micelio crecido en glucosa (Glu).

7.6 Análisis filogenético

En el análisis se incluyeron la secuencia BXYLOA de *C. lindemuthianum* y secuencias de 408 aa deducidos de los genes de β -xilosidasas putativas localizados en los genomas de especies de *Colletotrichum* disponibles en bases de datos (GenBank, NCBI) (Tabla 6). Como grupo externo se utilizó la secuencia de una β -xilosidasa del basidiomiceto *P.*

ostreatus. En general, la topología de los árboles de IB y ML fue similar. En la figura 21 la topología del árbol filogenético consenso muestra a la secuencia de *C. orbiculare* BXYLO2 como basal del resto de las secuencias que se separaron en dos grandes clados o linajes (C1 y C2). En el clado C1 que incluyó a la mayoría de las secuencias de especies que cuentan con duplicaciones de genes de BXILO en sus genomas, se observa una separación en tres subclados (C1Sc1, C1Sc2 y C1Sc3) o linajes bien soportados. En el clado C2, también se pueden observar dos subclados, uno (C2Sc1) que incluyó únicamente secuencias de las especies de *C. tofieldiae* BXYLO2 y *C. simmondsii* BXYLO2, y otro (C2Sc2) donde se agruparon el resto de las secuencias de especies asignadas a los clados taxonómicos *acutatum*, *spaethianum* y *orbiculare* de acuerdo a Cannon et al. (2012) (Fig. 22). En C2Sc2 las secuencias BXYLO de *C. lindemuthianum* se agruparon con la secuencia de *C. orbiculare* BXYLO2 (Figs. 21 y 22).

En la figura 23 se indican los tipos de hospederos (dicotiledóneas o monocotiledóneas) de las especies de *Colletotrichum*. Como se puede observar, tres subclados agruparon únicamente secuencias de especies que infectan a dicotiledóneas y un subclado agrupó secuencias de especies que infectan a monocotiledóneas. Sin embargo, los subclados C1Sc2 y C2Sc2 agruparon secuencias de especies que infectan a ambos grupos de plantas.

Adicionalmente, para corroborar la topología característica de las proteínas GH43, se realizó un modelado de la estructura 3D de una β -xilosidasa de cada uno de los linajes de proteínas detectados en el análisis filogenético (Fig. 21), utilizando las secuencias de *C. orbiculare* BXYLO2, *C. higginsianum* BXYLO2, *C. graminicola* BXYLO3, *C. graminicola* BXYLO1, *C. sansevieriae* BXYLO, *C. salicis* BXYLO, *C. coccodes* BXYLO y *C. tofieldiae* BXYLO2 (Fig. 24). De manera general, a pesar de la diversidad encontrada en las secuencias de las BXYLO analizadas y de que el templado de la proteína utilizado es de una bacteria, la estructura 3D típica de las β -xilosidasas GH43 parece conservada entre la mayoría de estas enzimas con pequeñas diferencias. Sin embargo, como se puede observar el modelo 3D del linaje C1Sc3 (*C. graminicola* BXYLO1) no presentó el dominio β -sándwich, un análisis de modelado 3D de las otras dos secuencias mostró resultados similares (no mostrado).

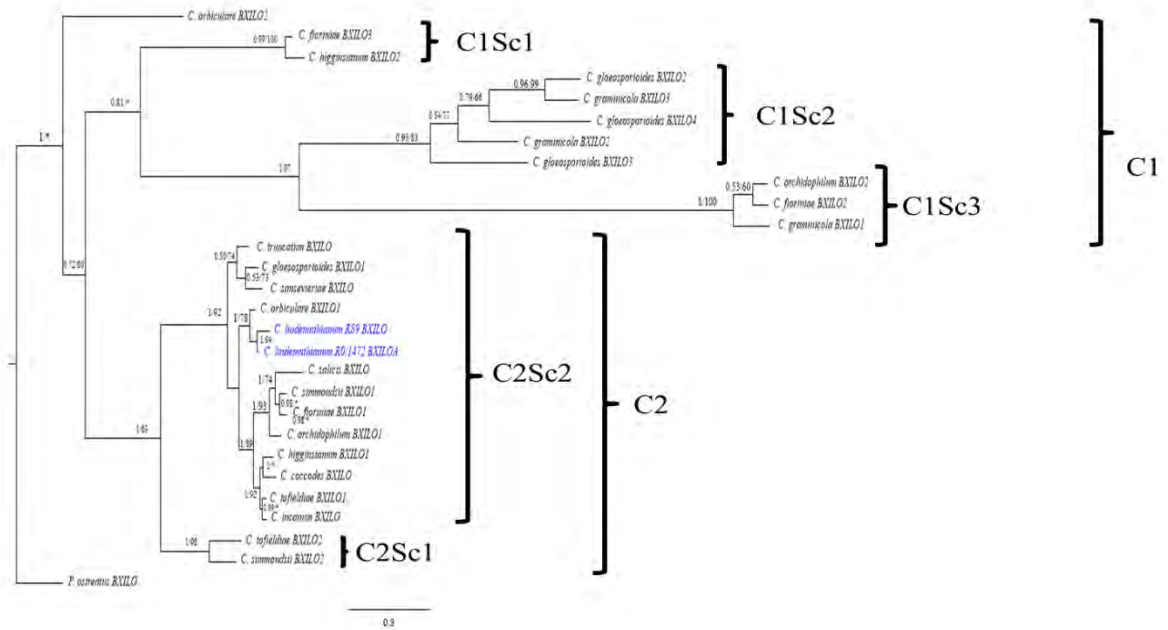


Figura 21. Arbol filogenético consenso (IB, ML) de β -xilosidasas del género *Colletotrichum*. Se indican los valores de soporte de las ramas (PB/PP). C (clado); S (subclado); * indica valores PB o PP menores a 0.5 ó 50.

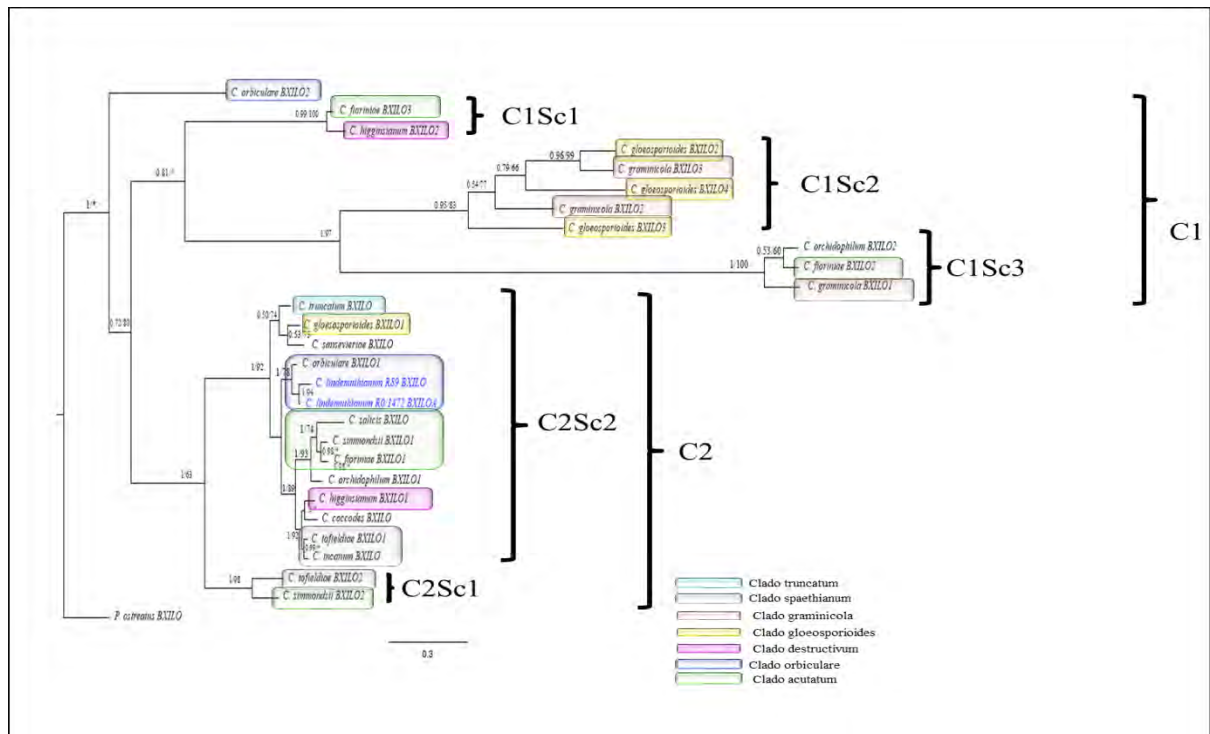


Figura 22. Árbol filogenético de β -xilosidasas de especies del género *Colletotrichum*. Los recuadros de colores representan el clado taxonómico en el cual se ha propuesto la asignación de las especies (Cannon, 2012; Dean, Lichens-Park and Kole, 2014).

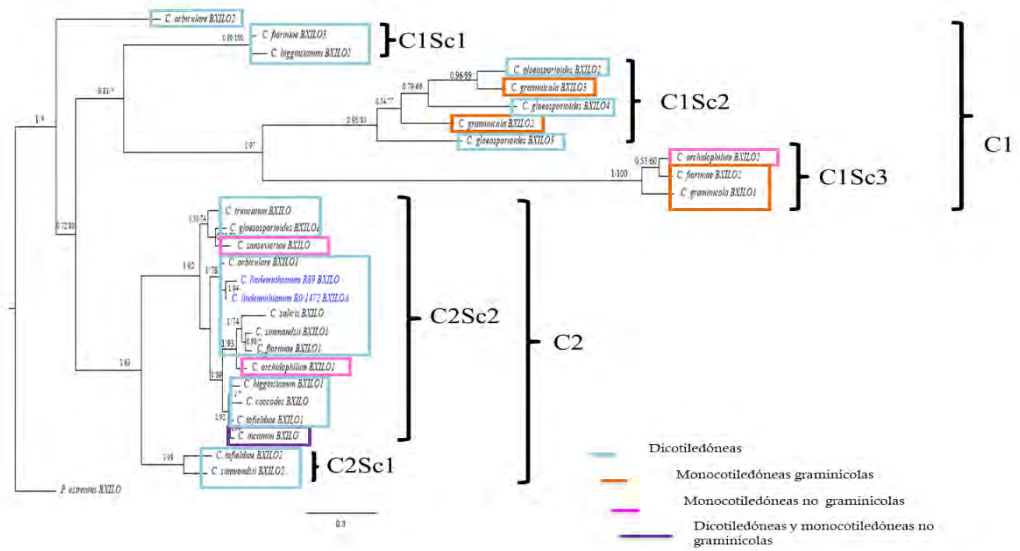


Figura 23. Árbol filogenético de secuencias de β -xilosidasas de especies del género *Colletotrichum*. Los recuadros en colores indican el tipo de hospedero que infectan las especies.

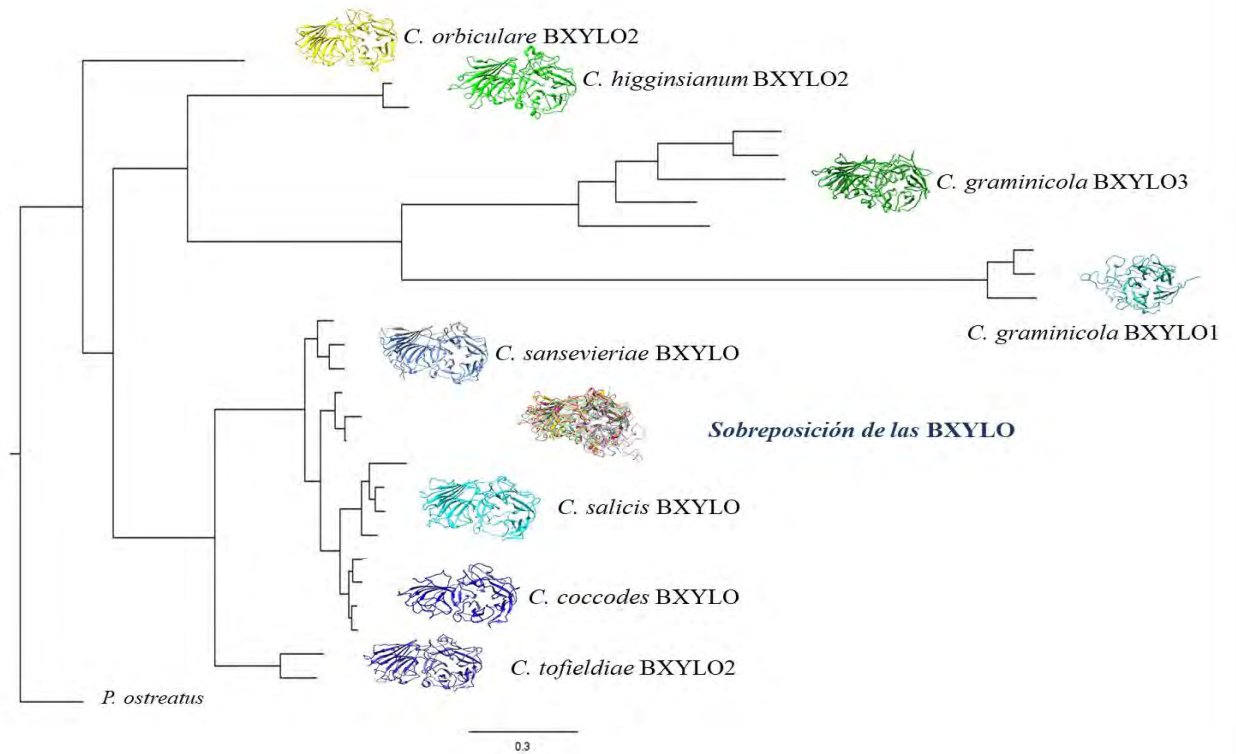


Figura 24. Estructuras 3D de una proteína representativa de cada linaje en el árbol filogenético.

8. DISCUSIÓN

De acuerdo al análisis bioinformático-molecular de la secuencia aislada a partir de ADN genómico y la secuencia del ADNc, éstas corresponden al gen *bxyloA* que codifica para una β -xilosidasa en las razas patógena 1472 y no patógena 0 de *C. lindemuthianum*. La región estructural del gen contiene tres intrones y cuatro exones, y la secuencia es 100% idéntica entre ambos hongos. El gen *bxyloA* codifica para una proteína de secreción con un péptido señal de 17 aa, que por predicción genera una proteína madura de 570 aa con un dominio catalítico conservado D¹²D¹²⁵E¹⁸⁷ (Brüx *et al.*, 2006; Rohman *et al.*, 2018) y los dominios β -hélice y β -sándwich típicos de las β -xilosidasas de la familia GH43. El análisis de alineamiento de BXYLOA con 26 β -xilosidasas putativas de especies de *Colletotrichum* también reveló los elementos típicos de las β -xilosidasas de la familia GH43, sin embargo, algunas proteínas presentaron cambios en los aa del dominio catalítico por otros del mismo grupo que podrían tener la misma actividad y funcionalidad.

El alineamiento también mostró una gran diversidad genética entre estas proteínas donde se detectaron dos grupos, uno con altos niveles de identidad y similitud y otro con bajos niveles. Se detectaron especies con una sola copia del gen y especies con dos y hasta cuatro copias, una característica común en otras especies de hongos filamentosos como *Aspergillus oryzae*, donde se han reportado por lo menos dos genes codificantes de β -xilosidasas (Kitamoto *et al.*, 1999) y en *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae* y *A. pulverulentus* donde se han identificado dos proteínas activas (De Vries *et al.*, 2001).

Cabe destacar, que además de las β -xilosidasas putativas donde el análisis de predicción permitió la identificación de péptidos señal con tamaño y secuencia variable que las identifica como proteínas de secreción, también se detectaron secuencias de genes de β -xilosidasas putativas sin péptido señal, sugiriendo la presencia de enzimas citoplásmicas. Previamente se han identificado β -xilosidasas sin péptido señal y activas en algunos hongos como *Cochliobolus carbonum* y *P. herquei* (Kubicek, 2012).

El análisis bioinformático de la secuencia deducida de aminoácidos de *bxyloA* mostró cinco posibles sitios de N-glicosilación sugiriendo que la proteína podría estar glicosilada. La posible glicosilación es una característica que muestran otras β -xilosidasas, como la codificada por el gen *xylA* de *Aspergillus japonicus* donde se han detectado 18 posibles sitios de N-glicosilación (Wakiyama *et al.*, 2010). Sin embargo, esto se debe tomar con precaución ya que es necesario una demostración experimental de la glicosilación en estas proteínas, así como su posible función.

El modelo 3D de la proteína mostró la topología β -hélice/ β -sándwich característica de los monómeros que conforman a las β -xilosidasas de la familia GH43 (Fig. 17). Sin embargo, este modelo se debe tomar con precaución ya que la plantilla PDB [5z5d.1.A](#) utilizada para el modelado es de la bacteria *G. thermoleovorans IT-08*, porque no existen β -xilosidasas de hongos cristalizadas. También se debe considerar que los parámetros de calidad de la estructura predicha, particularmente el C-score=0.39 (valores de -5 a 2, donde los valores más altos indican un modelo de calidad) fueron bajos. A pesar de lo anterior, el solapamiento de la estructura del templado PDB [5z5d.1.A](#) con el modelo 3D de BXYLOA (Fig. 17) mostró una alta similitud en el plegamiento, la estructura de β -láminas y la posición de los tres residuos D¹²D¹²⁵E¹⁸⁷ en el sitio catalítico. Una pequeña diferencia en la orientación del residuo catalítico D¹², sugiere una diferencia en la afinidad por sustrato. Adicionalmente, el alineamiento y predicción de la estructura secundaria de la proteína BXYLOA de *C. lindemuthianum* y la β -xilosidasa de *G. thermoleovorans IT-08* (Fig. 19) mostró que, aunque existe baja identidad y similitud entre las secuencias de estas proteínas, el patrón de la estructura secundaria de β -láminas es conservado.

Similar a lo observado en previos análisis de expresión de genes de celulasa *cbhII*, xilanasas *xyl1*, pectin liasa 2 *pnl2*, galactanasas *ebg* y arabinofuranosidasa *abfA* de *C. lindemuthianum*, en este estudio se detectaron niveles basales de transcrito de *bxy1A* cuando ambas razas fueron crecidas con glucosa, un fenómeno conocido como represión catabólica por glucosa (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2005; Lara-Márquez *et al.*, 2011; Tani, Kawaguchi and Kobayashi, 2014; Conejo Saucedo *et al.*, 2016; Villa-Rivera *et al.*, 2017; Villa-Rivera *et al.*, 2017). La expresión de genes que codifican enzimas xilanólíticas esta sujeta a represión catabólica a través de la acción de CreA bajo una fuente de carbono de glucosa, y a la activación a través de la acción de XlnR bajo una fuente de carbono de polisacáridos como la hemicelulosa (De Vries *et al.*, 2001; Tani, Kawaguchi and Kobayashi, 2014). Por otro lado, de manera similar a lo observado para los genes *cbhII*, *xyl1*, *pnl2*, *ebg* y *abfA*, y como comprobación de la hipótesis de este estudio, los perfiles de transcripción de *bxy1A* fueron diferentes entre las razas patógena 1472 y no patógena 0 de *C. lindemuthianum*. La raza patógena 1472, mostró un perfil de expresión donde el transcrito incrementó rápidamente a partir de aproximadamente 15 min de inducción (tiempo aprox. que tarda la colecta del micelio y congelamiento en nitrógeno líquido), alcanzando un máximo nivel hacia las 6 h de inducción (Fig. 20). En contraste, la raza no patógena 0, mostró niveles basales con un ligero incremento del transcrito hacia las 48 h y

otro similar hacia los 9 días. De manera consistente, la raza patógena 1472 presenta una respuesta rápida con altos niveles de transcripción de hemicelulasas para la degradación de pared celular de *P. vulgaris*, mientras que en la raza no patógena 0, la respuesta es lenta y con bajos niveles de transcritos (Conejo Saucedo *et al.*, 2016; Villa-Rivera *et al.*, 2017; Villa-Rivera *et al.*, 2017). Desde el punto de vista de la interacción del patógeno con su huésped, una rápida respuesta en la secreción de hemicelulasas garantiza la efectividad del proceso de invasión del tejido vegetal. En contraste, aunque el hongo no patógeno tiene los mismos genes de hemicelulasas, no parece requerir de una rápida secreción enzimática y en algunos casos tampoco requiere de altos niveles de actividad enzimática para obtener sus nutrientes y crecer (Piñón-Escobedo, 2005; Conejo Saucedo *et al.*, 2016).

Desde el punto de vista de la estrategia de degradación de la xilana por la raza patógena, se sabe que los niveles basales de las hemicelulasas desramificantes y la endo- β -1,4-xilanasasa inician la degradación de la xilana produciendo xilooligosacáridos y xilobiosa, que son los sustratos de la β -xilosidasa cuya actividad libera xilosa (Conejo-Saucedo *et al.*, 2011; Lewis *et al.*, 2012; Kubicek, Starr and Glass, 2014; Conejo-Saucedo *et al.*, 2017). La xilosa, como producto final de la degradación, funciona como regulador de la expresión de las xilanasas actuando como un inductor a bajas concentraciones y como represor a altas concentraciones (Kulkarni, Shendye and Rao, 1999; De Vries *et al.*, 2000; Stülke and Hillen, 2000; De Vries, 2003; Mach-Aigner, Pucher and Mach, 2010; Mach-Aigner *et al.*, 2012; Conejo-Saucedo *et al.*, 2017). Por lo anterior, de acuerdo a los resultados de este estudio, los niveles basales de la endo- β -1,4-xilanasasa degradaron la xilana de la pared celular de *P. vulgaris* produciendo oligosacáridos y xilobiosa que a su vez fueron degradados por la actividad β -xilosidasa presente en niveles basales (Piñón-Escobedo, 2005), a continuación la xilosa liberada indujo el rápido incremento de la transcripción de *bxyloA* (6 veces en aprox. 15 min y 13.66 veces a las 6h) en la raza patógena 1472. Posteriormente, la reducción de los niveles del transcrito de *bxyloA* se deben probablemente a la acumulación de xilosa. Sin embargo, previamente se ha observado que la actividad de β -xilosidasa secretada por las razas 1472 y 0 de *C. lindemuthianum* en cultivos con paredes celulares de *P. vulgaris* muestra máximos niveles después de 8 días de incubación; la actividad de la raza patógena 1472 fue 1.6 veces más alta que la de la raza no patógena 0 ($P < 0.0001$) (21 vs 13.2 nmoles of MU/min/mg proteína) (Piñón-Escobedo 2005). Esto sugiere la presencia y expresión de más de un gen de β -xilosidasa cuya regulación también parece ser diferencial entre ambas razas del hongo.

Un aspecto interesante de los análisis filogenéticos de las enzimas que utilizan los hongos fitopatógenos para degradar la PCV, es que permiten establecer las historias evolutivas de las proteínas, sus procesos de diversificación y su posible relación con el tipo de hospedero que infectan (Lara-Márquez *et al.*, 2011; Conejo-Saucedo *et al.*, 2017; Lara-Márquez *et al.*, 2017; Villa-Rivera *et al.*, 2017; Villa-Rivera *et al.*, 2017). El análisis filogenético de las β -xilosidasas GH43 de especies del género *Colletotrichum* mostró que los dos grupos inicialmente detectados con diferencias en los niveles de identidad y similitud, corresponden a dos grandes clados o linajes de estas proteínas (Fig. 21, C1 y C2). Cada una de estos linajes muestra una historia evolutiva diferente. En el clado C1 la topología reveló eventos de duplicación que separa a las proteínas en tres subclados adicionales con alta diversificación genética. En el clado C2, se agruparon secuencias que no han sufrido eventos de duplicación ni diversificación genética, es decir, que este es un linaje muy conservado. En el clado C2 destaca un subclado o linaje (C2Sc2) que agrupó a la mayoría de las proteínas, incluyendo a la BXYLOA de *C. lindemuthianum* en una relación muy cercana con la BXYLO1 de *C. orbiculare*, una relación que se explica porque se trata de especies hermanas (Cannon *et al.*, 2012; Conejo-Saucedo *et al.*, 2017; Lara-Márquez *et al.*, 2017; Maria G. Villa-Rivera, Zavala-Páramo, *et al.*, 2017).

Por otro lado, aunque el análisis filogenético de ese estudio no tiene un enfoque taxonómico, resultó interesante analizar la topología del árbol considerando la clasificación taxonómica para las especies del género *Colletotrichum* propuesta por Cannon *et al.* (2012), quienes proponen los clados *truncatum*, *spaethianum*, *graminicola*, *gloeosporioides*, *destructivum*, *orbiculare* y *acutatum*. La topología del árbol filogenético de β -xilosidasas GH43 de *Colletotrichum* spp. no agrupa a las especies de *Colletotrichum* en los clados taxonómicos propuestos por Cannon *et al.* (2012) (Fig. 22). Otro análisis interesante fué saber si los clados detectados se relacionan con el tipo de planta hospedero, monocotiledóneas o dicotiledóneas. En este sentido, aunque los dos clados C1 y C2 incluyeron especies que atacan a monocotiledóneas y dicotiledóneas, en C1 destaca la inclusión exclusiva de secuencias de *C. graminicola* que ataca al trigo (monocotiledónea graminícola) y de *C. orchidophilum* que ataca a la vainilla (monocotiledónea no graminícola) (Fig. 23). Las otras copias de β -xilosidasas de *C. orchidophilum* pertenecen al linaje de C2, donde esta especie es la única del linaje que ataca exclusivamente monocotiledóneas. Este resultado y los de los análisis filogénicos realizados para otras proteínas del complejo pectinolítico y hemicelulolítico de *C. lindemuthianum* (Lara-

Márquez *et al.*, 2011; Conejo-Saucedo *et al.*, 2017; Lara-Márquez *et al.*, 2017; Villa-Rivera *et al.*, 2017), sugieren que hay una probable relación evolutiva de las proteínas respecto al tipo de hospedero en términos de las diferencias de composición y estructura de las PCV y la evolución de sus características en respuesta a los patógenos. La inclusión de más especies en el análisis puede ayudar a resolver mejor los clados filogenéticos.

Finalmente, la exploración del modelaje 3D de proteínas representativas de cada linaje detectado en el análisis de filogenia, mostró que a pesar de la diversidad genética que presentan las secuencias de estas enzimas y que el templado utilizado es de una bacteria, la estructura 3D es altamente conservada. Sin embargo, destaca la estructura 3D del subclado C1Sc3 donde se agrupan secuencias de *C. orchidophilum*, *C. fioriniae* y *C. graminicola*, ya que ninguna de las tres proteínas presentaron el dominio β -sándwich en el C-terminal, cuya función es cerrar una parte del sitio activo para formar un bolsillo en el dominio β -hélice donde se localizan los tres residuos del sitio catalítico (Rohman *et al.*, 2018). Para corroborar la posibilidad de estas estructuras es necesario contar con un templado de proteína cristalizada a partir de un hongo filamentoso.

9. CONCLUSIONES

- Las razas patógena 1472 y no patógena 0 de *C. lindemuthianum*, presentan un gen de β -xilosidasa 100% idéntico en su región estructural, perteneciente a la familia GH43.
- Las especies del género *Colletotrichum* analizadas presentan de uno a cuatro genes de β -xilosidasas putativas.
- Las β -xilosidasas GH43 del género *Colletotrichum* presentan una alta diversidad genética donde se pueden distinguir dos grupos, uno con alta identidad y similitud y otro con baja identidad y similitud.
- La estructura 3D de la BXYLOA de *C. lindemuthianum*, mostró los dominios β -hélice y β -sandwich típicas de las β -xilosidasas GH43.
- El solapamiento de la estructura 3D de BXYLOA de *C. lindemuthianum* y la estructura de *G. thermoleovorans* IT-08 mostró una alta similitud en el plegamiento, β -láminas y la posición de los tres residuos D¹²D¹²⁵E¹⁸⁷ en el sitio catalítico. Adicionalmente, aunque existe baja identidad y similitud entre las secuencias de estas proteínas, el patrón de la estructura secundaria de β -láminas es muy conservado.
- Las razas patógena 1472 y no patógena 0 de *C. lindemuthianun* presentan un perfil de transcripción de *bxyloA* 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 *bxyloA* diferencial, en cultivo con pared celular vegetal de *P. vulgaris*. La raza patógena muestra una rápida y elevada transcripción de *bxyloA*, mientras que en la raza no patógena se observan niveles basales con ligeros incrementos tardíos.
- El análisis filogenético de β -xilosidasas de especies del género *Colletotrichum*, mostró la presencia de dos clados o linajes bien resueltos, congruentes con los dos grupos identificados por alineamiento. Un linaje de proteínas (C1) muestra eventos de duplicación y alta diversificación genética, y otro linaje donde se encuentra BXYLOA de *C. lindemuthianum* no muestra eventos de duplicación y es muy conservado.

- A pesar de la diversidad genética de las β -xilosidasas y que el templado utilizado es de una bacteria, la estructura 3D es altamente conservada. Sin embargo, la estructura 3D del subclado C1Sc3 donde se agrupan secuencias de *C. orchidophilum*, *C. fiorinae* y *C. graminicola*, no presenta el dominio β -sandwich en el C-terminal.

10. Bibliografía

- Acosta-Rodríguez, I., Piñón-Escobedo, C., Zavala-Páramo, M. G., López-Romero, E., & Cano-Camacho, H. (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. <https://doi.org/10.1007/s10482-004-6422-6>
- Adan, A., Yandim, M. K., Baran, Y., Agrios, G. N., Agung, A., Ratnadewi, I., Walton, J. D. (2017). Cloning, expression, and molecular dynamics simulations of a xylosidase obtained from *Thermomyces lanuginosus*. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.020>
- Aro, N., Pakula, T., & Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 719–739. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.006>
- Balardin, R. S., Jarosz, a M., & Kelly, J. D. (1997). Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from south, central, and north america. *Phytopathology*, 87(12), 1184–1191. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.12.1184>
- Baroncelli, R., Amby, D. B., Zapparata, A., Sarrocco, S., Vannacci, G., Le Floch, G., Thon, M. R. (2016). Gene family expansions and contractions are associated with host range in plant pathogens of the genus *Colletotrichum*. *BMC Genomics*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2917-6>
- Battaglia, E., Hansen, S. F., Leendertse, A., Madrid, S., Mulder, H., Nikolaev, I., & De Vries, R. P. (2011). Regulation of pentose utilisation by AraR, but not XlnR, differs in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(2), 387–397. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3242-2>
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), 252–258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>
- Biely, P., Singh, S., & Puchart, V. (2016). Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1260–1274. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.09.001>

- Brevern, A. G. De, Etchebest, C., & Hazout, S. (2000). Bayesian Probabilistic Approach for Predicting Backbone. *Proteins*, 287(January), 271–287.
- Brunzelle, J. S., Jordan, D. B., McCaslin, D. R., Olczak, A., & Wawrzak, Z. (2008). Structure of the two-subsite β -d-xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in complex with 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 474(1), 157–166.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.007>
- Brüx, C., Ben-David, A., Shallom-Shezifi, D., Leon, M., Niefind, K., Shoham, G., ... Schomburg, D. (2006). The structure of an inverting gh43 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its substrate reveals the role of the three catalytic residues. *Journal of Molecular Biology*, 359(1), 97–109.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.005>
- Campebell, N. A., & Reece, J. B. (2007). *Biología*.
- Campos-Diaz, P. J. (2016). *Aislamiento y caracterización de un gen de β -xilosidasa de *Colletotrichum lindemuthianum*.*
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., & Weir, B. S. (2012). *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73, 181–213.
<https://doi.org/10.3114/sim0014>
- Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 3(1), 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>
- Chung, H. J., Choi, J. H., Kim, E. J., Cho, Y. H., & Roe, J. H. (1999). Negative regulation of the gene for Fe-containing superoxide dismutase by an Ni-responsive factor in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 181(23), 7381–7384.
- Conejo-Saucedo, U., Cano-Camacho, H., Villa-Rivera, M. G., Lara-Márquez, A., López-Romero, E., & Zavala-Páramo, M. G. (2017). Protein homology modeling, docking, and phylogenetic analyses of an endo-1,4- β -xylanase GH11 of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mycological Progress*, 16(6), 577–591.
<https://doi.org/10.1007/s11557-017-1291-3>
- Conejo-Saucedo, U., Cano Camacho, H., Lopez-Romero, E., Lara Márquez, A., & Zavala-

- Páramo, M. G. (2011). Hemicellulases of fungi : A vision of their function in the coordinated degradation of polysaccharides of plant cell walls. *Current Trends in Microbiology*, 7.
- Conejo Saucedo, U., Cano Camacho, H., Lopez-Romero, E., Villa-Rivera, M. G., Lara-Marquez, A., & Zavala-Páramo, M. G. (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. <https://doi.org/10.5897/ajmr2016.8185>
- Cosgrove, D. J. (1997). Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1), 171–201. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.171>
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Davila, G., & Vázquez-Duhalt, R. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*, 30(August), 29–55. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0162-7>
- De-Silva, D., Crous, P., Ades, P., Hyde, K., & Taylor, P. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews*, 31(3), 155–168. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>
- De Vries, R. P. (2003). Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(1), 10–20. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1171-9>
- De Vries, R. P., Kester, H. C. M., Poulsen, C. H., Benen, J. A. E., & Visser, J. (2000). Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 327(4), 401–410. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00066-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00066-5)
- De Vries, R. P., Kester, H. C. M., Poulsen, C. H., Benen, J. A. E., & Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4), 497–522. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.4.497>

- Dean, R. A., Lichens-Park, A., & Kole, C. (2014). *Genomics of plant-associated fungi: Monocot pathogens. Genomics of Plant-Associated Fungi: Monocot Pathogens*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-662-44053-7>
- Diéguez-Uribeondo, J., Förster, H., Soto-Estrada, A., & Adaskaveg, J. E. (2007). Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond . *Phytopathology*, 95(7), 751–758.
<https://doi.org/10.1094/phyto-95-0751>
- Division, B. P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases : Enzymology , molecular biology and application, 22(1), 33–46.
- Du, M., Schardl, C. L., Nuckles, E. M., & Vaillancourt, L. J. (2005). Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Collectotrichum* species complexes. *Mycologia*, 97(3), 641–658. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.3.641>
- Dufresne, M., Perfect, S., Pellier, A.-L., Bailey, J. A., & Langin, T. (2000). A GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. . *The Plant Cell*, 12(9), 1579–1590. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006333>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC149071>
- Ebringerová, A. (2006). Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromolecular Symposia*, 232(333), 1–12. <https://doi.org/10.1002/masy.200551401>
- Ebringerová, A., & Heinze, T. (2000). Naturally occurring xylans structures , isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9), 542–556.
- Ebringerova, A., Hromadkova, Z., Heinze, T., Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinze, T. (2005). Hemicellulose. *Springer*, 186(August), 1–67.
<https://doi.org/10.1007/b136816>
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Finn, R. D. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D427–D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
- Enríquez Guevara, E., Hernández, E. A., Arispuro, I. V., & Téllez, M. Á. M. (2010). Oligosacarinas derivadas de pared celular : Actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2), 144–155.

- French, E. R., & Hebert, T. T. (1980). *Metodos de investigacion fisiopatologica*. San Jose, Costa Rica.
- Fry, S. C. (2006). The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. *New Phytologist*, 203(April), 333. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2003.00980.x>
- Fry, S. C. (2014). Plant Cell Walls. *The Cell*, 85–134. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-123302-0.50009-5>
- García, S., María, B., Olivas, F., Arizpe, S., Rodríguez, P., Jiménez, L., Guerra, R. (2009). *Colletotrichum lindemuthianum* pathotypes in Oaxaca and San Luis Potosí, Mexico, and resistance in common bean.
- Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. H. D., & Coradetti, S. (2013). Plant Cell Wall Deconstruction by ascomycete fungi. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 477–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044>
- Goldman, G. H., Battaglia, E., de Vries, R. P., de Souza, W. R., Brown, N. A., Goldman, M. H. S., ... de Gouvêa, P. F. (2013). The influence of *Aspergillus niger* transcription factors AraR and XlnR in the gene expression during growth in D-xylose, L-arabinose and steam-exploded sugarcane bagasse. *Fungal Genetics and Biology* (Vol. 60). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.07.007>
- Gottschalk, L. M. F., Paredes, R. D. S., Teixeira, R. S. S., Da Silva, A. S. A., & Bon, E. P. D. S. (2013). Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase, β -xylosidase, ferulic acid esterase and β -glucosidase by the mutant strain *aspergillus awamori* 2B.361 U2/1. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 569–576. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200037>
- Hall, T. (2004). BioEdit Help Contents.
- Halvorson, J. M., Lamppa, R. S., Markell, S. G., & Pasche, J. S. (2016). Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* races infecting dry edible bean in North Dakota. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38(1), 64–69. <https://doi.org/10.1080/07060661.2015.1137081>
- Hernández-Silva, L., Piñón-Escobedo, C., Cano-Camacho, H., Zavala-Páramo, M. G., Acosta-Rodríguez, I., & López-Romero, E. (2007). Comparison of fungal growth and production of extracellular pectin lyase activity by pathogenic and non-pathogenic races of *Colletotrichum lindemuthianum* cultivated under different conditions.

- Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70(1–3), 88–95.
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.07.005>
- Hildén, L., & Johansson, G. (2004). Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnology Letters*, 26(22), 1683–1693.
<https://doi.org/10.1007/s10529-004-4579-8>
- Houston, K., Tucker, M. R., Chowdhury, J., Shirley, N., & Little, A. (2016). The plant cell wall: A complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7(August), 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00984>
- Huybrechts, M., Keunen, E., Cuypers, A., Vangronsveld, J., Loix, C., & Gielen, M. (2017). Reciprocal interactions between cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8(October), 1–19.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01867>
- Ito, T., Yokoyama, E., Sato, H., Ujita, M., Funaguma, T., Furukawa, K., & A., H. (2003). Xylosidases associated with the cell surface of *Penicillium herquei* IFO 4674. *J. Biosci. Bioeng.*, 96(4), 354–359. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90136-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90136-8)
- Jordan, D. B., & Wagschal, K. (2010). Properties and applications of microbial β -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1647–1658.
<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2538-y>
- Jurado Téllez, A., Cuenca Arana, A., Reyes Anducho, M. A. 1, & Flores Mercado, Y. (2016). Enzimas lignocelulolíticas: producción, usos y perspectivas, 64–83.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2012). Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1219–1227.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.006>
- Karboune, S., L'Hocine, L., Antoni, J., Geraert, P.-A., & Kermasha, S. (2009). Properties of selected hemicellulases of a multi-enzymatic system from *Penicillium funiculosum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(6), 1286–1292.
<https://doi.org/10.1271/bbb.80808>
- Keegstra, K. (2001). Plant cell walls. *ELS*, 154(October), 483–486.
<https://doi.org/10.1038/npg.els.0001682>

- Kirikyali, N., Wood, J., & Connerton, I. F. (2014). Characterisation of a recombinant β -xylosidase (xylA) from *Aspergillus oryzae* expressed in *Pichia pastoris*. *AMB Express*, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0068-1>
- Kitamoto, N., Yoshino, S., Ohmiya, K., & Tsukagoshi, N. (1999). Sequence analysis, overexpression, and antisense inhibition of a β -xylosidase gene, xyla, from *Aspergillus oryzae* KBN616. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(1), 209–212. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.209>
- Knob, A., Terrasan, C. R. F., & Carmona, E. C. (2010). β -Xylosidases from filamentous fungi: An overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 389–407. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0190-4>
- Knogge, W. (1996). Fungal infection of plants fungal infection of plants. *The Plant Cell*, 8(May), 1711–1722. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1711>
- Knogge, W. (1998). Fungal pathogenicity. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(4), 324–328. [https://doi.org/10.1016/1369-5266\(88\)80054-2](https://doi.org/10.1016/1369-5266(88)80054-2)
- Knox, J. P. (2008). Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.001>
- Kormelink, F. J. M., Gruppen, H., Viëtor, R. J., & Voragen, A. G. J. (1993). Mode of action of the xylan-degrading enzymes from *Aspergillus awamori* on alkali-extractable cereal arabinoxylans. *Carbohydrate Research*, 249(2), 355–367. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)84100-K](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)84100-K)
- Kubicek, C. P. (2012). *Fungi and Lignocellulosica Biomass*. <https://doi.org/10.1002/9781118414514>
- Kubicek, Starr, T. L., & Glass, N. L. (2014). Plant cell wall–degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 427–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045831>
- Kulkarni, N., Shendye, A., & Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(4), 411–456. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00006-6)
- Kumar, A., Gautam, A., & Dutt, D. (2016). Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass in to Industrial Products: An Overview. *Advances in*

- Bioscience and Biotechnology*, 07(03), 149–168.
<https://doi.org/10.4236/abb.2016.73014>
- Kumar, M., Campbell, L., & Turner, S. (2016). Secondary cell walls: Biosynthesis and manipulation. *Journal of Experimental Botany*, 67(2), 515–531.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv533>
- Kundu, A., Rani, R., Sweet, Á., & Optimization, Á. (2013). Production of intracellular β -xylosidase from the submerged fermentation of citrus wastes by *Penicillium janthinellum* MTCC, 241–246. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0091-3>
- Kurakake, M., Fujii, T., Yata, M., Okazaki, T., & Komaki, T. (2005). Characteristics of transxylosylation by β -xylosidase from *Aspergillus awamori* K4. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1726(3), 272–279.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.08.009>
- Kuramae-Izioka, E. E. (1997). A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. *Unimar*, 19(April), 683–689.
- La Grange, D. C., Pretorius, I. S., Claeysens, M., & Van Zyl, W. H. (2001). Degradation of Xylan to D-Xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* coexpressing the *Aspergillus niger* β -Xylosidase (xInD) and the *Trichoderma reesei* Xylanase II (xyn2) Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5512–5519.
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5512-5519.2001>
- Lagaert, S., Pollet, A., Courtin, C. M., & Volckaert, G. (2014). β -Xylosidases and α -L-arabinofuranosidases: Accessory enzymes for arabinoxylan degradation. *Biotechnology Advances*, 32(2), 316–332.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.005>
- Lara-Márquez, A., Cano-Camacho, H., Villa-Rivera, M. G., Oyama, K., Zavala-Páramo, M. G., & Conejo-Saucedo, U. (2017). Evolutionary analysis of pectin lyases of the genus *Colletotrichum*. *Journal of Molecular Evolution*, 85(3–4), 120–136.
<https://doi.org/10.1007/s00239-017-9812-x>
- Lara-Márquez, A., Zavala-Páramo, M. G., López-Romero, E., Calderón-Cortés, N., López-Gómez, R., Conejo-Saucedo, U., & Cano-Camacho, H. (2011). Cloning and characterization of a pectin lyase gene from *Colletotrichum lindemuthianum* and

- comparative phylogenetic/structural analyses with genes from phytopathogenic and saprophytic/opportunistic microorganisms. *BMC Microbiology*, 11(1), 260.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-260>
- Lara-Márquez, A., Zavala-Páramo, M. G., López-Romero, E., & Camacho, H. C. (2011). Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. *Biotechnology Letters*, 33(5), 859–868. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0520-0>
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Latunde-Dada, A. O., & Lucas, J. A. (2007). Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: Cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. *Plant Pathology*, 56(3), 437–447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01576.x>
- Leslie, B., & Bribiesca, C. (2013). Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales, 16(1), 19–22.
- Lewis, R. J., Krogh, K. B. R. M., Marles-Wright, J., Jackson, A., Pena, M. J., Rogowski, A., Skjot, M. (2012). Introducing endo-xylanase activity into an exo-acting arabinofuranosidase that targets side chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17), 6537–6542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117686109>
- Li, Q., Wu, T., Qi, Z., Zhao, L., Pei, J., & Tang, F. (2018). Characterization of a novel thermostable and xylose-tolerant GH 39 β -xylosidase from *Dictyoglomus thermophilum*. *BMC Biotechnology*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0440-3>
- Li, Y., Zheng, X., Zhang, X., Bao, L., Zhu, Y., Qu, Y., Qin, Y. (2016). The different roles of *Penicillium oxalicum* LaeA in the production of extracellular cellulase and β -xylosidase. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02091>
- Liang, L., Tanaka, S., Lo Presti, L., Schweizer, G., Tollot, M., Zuccaro, A., Kahmann, R. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66(1), 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114623>
- Liu, F., Cai, L., Crous, P. W., & Damm, U. (2012). Circumscription of the anthracnose

- pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum*. *Mycologia*, 105(4), 844–860. <https://doi.org/10.3852/12-315>
- Ludwig, R., Marđetko, N., Andlar, M., Rezić, T., Kracher, D., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 768–778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>
- Mach-Aigner, A. R., Omony, J., Jovanovic, B., Boxtel, A. J. B. Van, & Graaff, L. H. De. (2012). Concentration-dependent hydrolase expression profiles and the function of CreA and XlnR in *Aspergillus niger* D -Xylose *Aspergillus niger* is an important organism for the production of industrial enzymes such as hemicellulases and pectinases . The, 3145–3155. <https://doi.org/10.1128/AEM.07772-11>
- Mach-Aigner, A. R., Pucher, M. E., & Mach, R. L. (2010). D-xylose as a repressor or inducer of xylanase expression in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), 1770–1776. <https://doi.org/10.1128/AEM.02746-09>
- Mach, R. L., & Zeilinger, S. (2003). Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(5), 515–522. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1162-x>
- Mahasuk, P., Chinthaisong, J., & Mongkolporn, O. (2013). Differential resistances to anthracnose in *Capsicum baccatum* as responding to two *Colletotrichum* pathotypes and inoculation methods. *Breeding Science*, 63(3), 333–338. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.63.333>
- Margolles-Clark, E., Tenkanen, M., Nakari-Setälä, T., & Penttilä, M. (1996). Cloning of genes encoding α -L-arabinofuranosidase and β -xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3840–3846.
- Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., & Folch-Mallol, J. L. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3–4), 119–131. <https://doi.org/doi:10.1155/2013/925219>
- McNeil, M. (2002). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual*

- Review of Biochemistry*, 53(1), 625–663.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.53.1.625>
- McNeil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C., Albersheim, P., Michael McNeil, Alan G. Darvill, Stephen C. Fry, P. A. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*, 53(1), 625–663.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.53.070184.003205>
- Meier, K. K., Jones, S. M., Kaper, ‡ Thijs, Henrik Hansson, Ç., Koetsier, M. J., Karkehabadi, S., Kelemen, B. (2017). Oxygen activation by copper liposomes in recalcitrant carbohydrate polysaccharide conversion to monomer sugars. *Chemical Reviews*, 46(3), 373–376. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00421>
- Mendgen, K., & Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*, 7(8), 352–356. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02297-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02297-5)
- Mendoza, A., Hernandez, F., Hernandez, S., Ruiz, D., Martínez de la Vega, O., Mora, G., Simpson, J. (2000). Identification of Co-1 anthracnose resistance and linked molecular markers in common bean line A193. *Plant Disease*, 85(3), 252–255.
- Mewis, K., Lenfant, N., Lombard, V., & Henrissat, B. (2016). Dividing the large glycoside hydrolase family 43 into subfamilies: a motivation for detailed enzyme characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1686–1692.
<https://doi.org/10.1128/aem.03453-15>
- Moraís, S., Salama-Alber, O., Barak, Y., Hadar, Y., Wilson, D. B., Lamed, R., Bayer, E. A. (2012). Functional association of catalytic and ancillary modules dictates enzymatic activity in glycoside hydrolase family 43 β -xylosidase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(12), 9213–9221. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.314286>
- Mordue, J. E. M. (1971). *Colletotrichum lindemuthianum*. *C.M.I. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria*, 32(316), 1996.
<https://doi.org/10.1094/phyto.1998.88.4.292>
- Moreira, L. R. S., & Filho, E. X. F. (2016). Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5205–5214.
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7555-z>
- Münch, S., Lingner, U., Floss, D. S., Ludwig, N., Sauer, N., & Deising, H. B. (2008). The

- hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology*, 165(1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.008>
- Mustafa, G., Kousar, S., Rajoka, M. I., & Jamil, A. (2016). Molecular cloning and comparative sequence analysis of fungal β -Xylosidases. *AMB Express*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0202-3>
- O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., Vaillancourt, L. J. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, 44(9), 1060–1065. <https://doi.org/10.1038/ng.2372>
- Octavio, L. (2002). Las xilanasas microbianas y sus aplicaciones. *BioTecnología*.
- Ohta, K., Fujimoto, H., Fujii, S., & Wakiyama, M. (2010). Cell-associated β -xylosidase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524: Purification, properties, and characterization of the encoding gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(2), 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.02.008>
- Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., & Xiong, G. (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta*, 238(4), 627–642. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1921-1>
- Pei, J., & Grishin, N. V. (2007). PROMALS: Towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. *Bioinformatics*, 23(7), 802–808. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm017>
- Peixoto-Nogueira, M. M. S. C., & Joa, T. M. S. (2012). A novel xylan degrading β -D-xylosidase : purification and biochemical characterization, 3179–3186. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1128-9>
- Pellier, A.-L. L., Laugé, R., Veneault-Fourrey, C., Langin, T., Perfect, S. E., Green, J. R., Adaskaveg, J. E. (2007). Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: Cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. *Phytopathology*, 27(1), 352–356. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>
- Peña, J.-R.-A. (2011). *Manual de histología vegetal*. (Paraninfo, Ed.).
- Pérez-González, J. A., Van Peij, N., Bezoen, A., Maccabe, A. P., Ramón, D., & De Graaff, L. H. (1998). Molecular cloning and transcriptional regulation of the *Aspergillus nidulans* xlnD gene encoding a β -xylosidase. *Applied and Environmental*

- Microbiology*, 64(4), 1412–1419.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De La Rubia, T., & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *International Microbiology*, 5(2), 53–63. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>
- Perfect, Hughes, H. B., O’Connell, R. J., & Green, J. R. (1999a). *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 27(2–3), 186–198. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Piñón-Escobedo Carlos. (2005). Inducción de actividad de xilanasas y β -xilosidasas en dos razas del hongo fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum*. Universidad de Guanajuato.
- Pinto, J. M. A., Pereira, R., Mota, S. F., Ishikawa, F. H., & Souza, E. A. (2012). Investigating Phenotypic Variability in *Colletotrichum lindemuthianum* Populations. *Phytopathology*, 102(5), 490–497. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-11-0179>
- Quiroz-Castañeda, R. E., & Folch-mallol, J. L. (2006). Biotecnología Aplicada - Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal perspectivas actuales.
- Quiroz-Castañeda, R. E., & Folch-Mallol, J. L. (2011). Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: Perspectivas actuales. *Biotecnología Aplicada*.
- Ravanel, M. C., Alegría-Arcos, M., Gonzalez-Nilo, F. D., & Eyzaguirre, J. (2013). *Penicillium purpurogenum* produces two GH family 43 enzymes with β -xylosidase activity, one monofunctional and the other bifunctional: Biochemical and structural analyses explain the difference. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 540(1–2), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.017>
- Réblová, M., Gams, W., & Seifert, A. (2011). Monilochaetes and allied genera of the *Glomerellales*, and a reconsideration of families in the Microascales. *Studies in Mycology*, 68, 163–191. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.68.07>
- Reen, F. J., Murray, P. G., & Tuohy, M. G. (2003). Molecular characterisation and expression analysis of the first hemicellulase gene (bx11) encoding β -xylosidase from

the thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(3), 579–585. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00829-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00829-5)

Rodríguez-Guerra, R., Acosta-Gallegos, J. A., González-Chavira, M. M., & Simpson, J. (2006b). 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., Ramírez-Rueda, M.-T., Cabral-Enciso, M., García-Serrano, M., Lira-Maldonado, Z., Guevara-González, R. G., Simpson, J. (2005). Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. *Mycologia*, 97(4), 793–803. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.4.793>

Rohman, A., Oosterwijk, N. Van, Nyoman, N., & Puspaningsih, T. (2018). Structural basis of product inhibition by arabinose and xylose of the thermostable GH43 β -1, 4-xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08, 1–15.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J., & Teslenko, M. (2011). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space.

Rytioja, J. A., Hildén, K. A., Yuzon, J. B., Hatakka, A. A., Ronald P. de Vries, b, C., & Department, M. R. M. (2014). Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetestia, J. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(4), 614–649. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-14>

Saha, B. C. (2003). Purification and properties of an extracellular β -xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*, 90, 33–38. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00098-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00098-1)

Salisbury, F. B., & Ross, C. W. (1994). *Fisiología vegetal*. (G. E. Iberoamericano, Ed.).

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (C. Press, Ed.).

Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>

Sánchez Riaño, A. M., Gutiérrez Morales, A. I., Muñoz Hernández, J. A., & Rivera Barrero, C. A. (2010). Bioethanol production from agroindustrial lignocellulosic

- byproducts. *Tumbaga*, 5, 61–91. Retrieved from <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/194/163>
- Sandoval, E. (2005). Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, a R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sarkar, P., Bosneaga, E., & Auer, M. (2009). Plant cell walls throughout evolution: Towards a molecular understanding of their design principles. *Journal of Experimental Botany*, 60(13), 3615–3635. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp245>
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Schwartz, H., Pastor Corrales, M., Correa Via, F., Ospina O, H., & Flor Montoya, C. (1981). La antracnosis del frijol y su control. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Shallom, D., & Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 219–228. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00056-0)
- Smith, L. G. (2001). Plant cell division: Building walls in the right places. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(1), 33–39. <https://doi.org/10.1038/35048050>
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Youngs, H. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, 306(5705), 2206–2211. <https://doi.org/10.1126/science.1102765>
- Stanke, M., Steinkamp, R., Waack, S., & Morgenstern, B. (2004). AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server issue), W309-12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh379>
- Stülke, J., & Hillen, W. (2000). Regulation of carbon catabolism in bacillus species. *Annual Reviews Microbiol.* <https://doi.org/0066-4227/00/1001-0849>
- Sun, Y., & Cheng, J. (2001). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6:

- Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tani, S., Kawaguchi, T., & Kobayashi, T. (2014). Complex regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), 4829–4837. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5707-6>
- Teng, C., Jia, H., Yan, Q., Zhou, P., & Jiang, Z. (2011). High-level expression of extracellular secretion of a β -xylosidase gene from *Paecilomyces thermophila* in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 102(2), 1822–1830. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.055>
- Than, P. P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P. W. J., & Hyde, K. D. (2008). Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 9(10), 764–778. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0860007>
- Valenciaga, D., & Chongo, B. (2004). Cell wall. Influence of its nature on the ruminal microbial degradation of forages. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 38(4), 335–342. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-27744524963&partnerID=40&md5=6da287b0ad064277925235a9e9afd7f5>
- Veneault-fourrey, C., Lauge, R., & Langin, T. (2005). Nonpathogenic strains of *Colletotrichum lindemuthianum* trigger progressive bean defense responses during appressorium-mediated penetration. *Society*, 71(8), 4761–4770. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4761>
- 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. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160813160727>
- Villa-Rivera, M. G., Zavala-Páramo, M. G., Conejo-Saucedo, U., López-Romero, E., Lara-Márquez, A., & Cano-Camacho, H. (2017). 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. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.10.002>

- Villa-Rivera, M. G., Zavala-Páramo, M. G., Lara Márquez, A., Lopez-Romero, E., Conejo-Saucedo, U., & Cano Camacho, H. (2017). Differences in the expression profile of a GH51 α -L-arabinofuranosidase in pathogenic and non pathogenic races of *Colletotrichum lindemuthianum* grown in the presence of arabinogalactan, xylan or *Phaseolus vulgaris* cell walls. *Physiological Plant Pathology*.
- Wakiyama, M., Yoshihara, K., Hayashi, S., & Ohta, K. (2010). An extracellular endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus japonicus*: Purification, properties, and characterization of the encoding gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(3), 227–229. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.09.005>
- Wegener, S., Ransom, R. F., & Walton, J. D. (1999). A unique eukaryotic β -xylosidase gene from the phytopathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Microbiology*, 145(5), 1089–1095. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-5-1089>
- Xu, X., Qian, L., Xia, W., Xia, M., Shi, P., Cui, Y., & Yao, B. (2015). High level expression of a novel family 3 neutral β -xylosidase from *Humicola insolens* Y1 with high tolerance to D-xylose. *Plos One*, 10(2), e0117578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117578>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Meth*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213> <http://www.nature.com/nmeth/journal/v12/n1/abs/nmeth.3213.html#supplementary-information>
- Ye, Y., Li, X., & Zhao, J. (2017). Production and characteristics of a novel xylose- and alkali-tolerant GH 43 β -xylosidase from *Penicillium oxalicum* for promoting hemicellulose degradation. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11573-7>
- Zimbardi, A. L. R. L., Sehn, C., Meleiro, L. P., Souza, F. H. M., Masui, D. C., Nozawa, M. S. F., Furriel, R. P. M. (2013). Optimization of β -glucosidase, β -xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 2875–2902. <https://doi.org/10.3390/ijms14022875>