



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**



**CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN
BIOTECNOLOGÍA**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HEMICELULASAS DE
DOS RAZAS DE *Colletotrichum lindemuthianum* CON DIFERENTES
SUSTRATOS NATURALES**

Que presenta:

QFB Karla Morelia Díaz Tapia

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

ASESOR: DC HORACIO CANO CAMACHO

CO-ASESORA: DC MARÍA GUADALUPE ZAVALA PÁRAMO

Morelia, Mich., febrero 2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesor el Dr. Horacio Cano Camacho y mi co-asesora la Dra. María Guadalupe Zavala Páramo, por darme la oportunidad de pertenecer a su gran equipo de trabajo y compartirme sus conocimientos para mejorar en mi formación académica y también personal.

Agradezco a la Dra. María Guadalupe Villa Rivera por sus consejos y de brindarme sus conocimientos para mi formación académica y personal. Aprendí mucho de ella. Muchas gracias por su amistad.

Agradezco a mi mamá Julia Tapia por todo su apoyo y esfuerzo que me brindo durante mis estudios, de igual manera a mi papá Carlos Raúl Díaz (QEPD), quien me brindo todo su apoyo y motivación durante mis estudios. También agradezco a mi madrina Ma. Guadalupe Peña que siempre me motivo para seguir adelante con mis estudios. Gracias por todo.

Agradezco a Irene Morelos por todo su apoyo y su conocimiento que me brindo para aprender cosas increíbles y su amistad. También a Ana Huerta quien me compartio su conocimiento y me brindo su amistad.

En general, agradezco a mi familia y amigos que me apoyaron y estuvieron conmigo en este camino.

Índice

Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	7
2. Antecedentes	8
• <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	8
• Estrategia de nutrición/infección de <i>C. lindemuthianum</i>	8
• Fase biotrófica	9
• Fase necrotrófica	9
• Pared celular vegetal	10
• Composición química de la pared celular vegetal	11
• Celulosa	11
• Hemicelulosa	11-12
• Pectina	13
• Lignina	13
• Proteínas	13
• Degradación enzimática de arabinosilanos (AX)	14
• α -L-arabinofuranosidasa	15
• β -xilosidasa	16
• Endo- β -1,4-xilanasa	17
• Celobiohidrolasa	18
• Aplicaciones biotecnológicas	18-19
3. Justificación	20
4. Hipótesis	21

5. Objetivo general	21
• Objetivos específicos	21
6. Materiales y métodos	22
• Material biológico	22
• Medios de cultivo	22
• Medio Papa-Dextrosa agar (PDA)	22
• Medio lirio-agar	22
• Medio ejote-agar	23
• Medio hipocotilos-agar	23
• Medio bagazo de caña-agar	23
• Medio mínimo Mathur modificado	23
• Cinéticas de crecimiento y actividad enzimática	23
• Ensayos de actividad enzimática	23
• Obtención de biomasa micelial	24
• Ensayo de actividad α -L-arabinofuranosidasa (ABF)	24
• Ensayo de actividad β -xilosidasa (XYLO)	25
• Ensayo de actividad endo- β -1,4-xilanasa (XYL)	25
• Ensayo de actividad celobiohidrolasa (CBH)	25
• Cuantificación de proteínas	25
• Análisis estadísticos	26
7. Resultados	27
• Crecimiento en placa de <i>C. lindemuthianum</i> en lirio acuático, ejote, hipocotilos de frijol y bagazo de caña	27-28

• Crecimiento en medio líquido	29
• Peso seco	29-30
• Actividad extracelular α -L-arabinofuranosidasa	31-32
• Actividad extracelular β -xilosidasa	33-34
• Actividad extracelular endo- β -1,4-xilanasa	35-36
• Actividad celobiohidrolasa	37-38
• Resultados de análisis estadísticos	39-43
8. Discusión	44-49
9. Conclusiones	50
10. Literatura citada	51-55

RESUMEN

Colletotrichum lindemuthianum es un hongo fitopatógeno que provoca antracnosis en la planta del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Hemicelulasas como la endo- β -1,4-xilanasa (XYL), α -L-arabinofuranosidasa (ABF), β -xilosidasa (XYLO), y celulasas como la celobiohidrolasas (CBH) que secreta el hongo, participan en la degradación de la pared celular vegetal de su hospedero. En este trabajo, se evaluó el crecimiento micelial y producción de actividad de XYL, ABF, XYLO y CBH en dos razas de *C. lindemuthianum* con diferente estilo de vida (0 no patógena y 1472 patógena), en medios de cultivo suplementados con hipocotilos y ejote de frijol, lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) y bagazo de caña. Los resultados mostraron que el lirio acuático favorece la mayor producción de biomasa micelial de las dos razas de *C. lindemuthianum*. Sin embargo, la raza 1472 (patógena) presentó mejor crecimiento micelial que la raza 0 (no patógena). Por otro lado, *C. lindemuthianum* no crece bien en glucosa o celulosa, prefiere sustratos complejos ricos en pectina y hemicelulosa, sugiriendo una especialización en actividad pectinolítica y hemicelulolítica. Respecto a la secreción de actividad enzimática, en ambos hongos, la secreción de actividad ABF ocurre en los primeros nueve días en todos los sustratos probados. Se encontró que ambas razas de *C. lindemuthianum* presentaron la mayor actividad de XYL en medio con lirio acuático. Por otro lado, la raza 1472 (patógena) de *C. lindemuthianum* presentó la mayor actividad de ABF, XYLO y CBH en medio con lirio acuático. Sin embargo, el patrón de secreción de actividad xilanolítica (XYL y XYLO) en medio con hipocotilos fue diferencial entre ambas razas, rápido en la raza 0 (no patógena) y retrasado en la raza 1472 (patógena). De manera similar, el patrón de secreción de actividad celulolítica (CBH) en todos los sustratos probados fue diferencial entre ambas razas, rápido en la raza 0 (no patógena) y retrasado en la raza 1472 (patógena). Finalmente, el bagazo de caña no es un buen sustrato para el crecimiento e inducción de actividad enzimática de *C. lindemuthianum*.

Palabras clave: Hemibiotrófico, endo- β -1,4-xilanasa, α -L-arabinofuranosidasas, β -xilosidasa, celobiohidrolasas.

ABSTRACT

Colletotrichum lindemuthianum is a phytopathogenic fungus that causes anthracnose in the common bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.). Hemicellulases such as endo- β -1,4-xylanase (XYL), α -L-arabinofuranosidase (ABF), β -xylosidase (XYLO), and cellulases such as cellobiohydrolases (CBH) that secrete the fungus, participate in the degradation of the plant cell wall of its host *Phaseolus vulgaris*. In this work, the mycelial growth and activity production of XYL, ABF, XYLO and CBH in two races of *C. lindemuthianum* with different lifestyle (0 non-pathogenic and 1472 pathogenic), in culture media supplemented with hypocotyls and bean bean, hyacinth water (*Eichhornia crassipes*) and cane bagasse were evaluated. The results showed that the hyacinth water favors the greater production of mycelial biomass of the two races of *C. lindemuthianum*. However, race 1472 (pathogenic) showed better mycelial growth than race 0 (non-pathogenic). On the other hand, *C. lindemuthianum* does not grow well in glucose or cellulose, it prefers complex substrates rich in pectin and hemicellulose, suggesting a specialization in pectinolytic and hemicellulolytic activities. Regarding the secretion of enzymatic activity, in both fungi, the secretion of ABF activity occurs in the first nine days in all the substrates tested. It was found that both races of *C. lindemuthianum* have the highest activity of XYL in the culture media with aquatic lilio. On the other hand, race 1472 (pathogen) of *C. lindemuthianum* has the highest activity of ABF, XYLO and CBH in the culture media with aquatic lilio. However, the pattern of secretion of xylanolytic activity (XYL and XYLO) in middle with hypocotyls was differential between both races, rapid in race 0 (non-pathogenic) and delayed in race 1472 (pathogenic). Similarly, the cellulolytic activity (CBH) secretion pattern in all tested substrates was differential between both races, fast in race 0 (non-pathogenic) and delayed in race 1472 (pathogenic). Finally, cane bagasse is not a good substrate for the growth and induction of enzymatic activity of *C. lindemuthianum*.

Key words: Hemibiotrophic, endo- β -1,4-xylanase, α -L-arabinofuranosidases, β -xylosidase, cellobiohydrolases.

1. INTRODUCCIÓN

Colletotrichum lindemuthianum es un hongo fitopatógeno que provoca antracnosis en la planta del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) (O'Connell *et al.*, 1985), y presenta una gran diversidad de patotipos (Sánchez *et al.* 2009), entre los que se encuentran la raza 1472 (patógena) y la raza 0 (no patógena). *C. lindemuthianum* es un hongo hemibiotrófico que secreta un conjunto de enzimas que degradan la pared celular vegetal (Münch, 2008). Los principales polisacáridos que constituyen la pared celular vegetal son celulosa, hemicelulosa y pectina (Burton, 2010). Las hemicelulosas son heteropolisacáridos altamente ramificados, integrados por cadenas principales de xilosa, manosa o glucosa, con cadenas laterales de galactosa, arabinosa, ácido acético y ácido glucurónico principalmente (Conejo-Saucedo *et al.* 2011). Dado que se comporta como un polímero insoluble asociado con celulosa y lignina, se requiere de una acción coordinada de enzimas hidrolíticas para su degradación, entre las que se encuentran endoxilanasas, β -xilosidasas, endoglucanasas, endomananasas, manosidasas, α -arabinofuranosidasas y galactosidasas (Kousar *et al.* 2013). La celulosa es una macromolécula lineal de unidades de glucosa, unidas por enlaces (1,4)-glicosídicos, capaz de formar complejos microfibrilares no covalentes (Lerouxel, 2006; Burton, 2010; Chen, 2014). La degradación enzimática de la celulosa implica la acción secuencial de un grupo de enzimas conocidas como celulasas; el sistema de celulasas típico incluye endoglucanasas o 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasas, exoglucanasas, que incluyen 1,4- β -D-glucano-glucanohidrolasas (celodextrinasas) y 1,4- β -D-glucano-celobiohidrolasas (celobiohidrolasas), y β -glucosidasas o β -glucosidasa hidrolasas (Gutiérrez-rojas, 2015). Hasta el momento, en *C. lindemuthianum* se ha evaluado la inducción de la actividad de algunas enzimas hidrolíticas utilizando fuentes de carbono como celulosa, arabinogalactano, xilana, y pared celular de *P. vulgaris* (Acosta-Rodríguez *et al.* 2005; Hernández-Silva *et al.* 2007; Conejo-Saucedo *et al.* 2016), y se cuenta con resultados preliminares utilizando sustratos complejos como el lirio acuático y bagazo de caña (Díaz-Tapia 2018). Por lo cual este trabajo tiene como objetivo realizar el análisis de la actividad extracelular de hemicelulasas y celulasas en *Colletotrichum lindemuthianum*.

2. ANTECEDENTES

Colletotrichum lindemuthianum

C. lindemuthianum (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, es un hongo fitopatógeno con un estilo de vida hemibiotrófica y pertenece al phylum de los Ascomycetos. Este hongo es económicamente importante ya que causa antracnosis en la planta del frijol (*P. vulgaris* L.) (O'Connell, Bailey and Richmond, 1985). *C. lindemuthianum* presenta una gran diversidad de patotipos o razas que infectan diferencialmente un grupo de cultivares de una misma especie hospedera, en este caso la planta del frijol común. Se ha utilizado un conjunto de 12 cultivares diferenciales de *P. vulgaris* (cuatro de origen andino y ocho de origen mesoamericano) para con base en su interacción, hacer la determinación de patotipos con diferente grado de virulencia. En el caso de los aislados incapaces de establecer una interacción compatible con los cultivares diferenciales de *P. vulgaris*, se les designo como patotipo 0 (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2006).

Hasta el momento se han reportado más de 100 patotipos de *C. lindemuthianum*, de los cuales 56 están presentes en México y se encuentran distribuidos en los estados de Durango, Guerrero, Chiapas, Chihuahua, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (González-Chavira *et al.*, 2004; Rodríguez-Guerra *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2009).

En México, se obtuvieron 30 aislados de la raza 0, provenientes de Durango, Jalisco, Michoacán, México, Tlaxcala y Morelos. Por otra parte, La raza 1472 fue de las razas más virulentas encontradas en México, infectando cuatro de los 12 cultivares diferenciales. La raza 1472 se aisló de los estados de Zacatecas, Hidalgo y México (González-Chavira *et al.*, 2004; Rodríguez-Guerra *et al.*, 2006).

Estrategia de nutrición/infección de *C. lindemuthianum*

C. lindemuthianum es un hongo hemibiotrófico, lo cual le da la estrategia para obtener nutrientes tanto de células vivas como células muertas. Durante el proceso de nutrición/infección, este hongo establece una fase biotrófica, en la cual la célula huésped permanece viva, seguida por una segunda fase necrotrófica altamente destructiva para el tejido del huésped (Wijesundera *et al.*, 1989; Münch, 2008). El proceso de infección (Fig. 1) inicia cuando una espora se adhiere a la superficie del hospedero para después germinar y formar un tubo germinal corto dando como resultado un apresorio melanizado. En seguida, se desarrolla una hifa de penetración sobre la base del apresorio,

transformando la presión de turgencia en fuerza mecánica para perforar la cutícula del hospedero (Knogge, 1998; Mendgen and Hahn, 2002).

Fase biotrófica

Posterior a la penetración de la célula huésped, se establece la fase biotrófica, en donde se forma una vesícula de infección sin producir modificaciones de la membrana plasmática de la planta como se ilustra en la figura 1. *C. lindemuthianum* enmascara las hifas invasoras y suprime la defensa del hospedero por medio de una matriz interfacial que separa la pared celular del patógeno de la membrana plasmática de la planta (Perfect, 2001; Münch, 2008). Después, el hongo se esparce a las células próximas produciendo hifas primarias que se invaginan sin penetrar la membrana celular, para finalizar la fase biotrófica gran parte del tejido vegetal debe estar colonizado (Perfect, 2001). La nutrición durante la fase biotrófica depende de que la célula huésped esté viva y este coordinada por un sistema de transferencia de nutrientes tales como hexosas y aminoácidos de la célula huésped viva hacia el patógeno (Mendgen and Hahn, 2002).

Fase necrotrófica

Después de las 48 o 72 horas (dependiendo de las condiciones ambientales) de la germinación de la espora, inicia la fase necrotrófica (Perfect, 1999). Las hifas primarias del hongo se convierten en hifas secundarias o hifas necrotróficas como se muestra en la figura 1, que son de diámetro menor y se ramifican dentro del tejido vegetal (Perfect, 2001). La degradación de la pared celular vegetal es producida por una amplia gama de enzimas hidrolíticas secretadas por el hongo. Para *C. lindemuthianum* se han reportado poligalacturonasas, pectinasas, β -glucosidasas, β -xilidasas, α -glucosidasas, mananasas (Anderson, 1978), celulasas (Acosta-Rodríguez, 2005), xilanasas (Conejo-Saucedo *et al.*, 2016), pectin liasas (Hernández-Silva, 2007; Lara-Márquez, 2011), pectato liasas (Cnossen-Fassoni, 2013) y endopoligalacturonasas (Dumas, 1999; Herbert, 2004), las cuales le proporcionan la fuente de carbono necesaria para su crecimiento y reproducción (Ashton, 1984; Perfect, 2001; Münch, 2008).

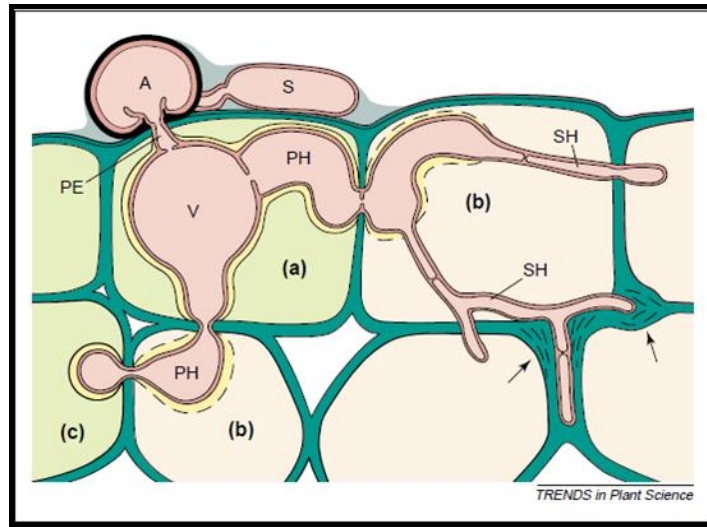


Figura 1. Infección hemibiotrófica por *Colletotrichum lindemuthianum*. S=espora, A=apresorio melanizado, PE=hifa de penetración, (a)=fase biotrófica, V=vesícula, PH=hifas primarias, (b)=fase necrotrófica, SH= hifas secundarias. Tomado de (Mendgen and Hahn, 2002).

Pared celular vegetal

Las paredes celulares vegetales son clave para el crecimiento de las plantas, la diferenciación celular y la comunicación intercelular, y es la barrera de protección contra microorganismos (Daniel J Cosgrove, 2005; Keegstra, 2010). Debido a su porosidad, la pared celular vegetal permite que el agua y otras moléculas pequeñas se difundan a través de la misma (Burton, 2010). Su estructura es muy compleja y variable (Valenciaga, 2004), dependiendo del tiempo de formación y composición química puede dividirse en pared celular primaria y pared celular secundaria, las cuales son separadas por una lámina media (Chen, 2014).

La pared celular primaria fuerte pero flexible, se deposita mientras la célula se está expandiendo (Fry, 1988; Daniel J. Cosgrove, 2005). La función de una pared celular primaria es proporcionar soporte estructural y mecánico, mantener y determinar la morfología celular, soportar la presión de turgencia en las células, controlar la velocidad y dar dirección al crecimiento celular; promover la morfogénesis de las plantas, regular la difusión del material en la lámina media, reserva de carbohidratos, resistencia a patógenos y a la deshidratación; así como activar la interacción entre las moléculas señal y las células (Chen, 2014). La pared celular secundaria comienza a formarse cuando las células dejan de crecer y el área superficial de la pared celular primaria ya no aumenta y proporciona resistencia y rigidez a la célula (Zhang, 2015). Existe una capa intercelular llamada

laminilla media, que se compone principalmente de coloides amorfos con una gran hidrofobicidad y ayuda a la unión de la pared celular primaria con la secundaria (Chen, 2014).

Composición química de la pared celular vegetal

Las paredes celulares primarias están compuestas principalmente de celulosa, hemicelulosa, pectina, glicoproteínas estructurales, proteínas (expansinas) y algunos iones como el calcio (Albersheim, 1994; Chen, 2014). La pared celular secundaria está formada de celulosa, hemicelulosa y lignina (Valenciaga, 2004) (Fig. 2).

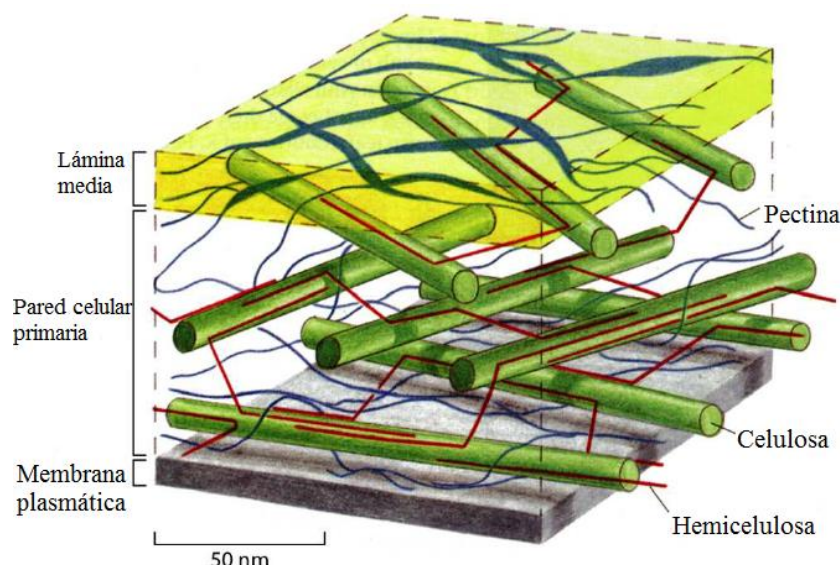


Figura 2. Modelo de la estructura de la pared celular primaria. Tomado de (Scheller and Ulvskov, 2010).

Celulosa

La celulosa forma la primera red microfibrilar en la pared primaria y secundaria (Caffall, 2009). Constituye aproximadamente el 40-50% de todo el material vegetal (Zhang, 2015), determina el armazón de la pared celular y es el polisacárido principal de las paredes celulares vegetales. Es una macromolécula lineal de unidades de glucosa, unidas por enlaces 1,4-glicosídicos que forma complejos microfibrilares no covalentes (Lerouxel, 2006; Burton, 2010; Chen, 2014).

Hemicelulosa

Las hemicelulosas representan aproximadamente el 20-35% de la biomasa lignocelulósica (Saha, 2003). Son heteropolisacáridos altamente ramificados en sus cadenas de xilosa o en cadenas de

manosa y glucosa con galactosa, arabinosa y ramificaciones de ácido acético o ácido glucurónico (Conejo-Saucedo *et al.* 2011). Las hemicelulosas se enlazan a las microfibrillas de celulosa y forman enlaces covalentes con la lignina, contribuyendo a la resistencia de la pared celular (Valenciaga, 2004). La función principal de las hemicelulosas es participar en la construcción de la estructura de la pared celular y regular el proceso de crecimiento celular (Chen, 2014). En 2010, Henrik Vibe Scheller y Peter Ulvskov definieron cuatro componentes principales en la hemicelulosa; xiloglucano, xilanos, mananos y glucomananos.

La xilana es el principal polisacárido no celulósico en las paredes celulares primarias, constituyendo aproximadamente el 20% de la pared (Scheller and Ulvskov, 2010). Comprende una cadena lineal de β - (1,4)-D-xilopiranososa y cadenas derivadas de ácido 4-oximetilglucurónico. Debido a que la xilana suele estar asociada con varios residuos de arabinosa u otros monosacáridos unidos a la cadena principal, se puede presentar como xiloglucanos (XG), arabinoxilanos (AX), glucuronoarabinoxilanos (GAX), glucuronoxilano (GX) y mananos (Caffall, 2009; Scheller and Ulvskov, 2010; Chen, 2014).

El xiloglucano (XG) es un componente de las hemicelulosas en las paredes celulares primarias (Scheller and Ulvskov, 2010). La cadena principal de xiloglucano es similar a la de la celulosa y está compuesta por D-glucopiranososa con ramificaciones de xilosa unidas con enlaces β -(1,4). El XG también puede tener arabinosa (Daniel J. Cosgrove, 2005; Chen, 2014).

Los arabinoxilanos (AXs) (Fig. 3), son un grupo heterogéneo de polisacáridos de la pared celular, presentes en los granos de cereales como endospermo amiláceo (harina) y capas externas de granos de cereales (Ebringerová, 2006; Magdalena de Jesús, 2014). Los AXs son de las hemicelulosas más abundantes en la tierra y constituyen uno de los componentes principales de las materias primas que se investigan como fuentes de biocombustible (Lagaert *et al.*, 2014). Su estructura está formada por una cadena lineal de unidades de xilosa unidas por enlaces β -(1,4) glicosídicos, a la cual se unen residuos de arabinosa, glucosa, galactosa, ácido glucurónico, ácido ferúlico, ácido acético, entre otros, mediante enlaces glicosídicos α -(1,3), α -(1,2) o ambos (Morales *et al.*, 2013).

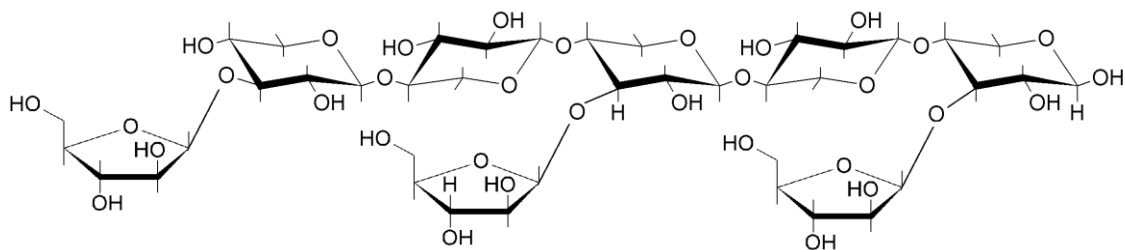


Figura 3. Estructura de arabinoxilano (AX).

Pectina

La pectina es uno de los componentes de la pared celular primaria vegetal, es el principal constituyente de la lámina media y también se encuentra en células en división y en áreas de contacto entre células que tienen una pared celular secundaria (Lara-Márquez, 2011). La pectina tiene como función importante la resistencia mecánica, la porosidad, la adhesión y la rigidez de la pared celular (Burton, 2010). Las pectinas se clasifican en homogalacturonanos (HGs), ramnogalacturonanos I (RGIs) y ramnogalacturonanos II (RGIIs) y en algunas especies particulares también se pueden encontrar xilogalacturonanos y apiogalacturonanos (Salazar Iribe, 2013).

Lignina

Es un polímero polifenólico con una red tridimensional. Constituye el principal polímero natural junto con la celulosa y es responsable de la rigidez de la planta, la resistencia de tejidos vasculares, conducción de solutos, agua y sales minerales necesarias para la supervivencia de la planta, además de la protección contra fenómenos oxidativos y ataques de parásitos. Los tres monómeros principales que forman la lignina son el alcohol cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico (Valenciaga, 2004; Chen, 2014).

Proteínas

Las proteínas de la pared celular (CWP) son componentes esenciales de las paredes de las células vegetales implicadas en las modificaciones de los componentes de la pared celular, la estructura, la señalización y las interacciones con las proteínas de la membrana plasmática en la superficie celular (Jamet *et al.*, 2006). Las proteínas arabinogalactano (AGPs), las proteínas ricas en prolina (PRPs), las proteínas ricas en glicina (GRPs), las extensinas; son proteínas que integran a la pared

celular y podrían ayudar al reforzamiento estructural de la pared y actuar en vías reguladoras (Caffall, 2009).

Degradación enzimática de arabinoxilanos (AX)

La degradación de las hemicelulosas por parte de hongos patógenos, impone varios desafíos. Dado que es un polímero insoluble y asociado con celulosa y lignina además de un polímero de alto peso molecular con estructura variable, se requiere de una acción coordinada de enzimas hidrolíticas para su degradación (Kousar, 2013). Las enzimas que degradan la hemicelulosa pueden dividirse en enzimas principales que hidrolizan la cadena central y enzimas accesorias que hidrolizan las ramificaciones que pueden presentar impedimentos estéricos para las enzimas despolimerizantes (Dyk and Pletschke, 2012).

La cadena principal de AX es degradada por glicosil hidrolasas (GH) (Fig. 4) que son capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos presentes en AX, GX y arabinoglucuronoxilano arabinoxilooligosacáridos (AXOS) (Magdalena de Jesús, 2014). Dentro de este conjunto de enzimas se encuentran la endo- β -1,4-xilanasa (EC 3.2.1.8), β -xilosidasa (EC 3.2.1.37) y α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), feruloil estereasa (EC 3.1.1.73) y/o acetil xilanoestereasa (EC 3.1.1.72) (Fig. 4) (Rasmussen *et al.*, 2012).

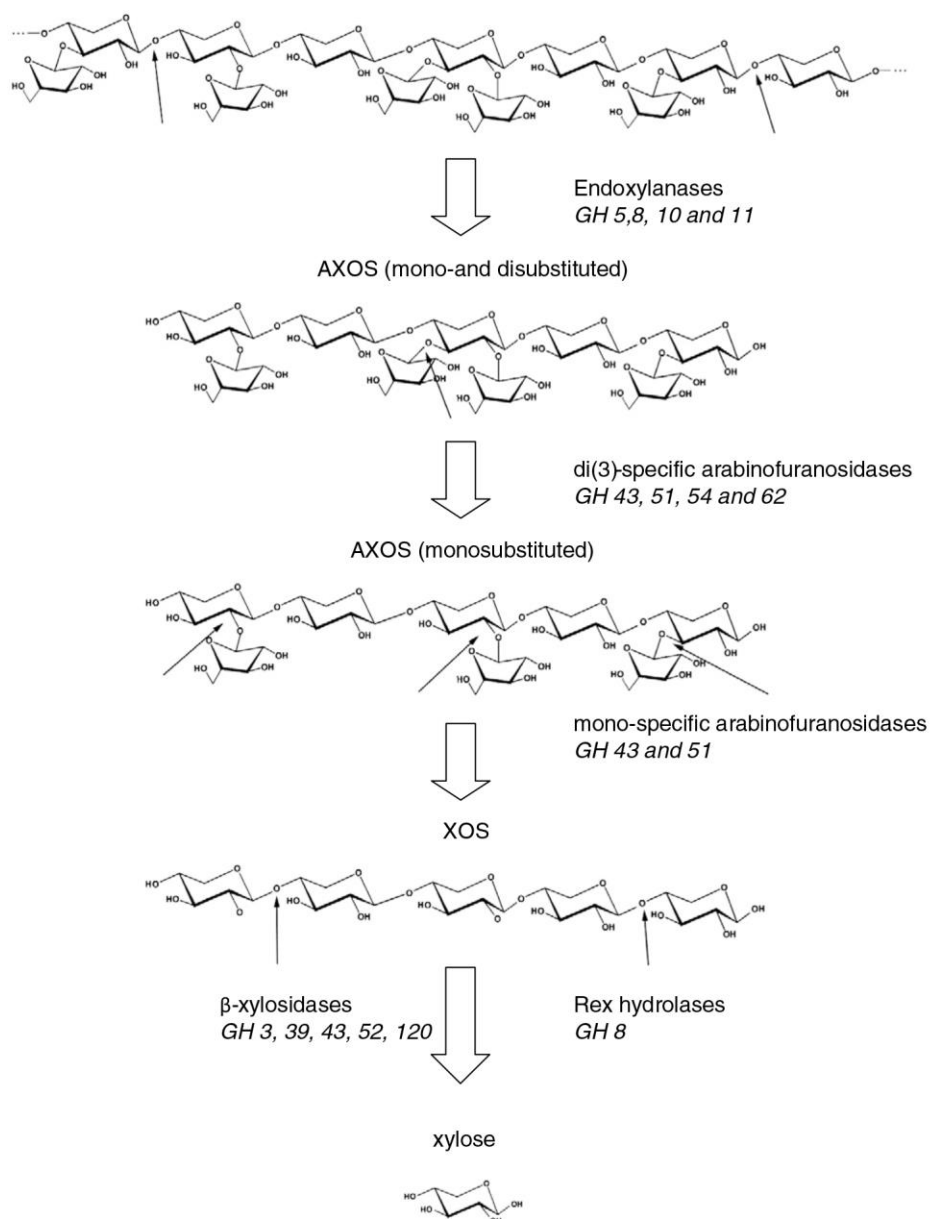


Figura 4. Esquema de la degradación de arabinoxilano. Tomado de (Lagaert *et al.*, 2014).

α -L-arabinofuranosidasa

La α -L-arabinofuranosidasa (α -L-arabinofuranosida arabinofuranohidrolasa, EC 3.2.1.55, AF) es una enzima de tipo exo, es considerada una enzima accesoria que participa en la liberación de residuos L-arabinofuranosyl (Saha, 2000). Estas enzimas actúan sinérgicamente con las endoxilanasas (Lagaert *et al.*, 2014). Las ABFs catalizan específicamente la hidrólisis de residuos terminales no reductores (α -L- 1,2), (α -L-1,3) y (α -L-1,5) de diferentes oligosacáridos y polisacáridos. Hay una gran variedad de ABFs clasificadas dentro de las familias 3, 43, 51, 54 y

62 de las Glicosil Hidrolasas (GH) (<http://www.cazy.org/>). Dentro de la familia GH3, existen varias enzimas bifuncionales degradadoras de AX. Todas las hidrolasas GH3 de microorganismos muestran exclusivamente actividad xilosidasa sobre sustratos tales como xiloligosacáridos (XOS), xilana y AX (Lagaert *et al.*, 2014). Existe muy poca información acerca de la estructura tridimensional de las ABFs en bases de datos de proteínas, sin embargo, las enzimas GH3 tienen una topología barril TIM (α/β)₈ en el extremo N-terminal, unido con un dominio β -sándwich (α/β). Las enzimas de la familia GH43 tienen un dominio catalítico con una topología que consta de un dominio catalítico α -hélice. Se cuenta con algunas estructuras de ABF cristalizadas: CAB13699 de *Bacillus subtilis*, cluster A2, y CAL81199 de *Humicola insolence*, cluster C1 (Numan and Bhosle, 2006; Lagaert *et al.*, 2014). Se ha reportado ensayos de actividad enzimática de α -L-arabinofuranosidasa en cebada como sustrato natural (Lee *et al.*, 2003). En la familia GH54 existen 22 enzimas caracterizadas, son proteínas fúngicas muy conservadas y muestran exclusivamente actividad arabinofuranosidasa sobre sustratos naturales. En 2004 se cristalizó una ABF de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 (AkAbf54), de la familia GH54, la cual es una proteína monomérica organizada en dos dominios, un dominio catalítico C-terminal con una topología de β -sandwich, unido a un dominio con una topología de β -trébol con tres subdominios (α , β y γ) (Miyanaga *et al.*, 2006). Se ha evaluado la actividad extracelular ABF en hongos, así como su función específica en la degradación de AX, por ejemplo: la participación de dos α -L-arabinofuranosidas de *A. kawachii* (AkAbfA y AkAbfB) en la degradación de AX y en la fabricación de shoshu. Se realizaron ensayos de actividad enzimática para observar el efecto de diferentes fuentes de carbono como L-arabitol, L-arabinosa, salvado de trigo, hojuelas de avena, xilosa y glucosa, sobre la producción de α -L-arabinofuranosidas de *A. kawachii* IFO4308 (Koseki *et al.*, 2003).

β -xilosidasa

Son enzimas hidrolíticas que desempeñan un papel importante en la degradación del xilana, actuando sobre xilobiosa y xilo-oligosacáridos desde el extremo no reductor (Knob, 2010). Estas enzimas hidrolizan preferentemente a enlaces β -1,4-xilopiranosas (Herrmann *et al.*, 1997). Las β -xilosidasas han sido purificadas y caracterizadas bioquímicamente a partir de muchos géneros bacterianos y fúngicos. De acuerdo a su secuencia de aminoácidos, las XYLO se han clasificado dentro de las familias de GH3, 39, 43, 52, 30, 116 y 120 (<http://www.cazy.org/>). La mayoría de las

β -xilosidasas de hongos pertenecen a la familia GH43, una característica estructural común de las XYLO de la familia GH43 es un dominio de cinco hélices con topología β -propeller que comprende de un ácido catalítico y una base catalítica. Estas enzimas son activas en un amplio rango de pH que va de 2.0 a 9.5 y temperaturas desde 30 hasta a 80°C, teniendo una mayor actividad a 60°C (Juturu and Wu, 2012; Kousar, 2013). En 2004 se reportó una producción muy alta de β -xilosidasa en el hongo *Scytalidium thermophilum* cuando se creció en cultivos con xilana como fuente de carbono (Zanoelo *et al.*, 2004). Tres años más tarde se identificaron nuevas actividades de enzimas degradadoras de xilana en *Aspergillus* spp. Pero se enfocó en las cepas que producen actividad β -xilosidasa (Pedersen *et al.*, 2007).

Endo- β -1,4-xilanasa

Estas enzimas son responsables de la despolimerización de la xilana en la pared celular vegetal (Collins, Gerday and Feller, 2005). La endo- β -1,4-xilanasa (EC. 3.2.1.8) es una enzima capaz de hidrolizar los enlaces β -1,4 glicosídicos en la cadena principal de xilana, liberando xilo-oligómeros (Conejo Saucedo, 2011). Las endo- β -1,4-xilanasas se encuentran en las familias GH 5, 7, 8, 10, 11, 26 y 43 (<http://www.cazy.org/>)(Juturu and Wu, 2012). Las enzimas de la familia GH10 son enzimas organizadas estructuralmente por un dominio de unión a celulosa y un dominio catalítico conectados por un péptido de unión, adoptando una topología de barril TIM (β/α)₈. Por otra parte, las endo- β -1,4-xilanasas de la familia GH11 presentan una topología β -jellyroll (Juturu and Wu, 2012) y debido a su tamaño relativamente pequeño, pueden pasar a través de los poros de la red de hemicelulosa y llevar a cabo una hidrólisis eficiente. Estas enzimas se consideran exclusivamente activas en sustratos que contienen D-xilosa (Collins, Gerday and Feller, 2005).

Debido a la importancia de las xilanasas en la despolimerización de las hemicelulosas, se cuenta con varias proteínas cristalizadas a partir de hongos y bacterias (<http://www.cazy.org/>). Las endo- β -1,4-xilanasas tienen un peso molecular de 7-60 kDa y generalmente son más activas a pH 3.5-6.0 y temperatura de 40-60°C (Milagres, Magalhães and Ferraz, 2005). En el 2007, se reportó el uso potencial de algunos residuos agropecuarios y se usaron como fuentes de carbono bagazo de caña, aserrín y salvado de trigo para la producción de xilanasa por la cepa ANL301 de *A. niger*. En cultivos con salvado de trigo se obtuvo el nivel más alto de actividad xilanasa, concluyendo que el uso de agro-residuos en la producción de enzimas tales como las xilanasas disminuirá su costo de producción y al mismo tiempo reducirá la contaminación ambiental debida a estos desechos

(Okafor *et al.*, 2007). Por último, se determinó que la xilanasa secretada por el patógeno *Fusarium oxysporum*, se induce en presencia de pared celular de tallo y raíz de clavel (Martínez *et al.*, 2012).

Celobiohidrolasa

La celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91) es la exoglucanasa más estudiada y es aproximadamente el 70% de las celulasas secretadas por hongos celulolíticos (Teeri, 1997; Annamalai, 2016). Son producidas por bacterias y hongos. De acuerdo a su estructura molecular y características bioquímicas dentro de la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org/>), se clasifican dentro de la familia de las glicosil hidrolasas (GH) y pertenecen a las familias 5, 6, 7, 9, 48 y 74. Las CBH actúan en los extremos de las cadenas de la celulosa dando como resultado la liberación de glucosa y celobiosa. Se clasifican en CBH I y CBHII, y trabajan de forma procesiva en los extremos reductores o no reductores de la cadena de celulosa, respectivamente. (Annamalai, 2016).

Aplicaciones biotecnológicas

La biomasa lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa y lignina) posee un amplio potencial en diversos campos, por ejemplo, en la producción de químicos y biocombustibles (Isikgor and Becer, 2015). Particularmente la utilización de residuos lignocelulósicos producidos en la silvicultura, producción de celulosa y papel y la agricultura se está volviendo cada vez más interesante (Conejo Saucedo, 2011).

La importancia de las enzimas degradadoras de lignocelulosa está bien definida debido a su papel en muchos procesos industriales y biotecnológicos. Esto dio como resultado el restablecimiento de una nueva era para la utilización eficiente de los materiales de residuos agrícolas baratos. Por lo anterior, las hemicelulasas poseen un potencial biotecnológico muy importante, en la industria de la pulpa y el papel. Por ejemplo, el concepto de blanqueo asistido por enzimas se basó en la realización de hidrólisis limitada de hemicelulosas en pulpas, principalmente xilanasas, aumentando la extracción de lignina de las pastas kraft (Suurnäkki *et al.*, 1997). Adicionalmente, las endo- β -1,4-xilanasas se utilizan en procesos de sacarificación de xilana a xilosa, licuefacción de mucílago de café, fabricación de masa en panadería, recuperación de aceites de minas subterráneas, extracción de pigmentos y aceites vegetales, así como la producción de ensilado (Juturu and Wu, 2012).

Por otro lado, al ser las β -xilosidasas enzimas clave en el sistema xilanolítico, también se han utilizado biotecnológicamente en procesos como la maceración de verduras, preparación de productos horneados y pigmentos de alto contenido de fibras, condimentos, extractos de aceites vegetales y almidón, industrias para detergente, así como la producción de polisacáridos farmacológicamente activos para ser utilizados como agentes antimicrobianos o antioxidantes (Knob, 2010).

En el caso de las celulasas sus aplicaciones biotecnológicas son implicadas en la industria textil, en la industria de detergentes, producción de diversos alimentos de consumo animal y en biorefinería (Juturu and Wu, 2014). En la última década se ha desarrollado investigación de nuevas fuentes a partir de desechos lignocelulolíticos y la producción no solo de fuentes alternas de combustibles, sino también de productos de uso y consumo humano (Conejo Saucedo, 2011).

3.JUSTIFICACIÓN

C. lindemuthianum es un hongo fitopatógeno que afecta cultivos de frijol (*P. vulgaris*), y posee la peculiaridad de presentar una gran diversidad patotípica (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2006). Durante el proceso de nutrición/infección de *C. lindemuthianum* se produce un conjunto de enzimas que actúan coordinadamente para la degradación de la pared celular vegetal (Perfect, 1999), las cuales son cruciales para el establecimiento de la infección y que adicionalmente poseen un potencial biotecnológico muy importante.

Considerando el potencial biotecnológico en la degradación y productos de sustratos complejos naturales como el lirio acuático, bagazo de caña, ejote e hipocotilos de frijol, es importante realizar un análisis de los niveles de actividad enzimática de las hemicelulasas y celulasa de *C. lindemuthianum*.

Adicionalmente, ya que se ha observado que los genes de pectin liasa, xilanasa, arabinofranosidasa, galactanasa y β -xilosidasa se expresan de manera diferencial en las dos razas de *C. lindemuthianum* con diferente estilo de vida (patógena 1472 y no patógena 0), es importante conocer si existe una eficiencia diferencial en la degradación de hemicelulosa y celulosa.

4. Hipótesis

Colletotrichum lindemuthianum presenta una secreción diferencial de hemicelulasas y celulasas para la degradación de pared celular vegetal en dos razas con diferente estilo de vida.

5. Objetivos

General

Realizar el análisis de la actividad extracelular de hemicelulasas y celulasas en *Colletotrichum lindemuthianum*.

Específicos

1. Analizar el crecimiento micelial de *C. lindemuthianum* (raza 0 y 1472) en cultivos suplementados con lirio acuático, bagazo de caña, ejote e hipocotilos de frijol.
2. Evaluar la actividad enzimática de xilanasa, arabinofuranosidasa y celobiohidrolasa secretadas por las razas 1472 y 0 de *C. lindemuthianum* en cultivos con lirio acuático, bagazo de caña, ejote e hipocotílos de frijol.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron dos razas del hongo fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, la raza 0 (raza no patógena) y la raza 1472 (raza patógena) pertenecientes al cepario del Laboratorio de Estudios en Enzimas Líticas de Pared celular Vegetal del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

El micelio de *C. lindemuthianum* se mantuvo en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA), de acuerdo a French y Hebert (1982). Para los análisis de crecimiento en placa se preparó medios Hipocótilo-Agar, Lirio-Agar, Ejote-Agar y Caña-Agar. Para los ensayos de inducción de actividad enzimática de hemicelulasas se utilizó medio mínimo Mathur modificado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.72 g de KH_2PO_4 , 5.28 g de ácido L-glutámico) suplementado con 2.5 % de glucosa (BD, Bioxon), o lirio acuático (seco y molido), o hipocotilos de frijol (molidos), o bagazo de caña (molido en licuadora), o ejote (molido) como fuente de carbono.

Medios de cultivo

Medio Papa-Dextrosa agar (PDA)

El micelio de *C. lindemuthianum* se mantuvo en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA), de acuerdo a French y Hebert (1982), el cual se preparó de la siguiente manera: se utilizaron 250 gramos de papas frescas de aspecto saludable cortadas en cubos pequeños, se cocieron en un matraz Erlenmeyer de un litro con 500 ml de agua destilada (H_2O_d), se filtró con gasa y se agregaron 15 gramos de dextrosa y 20 gramos de agar bacteriológico previamente disueltos en 100 ml (H_2O_d). Por último, se aforó a un litro y se esterilizó en un matraz Erlenmeyer de dos litros en olla de presión (Presto modelo 79291 (2L) por 15 minutos a 15 libras de presión. Finalmente, el medio se distribuyó en cajas de Petri (100 x 20 mm) con 25 ml cada una.

Medio lirio-agar

Para las placas de Lirio-Agar se agregó lirio acuático seco y molido previamente al 2.5% y 20 g de agar bacteriológico en un litro de H_2O_d , se agitó suavemente y después se esterilizó en olla de presión como se describió antes. Se distribuyó en cajas de Petri (100 x 20 mm) con 25 ml cada caja.

Medio ejote-agar

Se agregaron 250g de ejotes frescos y molidos en licuadora y 20 g de agar bacteriológico a un litro de H₂O. Se realizó una esterilización en olla de presión como se describió antes y se distribuyó en cajas de Petri con 25 ml en cada caja.

Medio hipocótilo-agar

Se agregaron 250g de hipocótilos de frijol frescos y molidos en licuadora y 20 g de agar bacteriológico a un litro de H₂O. Se realizó una esterilización en olla de presión como se describió antes y se distribuyó en cajas de Petri con 25 ml en cada caja.

Medio bagazo de caña-agar

Se agregaron 250g de bagazo de caña molido en licuadora y 20 g de agar bacteriológico a un litro de H₂O. Se realizó una esterilización en olla de presión como se describió antes y se distribuyó en cajas de Petri con 25 ml en cada caja.

Medio mínimo Mathur modificado

El medio mínimo de Mathur modificado se preparó agregando 2.5 g de MgSO₄ • 7H₂O, 2.72 g de KH₂PO₄, 5.28 g de ácido L-glutámico y glucosa (BD, Bioxon), ejote (molido y fresco), lirio acuático (seco y molido), hipocótilos de frijol (frescos y molidos) y bagazo de caña (molido) al 2.5% como fuente de carbono en un litro de H₂O desionizada. Se ajustó el pH a 5.2 con NaOH 10 N (Potenciómetro: ORION 3 STAR pH Benchstop, Thermo scientific) y se aforó a un litro con agua desionizada. Finalmente se esterilizó en una olla de presión como se describió antes.

Cinéticas de crecimiento y actividad enzimática

Para evaluar el crecimiento en placa, se inoculó con una pieza de 5 mm de diámetro tomada de la periferia de micelio de *C. lindemuthianum* raza 1472 y 0 crecido en PDA, cada condición por triplicado. Se incubó a temperatura ambiente y se midió el crecimiento cada 24 horas.

Ensayos de actividad enzimática

Para la inducción de actividad enzimática se inocularon con cuatro piezas de 5 mm de diámetro tomadas de la periferia del micelio de *C. lindemuthianum* raza 0 y 1472 (crecidos en PDA a

temperatura ambiente durante 13 días), en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio Mathur suplementado con glucosa, lirio acuático, ejote, hipocótilos de frijol y bagazo de caña como fuente de carbono. Se mantuvieron en agitación constante (125 rpm) en una incubadora orbital (Thermo scientific modelo 4353) a 18 °C. Se determinó el peso húmedo, peso seco y la actividad enzimática cada 24 h por 12 días, posterior a los 12 días las mediciones se realizaron cada 48 horas (14 y 16 días). Cada condición se evaluó por triplicado.

Obtención de biomasa micelial

Para obtener el medio extracelular de la biomasa micelial, el medio de cultivo líquido se filtró a través de una unidad de filtración (Nalgene, Código 300-4050) empleando papel filtro Whatman (3 mm) acoplada a una bomba de vacío, el sobrenadante se mantuvo en hielo y posteriormente se utilizó para determinar la actividad enzimática y la concentración de proteína.

El peso húmedo del micelio se determinó pesando el papel filtro con el micelio y se le restó el peso de un papel filtro húmedo y el peso inicial de los cuatro inóculos. Posteriormente, se trasladó a una mufla (LAB-LINE instrumentos inc.) donde se dejó durante 24 horas; transcurrido este tiempo, se determinó peso seco.

Con el objetivo de eliminar contaminantes que pudieran interferir con la determinación de actividad enzimática, el medio extracelular libre de células fue sometido a filtración por columna de Bio-Gel P-6 de 10 ml equilibrada y eluída con acetato de sodio 50 mM, pH 5.0. Una vez descartado el volumen de exclusión, se colectaron cuatro fracciones de 1.5 ml y se mantuvieron en hielo.

Ensayo de actividad α -L-arabinofuranosidasa (ABF)

Para la reacción estándar para la determinación de la actividad α -L-arabinofuranosidasa se utilizó 40 μ l de buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5.0, 50 μ l de extracto filtrado por columna y 5 μ M de 4MU-arabinofuranósido (4MU-abf) en un volumen total de 100 μ l. Se incubó a 50°C por 45 minutos y la reacción se detuvo agregando 1 ml de Na₂CO₃ 0.5 M en NaOH 0.1 N, pH 10.4 (solución STOP), se centrifugaron las reacciones a 13000 rpm por 2 minutos y se transfirieron 200 μ l de la reacción a una microplaca oscura. Se determinó la fluorescencia a una λ de excitación de 350 nm y una emisión de 440 nm en un equipo Varioskan flash (Thermo Scienfic). La actividad enzimática se expresó como nM de 4MU liberados/minuto/ μ g de proteína.

Ensayo de actividad β -xilosidasa (XYLO)

En la determinación de actividad XYLO, se prepararon reacciones que contenían 43.75 μ l de buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5.0, 50 μ l de extracto filtrado y 25 μ M de 4MU-xilopiranosido (4MU-Xyp) en un volumen total de 100 μ l. Se incubó a 50°C por 60 minutos y se detuvo la reacción agregando 1 ml de solución STOP, se centrifugaron las reacciones a 13000 rpm por 2 minutos y se transfirieron 200 μ l de la reacción a una microplaca oscura. Finalmente se determinó la fluorescencia bajo las mismas condiciones descritas para la ABF. La actividad enzimática se expresó como nM de 4MU liberados/minuto/ μ g de proteína.

Ensayo de actividad endo- β -1,4-xilanasa (XYL)

Para evaluar la actividad XYL se prepararon reacciones que contenían 40 μ l de buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5.0, 50 μ l de medio extracelular filtrado y 2.8 mg de azul brillante de Remazol con xilana (RBB-xylan) en un volumen final de 100 μ l. Se incubó a 30°C durante 30 minutos y se detuvo la reacción agregando 200 μ l de etanol al 96%. Se transfirieron 200 μ l de la reacción a una microplaca transparente y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un equipo Varioskan flash (Thermo Scientific). La actividad XYL se expresó como mg/min/ μ g de proteína.

Ensayo de actividad celobiohidrolasa (CBH)

Para la medición de la actividad celobiohidrolasa, se prepararon reacciones que contenían 40 μ l de Buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5.0, 50 μ l de extracto filtrado y 10 μ l de 4MU-D-celobiósido con un volumen final de 100 μ l, posteriormente se incubó a 50°C por 60 minutos (Thermomix). La reacción se detuvo agregando 1 ml de solución STOP y se transfirieron 200 μ l de la reacción en una microplaca oscura para determinar la fluorescencia a una λ de excitación de 350 nm y una emisión de 440 nm en un equipo Varioskan flash (Thermo Scientific). La actividad enzimática se expresó como nM de 4MU liberados/minuto/ μ g de proteína.

Cuantificación de proteína

Para la determinación de proteína se utilizó el método de Bradford (Bradford, Thermo Scientific). En una microplaca transparente se mezclaron 150 μ l de Coomassie Reagent, se incubó por 10

minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una λ 595 nm en un equipo Varioskan flash (Thermo Scientific).

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos en cada una de las pruebas realizadas tanto en el crecimiento de placa y el peso seco, también se realizó en los datos obtenidos en las actividades enzimáticas de ABF, XYL, XYLO y CBH. Se utilizó la prueba t para medias de dos muestras emparejadas con $P < 0.05$ en Excel. Se realizó un ANOVA usando un diseño factorial 2 x 5 (dos razas y cinco sustratos) en cada punto de tiempo. Los valores medidos de la actividad enzimática de *C. lindemuthianum* con cada sustrato y la cantidad de proteína se agruparon y compararon mediante la prueba de Tukey; estos análisis se realizaron con el software JMP 15.

7. RESULTADOS

Crecimiento en placa de *C. lindemuthianum* en lirio acuático, ejote, hipocótilos de frijol y bagazo de caña

Se evaluó el crecimiento micelial en placa de la raza 0 y la raza 1472 de *C. lindemuthianum* en medio preparado con hipocótilos de frijol molidos, lirio acuático molido, ejote molido y bagazo de caña molido al 2.5% respectivamente, mezclados con agar bacteriológico.

En el medio con hipocótilos de frijol-agar (Figura 5A), se observó un crecimiento constante y gradual en la raza 0 hasta el día 20, alcanzando ocho centímetros de diámetro. El crecimiento micelial de la raza 1472 fue similar al de la raza 0 en los primeros días, sin embargo, a partir del sexto día la raza 1472 presentó un crecimiento significativamente mayor que la raza 0.

En placas con ejote-agar (Fig. 5B), ambas razas mostraron el mismo patrón de crecimiento, aunque hacia el sexto día el crecimiento de la raza 0 fue menor. Sin embargo, no se observó diferencia estadística significativa en los valores de crecimiento entre ambas razas.

En placas de lirio-agar (Fig. 5C), se detectó un crecimiento continuo en ambas razas. Sin embargo, la raza 1472 presentó un crecimiento significativamente mayor a partir del quinto día, alcanzando su máximo crecimiento (9 cm) el día 17, mientras que la raza 0 alcanzó su crecimiento máximo (9 cm) el día 18.

En placas de bagazo de caña-agar no se observó crecimiento de *C. lindemuthianum*, por lo que en lugar de agua se prepararon con medio Mathur (0.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.72 g de KH_2PO_4 , 5.28 g de ácido L-glutámico), para aportar una fuente nitrógeno. En placas de bagazo de caña-agar-Mathur (Fig. 5D), se observó que en la raza 1472 el crecimiento fue continuo pero lento, incrementando a partir del día 8. Sin embargo, el crecimiento se detuvo al llegar al día 16, alcanzando un valor máximo de 6.1 cm de diámetro. Por otro lado, el crecimiento de la raza 0 fue continuo y más rápido que la raza patógena, fue posible detectar el crecimiento máximo el día 15 con un valor de 6.4 cm de diámetro. A pesar de esto, no se observó diferencia estadística en el crecimiento entre ambas razas.

Finalmente, en el medio PDA (Fig. 5E), se observó un crecimiento gradual en la raza 0 los primeros 10 días; a partir del día 11 presentó un crecimiento significativamente mayor, alcanzando su máximo crecimiento el día 19, mientras que la raza 1472 alcanzó su máximo crecimiento hasta el día 21 con un valor de 8 cm de diámetro.

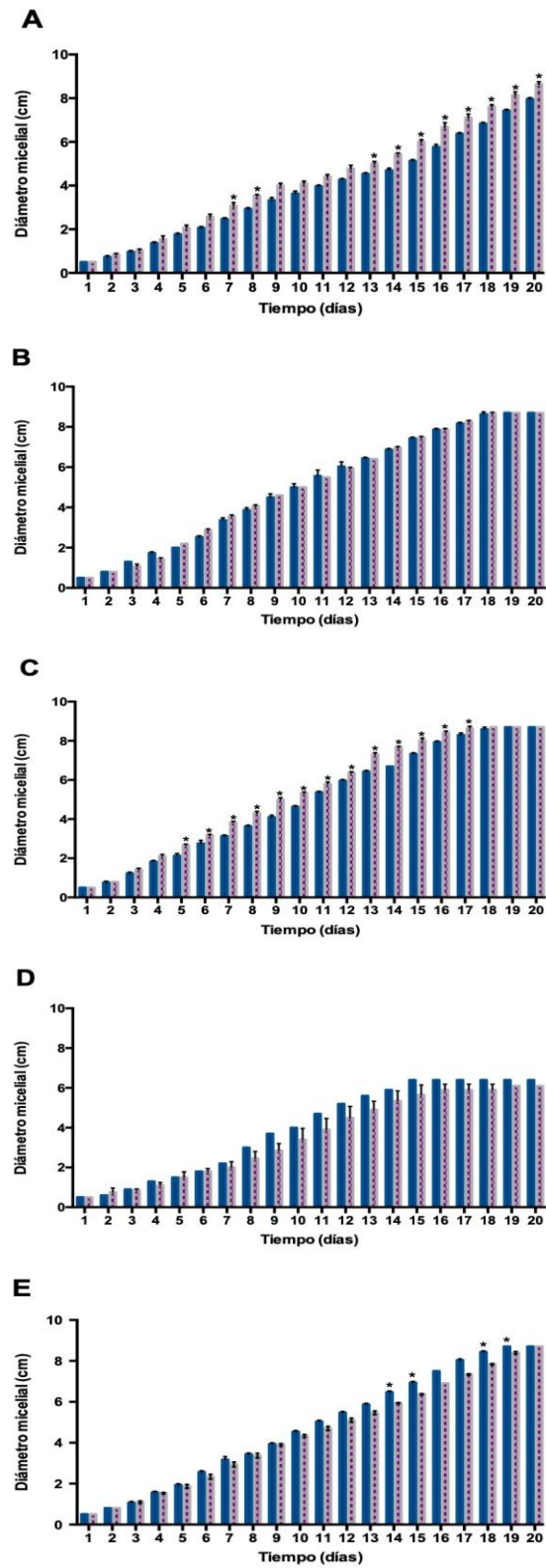


Figura 5. Crecimiento en placa de la raza 0 (■) y la raza 1472 (■) de *C. lindemuthianum* en diferentes sustratos naturales. **A)** Hipocótilos de frijol, **B)** Ejote-Agar, **C)** Lirio acuático- Agar, **D)** Bagazo de caña agar-Mathur y **E)** PDA. El símbolo “*” indica la diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre razas.

Crecimiento en medio líquido

Peso seco

Los resultados obtenidos en la determinación de biomasa micelial expresada en mg de peso seco se observan en la figura 6. En cultivos enriquecidos con hipocótilos de frijol (Fig. 6A) se observó un crecimiento semejante entre ambas razas de *C. lindemuthianum* que fue gradual después del quinto día de incubación hasta alcanzar su máximo crecimiento después de 16 días de incubación (280 mg de peso seco en la raza 0 y 256.6666 mg de peso seco en la raza 1472).

El patrón de crecimiento micelial observado en los cultivos con ejote (Fig. 6B) fue irregular con aumentos y disminuciones en ambas razas de *C. lindemuthianum*. Sin embargo, la raza 0 mostró su máxima producción de biomasa micelial (339.7 mg de peso seco) después de 3 días de incubación, de igual manera la raza 1472 presentó un máximo de biomasa (316.3666 mg de peso seco) hacia los 3 días de incubación.

En los cultivos suplementados con lirio acuático (Fig. 6C), se observó un crecimiento irregular en ambas razas de *C. lindemuthianum*. Sin embargo, en la raza 0 se observó un máximo crecimiento después del noveno día de incubación (641.9 mg de peso seco). La raza 1472 obtuvo su máximo valor después de 16 días de incubación (820.7 mg de peso seco).

En los cultivos enriquecidos con bagazo de caña en medio Mathur (Fig. 6D), ambas razas mostraron una producción de biomasa micelial similar, con un máximo de crecimiento después de 14 días de incubación; 147.85 mg de peso seco para la raza 0, y 137.63 mg de peso seco para la raza 1472.

En cultivos suplementados con glucosa (Fig. 6E) ambos hongos mostraron los niveles más bajos de crecimiento en comparación con las otras fuentes de carbono utilizadas. La raza 0 presentó su máxima producción de biomasa micelial hacia el día 12 de inducción (118 mg de peso seco) y la raza 1472 en el día 7 (53.4 mg de peso seco).

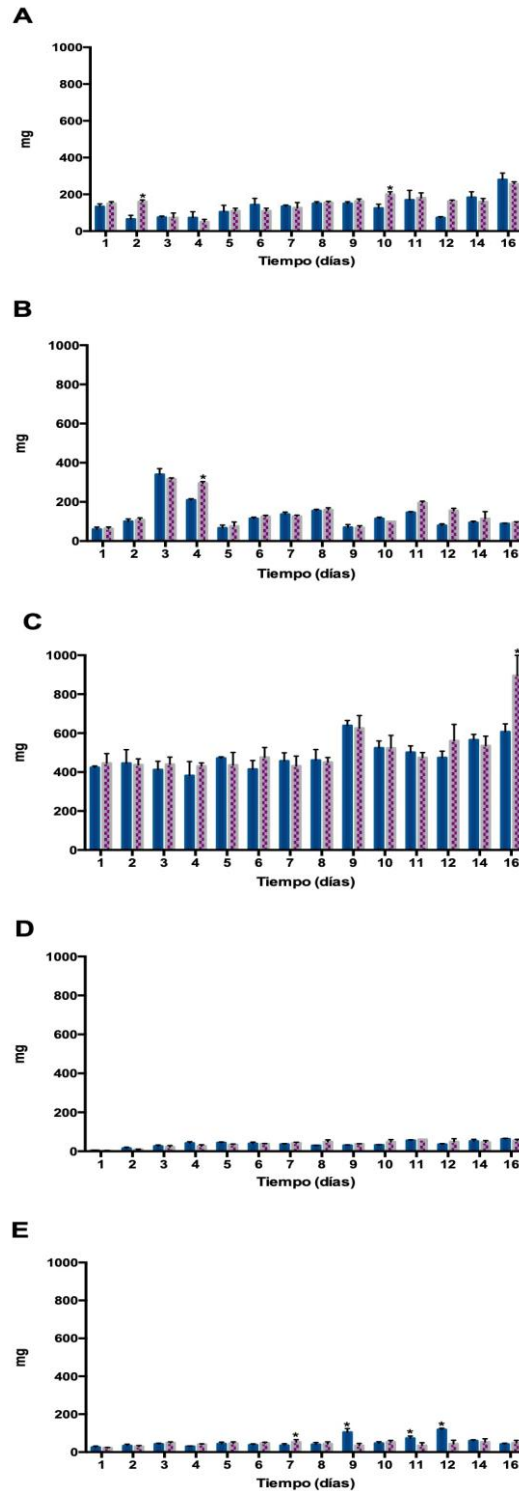


Figura 6. Biomasa micelial de la raza 0 (■) y la raza 1472 (■) de *C. lindemuthianum* en medio mínimo Mathur modificado, suplementado con diferentes fuentes de carbono. **A)** Hipocótilos de frijol, **B)** Ejote, **C)** Lirio acuático, **D)** Bagazo de caña y **E)** Glucosa. El crecimiento está expresado en mg de peso seco. Las barras muestran la media de los valores de crecimiento por triplicado + la desviación estándar. El símbolo “*” indica la diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre ambas razas.

Actividad extracelular de α -L-arabinofuranosidasa

En los resultados obtenidos en cultivos suplementados con hipocótilos de frijol (Fig. 7A), la raza 0 mostró un pico máximo de actividad α -L-arabinofuranosidasa (ABF) después de 4 días de incubación (27.5786 nM/min/ μ g de proteína). Posteriormente, se observó una drástica disminución de la actividad ABF que continuó hasta los 16 días de incubación. En la raza 1472 (Fig. 7B), los primeros días fue similar a la raza 0 y obtuvo su máximo valor hacia los 5 días de incubación (21.7313 nM/min/ μ g de proteína). En seguida, la actividad fue disminuyendo hasta el día 16 de inducción.

En los cultivos suplementados con ejote (Fig. 7), en ambas razas del hongo se presentó un aumento de la actividad ABF que fue mayor en la raza 0 (Fig. 7A) (35.5983 nM/min/ μ g de proteína), que en la raza 1472 (Fig. 7B) (32.9733 nM/min/ μ g de proteína). Posteriormente, la actividad disminuyó, sin embargo, la raza 1472 presentó un segundo pico en el día 5 de inducción (24.7086 nM/min/ μ g de proteína).

Por otro lado, en cultivos suplementados con lirio acuático (Fig. 7A), la raza 0 mostró el mayor incremento de actividad ABF después de 4 días (16.2035 nM/min/ μ g de proteína). A partir del quinto día se observó un descenso de actividad y un nuevo incremento hacia los 16 días (7.0880 nM/min/ μ g de proteína). La raza 1472 (Fig. 7B) presentó dos picos de actividad después de 4 y 6 días de incubación (46.1266 nM/min/ μ g de proteína y 15.3678 nM/min/ μ g de proteína respectivamente).

En los cultivos suplementados con bagazo de caña, la raza 0 (Fig. 7A) presentó niveles basales de actividad específica obteniendo un valor máximo de 6.7440 nM/min/ μ g de proteína en el primer día de inducción. Por otro lado, la raza 1472 (Fig. 7B) presentó un pico de actividad en los 3 días de incubación (15.6278 nM/min/ μ g de proteína), seguido por una disminución de actividad con valores basales hasta el último día de la cinética.

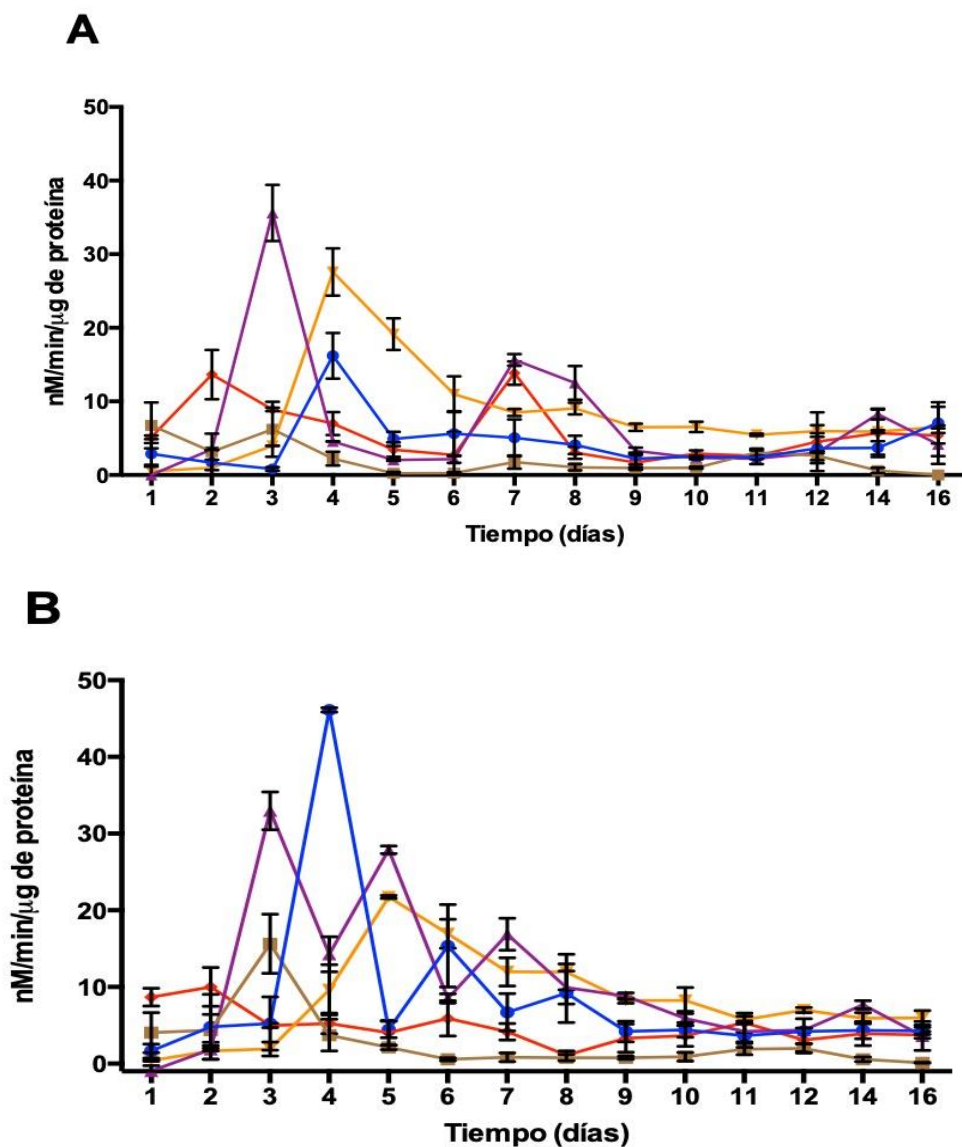


Figura 7. Actividad enzimática de α -L-arabinofuranosidasa. **A)** Raza 0 y **B)** raza 1472 de *C. lindemuthianum* crecidas en diferentes fuentes de carbono. Hipocótilos de frijol (▼), Ejote (▲), lirio acuático (●), Bagazo de caña (■) y Glucosa (◆). El crecimiento esta expresado en mg de peso seco. Las barras muestran la media de los valores de crecimiento por triplicado+ la desviación estándar. ($P < 0.05$).

En los cultivos suplementados con glucosa, se presentaron los niveles más bajos de actividad ABF. Sin embargo, la raza 0 (Fig. 7A) presentó en los primeros días mayor actividad en comparación con la raza 1472, con un máximo valor a los 7 días de incubación (13.8482 nM/min/ μ g de proteína). La raza 1472 (Fig. 7B), mostró su mayor actividad en los dos días de incubación (9.9981 nM/min/ μ g de proteína), después la actividad disminuyó y se mantuvo en niveles muy bajos.

Actividad extracelular de β -xilosidasa

Cuando se utilizó cultivos suplementados con hipocótilos de frijol, la raza 0 (Fig. 8A) mostró su mayor pico de actividad de β -xilosidasa (XYLO) en el segundo día de inducción (35.6325 nM/min/ μ g de proteína), y posteriormente mostró niveles basales. Por otro lado, la raza 1472 (Fig. 8B) presentó niveles de actividad enzimática inferiores a los de la raza 0, con un pico de actividad hacia los 3 días (8.9793 nM/min/ μ g de proteína) y un segundo pico después de 14 días de incubación (9.1215 nM/min/ μ g de proteína).

En los cultivos suplementados con ejote (Fig. 8A), en la raza 0 se observó una baja producción de actividad XYLO en los primeros seis días de incubación, con un incremento entre los 7 y 8 días (12.4655 nM/min/ μ g de proteína y 13.3716 nM/min/ μ g de proteína, respectivamente) y un pico máximo de actividad después de 14 días de incubación (21.6516 nM/min/ μ g de proteína). Por otra parte, la raza 1472 (Fig. 8B) presentó una producción progresiva que alcanzó un máximo hacia los 8 días de incubación (10.1546 nM/min/ μ g de proteína), con un ligero descenso de la hacia los 11 días, y un pico máximo después de 14 días de incubación (13.5044 nM/min/ μ g de proteína).

En los cultivos suplementados con lirio acuático (Fig. 8A), la raza 0 mostró niveles basales de actividad XYLO en los primeros cinco días de incubación. Sin embargo, se detectaron dos picos de actividad después de los 6 y 12 de incubación (31.1769 nM/min/ μ g de proteína y 34.4358 nM/min/ μ g de proteína respectivamente). Por el contrario, en la raza 1472 (Fig. 8B) en los primeros 4 días se observaron niveles de actividad XYLO ligeramente mayores en comparación con la raza 0. Posteriormente, se detectaron tres picos de actividad a los 6, 8 y 16 días de incubación, destacando el máximo nivel de actividad XYLO detectado en este estudio después de 8 días de incubación (57.0891 nM/min/ μ g de proteína).

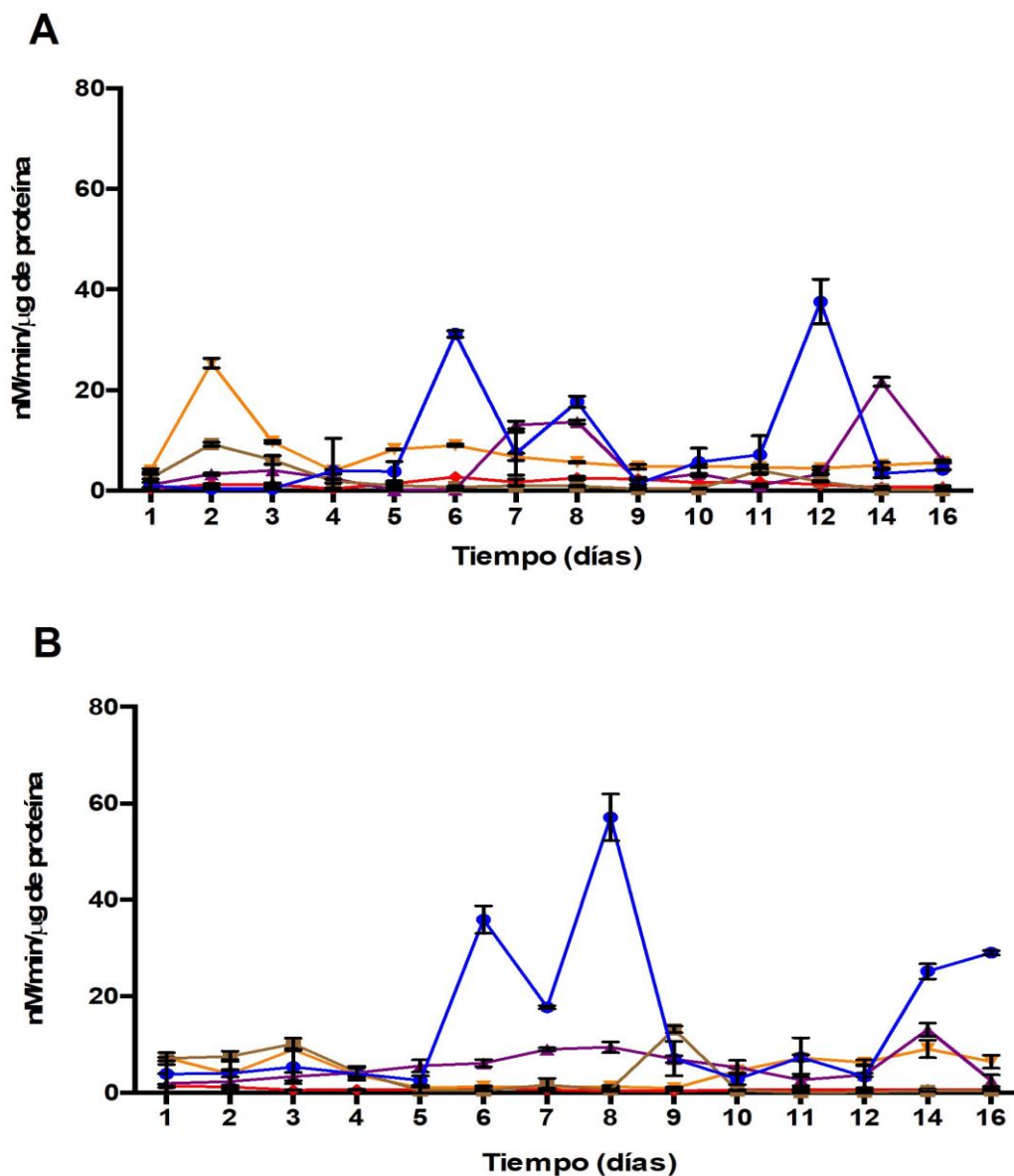


Figura 8. Actividad enzimática de β -xilosidasa. **A)** Raza 0 y **B)** Raza 1472 de *C. lindemuthianum* crecidas en diferentes fuentes de carbono. Hipocótilos de frijol (▼), Ejote (▲), lirio acuático (●), Bagazo de caña (■) y Glucosa (◆). El crecimiento esta expresado en mg de peso seco. Las barras muestran la media de los valores de crecimiento por triplicado+ la desviación estándar. ($P < 0.05$).

Cuando se utilizó bagazo de caña como fuente de carbono, la raza 0 (Fig. 8A) mostró un pico máximo en el segundo día de inducción (9.2350 nM/min/ μ g de proteína), enseguida presentó niveles muy bajos de actividad XYLO por debajo de los valores de actividad basal. La raza 1472

(Fig. 7B) presentó dos picos máximos en los días 3 y 9 de inducción 10.1587 nM/min/ μ g de proteína y 13.1667 nM/min/ μ g de proteína respectivamente.

Finalmente, en cultivos suplementados con glucosa se observaron niveles muy bajos de actividad específica de β -xilosidasa en ambas razas de *C. lindemuthianum*. En la raza 0 (Fig. 8A), la actividad máxima se presentó en el día 8 de inducción (2.4982 nM/min/ μ g de proteína). La raza 1472 (Fig. 8B) mostró un ligero incremento después del primer día de inducción (1.6342 nM/min/ μ g de proteína).

Actividad extracelular de endo- β -1,4-xilanasa

En la figura 9 se muestran los resultados de los cultivos suplementados con hipocótilos de frijol. En la raza 0, se observaron valores altos de actividad específica en el segundo día de incubación (73.6141 nM/min/ μ g de proteína). Posteriormente, ocurrió una disminución de la actividad específica hasta llegar a niveles basales hacia los 6 días, que se mantuvieron hasta el último día de incubación. La raza 1472 (Fig. 9B) presentó un incremento de actividad en los días 6, 7 y 8 de inducción obteniendo un valor máximo de 26.4433 mg/min/ μ g de proteína (día 7 de inducción). La actividad disminuyó después de 8 días y se mantuvo constante hasta el último día de inducción. Cuando se utilizó cultivos suplementados con ejote (Fig. 9A), la raza 0 mostró un pico máximo de actividad xilanasa hacia el quinto día de incubación (41.8220 nM/min/ μ g de proteína). Posteriormente, similar a lo observado en cultivo con hipocótilos, los niveles de actividad disminuyeron hasta niveles basales entre los 6 y 16 días de incubación, sin embargo, hacia el día 9 hubo otro pico de actividad (19.9054 nM/min/ μ g de proteína). De manera similar, pero en el segundo día de incubación, la raza 1472 (Fig. 9B) presentó un pico máximo de actividad (32.4286 nM/min/ μ g de proteína). A partir del tercer día se observó una drástica disminución de la actividad específica similar a los valores de actividad basal.

En los cultivos con lirio acuático (Fig. 9A), en la raza 0 se observaron niveles bajos de actividad en los primeros días de incubación y después de 4 días se detectó un pico de actividad (36.3205 nM/min/ μ g de proteína). Posteriormente, después de 6 días de incubación se detectó un segundo pico de actividad máxima (101.929 nM/min/ μ g de proteína).

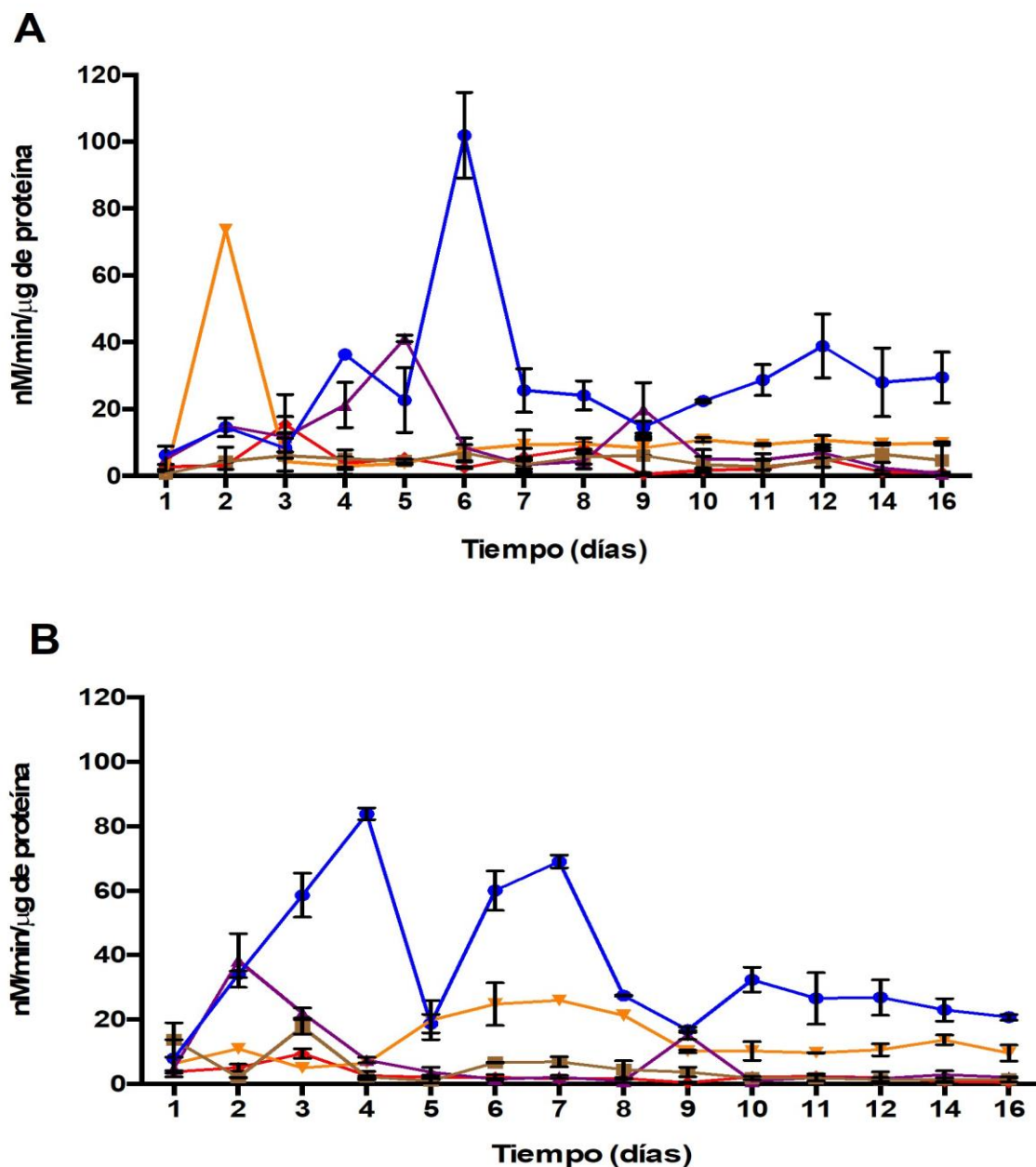


Figura 9. Actividad enzimática de β -endoxilanasas. **A)** Raza no patógena (0) y **B)** Raza patógena (1472) de *C. lindemuthianum* incubadas en diferentes fuentes de carbono. Hipocótilos de frijol (▼), Ejote (▲), lirio acuático (●), Bagazo de caña (■) y Glucosa (◆). El crecimiento esta expresado en mg de peso seco. Las barras muestran la media de los valores de crecimiento por triplicado+ la desviación estándar. ($P < 0.05$).

La raza 1472 (Fig. 9B), mostró un incremento en los primeros 4 días de inducción obteniendo el pico máximo (82.5529 nM/min/ μ g de proteína). Después de 7 días de inducción, se presentó un pico máximo de actividad (69.0638 nM/min/ μ g de proteína).

En cultivos con bagazo de caña (Fig. 9A), la raza 0 mostró niveles muy bajos de actividad similares a la actividad basal. La raza 1472 (Fig. 9B) al igual que la raza no patógena presentó niveles muy bajos de actividad, sin embargo, en el primer día de inducción obtuvo su máximo valor de actividad (9.8569 nM/min/ μ g de proteína).

En los cultivos suplementados con glucosa como fuente de carbono, se observaron niveles basales de actividad xilanasa para las dos razas del hongo. Los niveles máximos obtenidos fueron 15.3459 nM/min/ μ g de proteína para la raza no patógena (Fig. 9A) y 9.4702 nM/min/ μ g de proteína en la raza patógena (Fig. 9B).

Actividad celobiohidrolasa

En cultivos suplementados con hipocótilos de frijol (Fig. 10A), la raza 0 mostró altos niveles de actividad de celobiohidrolasa (CBH) en los primeros dos días (25.3652 nM/min/ μ g de proteína). Después, se observó una disminución drástica de la actividad hacia los 4 días de incubación con un ligero incremento hacia los 6 días que se mantuvo constante hasta el final del ensayo. En la raza 1472 (Fig. 10B), se detectó un pico máximo de actividad después de 3 días de incubación (20.8988 nM/min/ μ g de proteína), seguido por una disminución de la actividad en los siguientes días.

En los cultivos suplementados con ejote, se observó que ambas razas presentaron varios picos de actividad con un máximo después de 2 días para la raza 0 (Fig. 10A), y 2 y 5 días para la raza 1472 (Fig. 10B) (35.5129 nM/min/ μ g de proteína, 14.6343 nM/min/ μ g de proteína y 13.6024 nM/min/ μ g de proteína, respectivamente). La raza 0 presentó otros tres picos de actividad hacia los 7, 8 y 14 días de incubación (10.9118 nM/min/ μ g de proteína, 11.4019 nM/min/ μ g de proteína y 5.8660 nM/min/ μ g de proteína, respectivamente). La raza 1472, presentó dos picos de actividad hacia los 7 y 14 días de incubación (11.7332 nM/min/ μ g de proteína y 5.7186 nM/min/ μ g de proteína).

En los cultivos suplementados con lirio acuático (Fig. 10) ambas razas mostraron niveles basales de actividad CBH durante los primeros tres días. Posteriormente, la raza 0 (Fig. 10A) presentó un pico máximo de actividad hacia el cuarto día de incubación (18.7144 nM/min/ μ g de proteína) y un segundo pico de actividad hacia los 7 días de incubación (11.8861 nM/min/ μ g de proteína). En la raza 1472 (Fig. 10B) se presentaron dos picos máximos de actividad CBH después de los días 6 y 8 de inducción (38.7430 nM/min/ μ g de proteína y 41.2503 nM/min/ μ g de proteína, respectivamente).

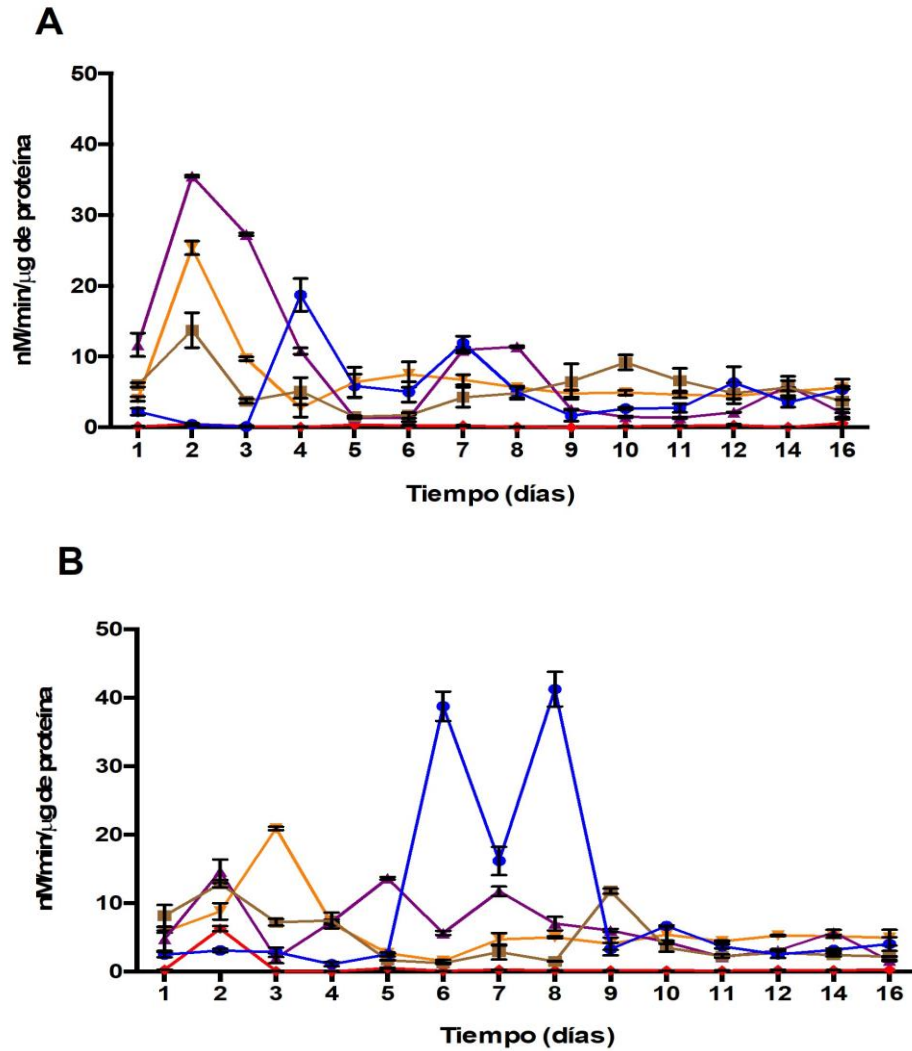


Figura 10. Actividad enzimática de celobiohidrolasas. **A)** Raza no patógena (0) y **B)** raza patógena (1472) de *C. lindemuthianum* incubadas en diferentes fuentes de carbono. Hipocótilos de frijol (▼), Ejote (▲), lirio acuático (●), Bagazo de caña (■) y Glucosa (◆). El crecimiento esta expresado en mg de peso seco. Las barras muestran la media de los valores de crecimiento por triplicado+ la desviación estándar. ($P < 0.05$).

En cultivos con bagazo de caña la raza 0 (Fig. 10A), mostró a los 2 días de incubación su pico máximo (13.7264 nM/min/μg de proteína), seguido por una disminución de la actividad hasta los 10 días de inducción donde se presentó un nuevo incremento de actividad (9.1701 nM/min/μg de proteína). La raza 1472 (Fig. 10B) también presentó dos picos de actividad después de 2 y 9 días de inducción (12.8435 nM/min/μg de proteína y 11.7657 nM/min/μg de proteína, respectivamente).

En los cultivos enriquecidos con glucosa, ambas razas de *C. lindemuthianum* mostraron niveles basales de actividad. La raza 0 (Fig. 10A) presentó un valor máximo de 0.3654 nM/min/ μ g de proteína, mientras que la raza 1472 (Fig. 10B) mostró un ligero incremento después del segundo día de inducción (6.2823 nM/min/ μ g de proteína).

Resultados de análisis estadísticos

A continuación, se muestran los resultados del análisis estadístico ANOVA de los datos de actividad enzimática de la α -L-arabinofuranosidasa (Tabla 1). A nivel de sustrato, se observa que hay diferencia significativa entre ejote, bagazo de caña, glucosa y lirio acuático, favoreciendo con la mejor actividad al ejote. También, se realizó un análisis de las razas contra los sustratos y los resultados indican que no hay diferencia significativa entre las dos razas de *C. lindemuthianum* en cultivo con glucosa. Para la raza 1472 no hay diferencia significativa entre el cultivo en hipocotilos de frijol y lirio acuático.

La tabla 2, los análisis de la actividad XYLO entre las dos razas de *C. lindemuthianum* no mostraron diferencia significativa, sin embargo, la comparación entre los sustratos mostró diferencia significativa entre el lirio acuático y el bagazo de caña, con mayor actividad enzimática en lirio acuático. El análisis entre hipocotilos de frijol y el bagazo de caña no mostró diferencia significativa, sin embargo, con bagazo de caña hubo una diferencia significativa.

Tabla 1. Análisis de ANOVA (factorial 2 x 5) de la actividad α -L-arabinofuranosidasa en las dos razas de *C. lindemuthianum* considerando razas y sustratos ($P < 0.05$).

	Sustrato	Media
Raza 0 ^A	Hipocotilos de frijol ^{AB}	8.3921 ^{AB}
	Ejote ^A	6.9606 ^{ABCD}
	Lirio acuático ^B	4.1901 ^{CDE}
	Bagazo de caña ^C	2.0548 ^E
	Glucosa ^B	6.0388 ^{BCDE}
Raza 1472 ^A	Hipocotilos de frijol ^{AB}	7.4571 ^{ABC}
	Ejote ^A	10.1408 ^A
	Lirio acuático ^B	7.3278 ^{ABC}
	Bagazo de caña ^C	2.9966 ^{DE}
	Glucosa ^B	5.0143 ^{BCDE}

La comparación de las razas con los sustratos, mostró una diferencia significativa entre el lirio acuático y la glucosa con la raza 1472 con una mejor actividad en lirio acuático. La raza 0 en ejote y la raza 1472 con hipocotilos de frijol y bagazo de caña no presentan diferencia estadística significativa. Adicionalmente, se encontró diferencia significativa entre hipocotilos de frijol, bagazo de caña y lirio acuático en la raza 0.

Tabla 2. Análisis de ANOVA (factorial 2 x 5) de la actividad β -xilosidasas en las dos razas de *C. lindemuthianum* considerando razas y sustratos ($P<0.05$).

	Sustrato	Media
Raza 0 ^A	Hipocotilos de frijol ^B	7.2865 ^{BC}
	Ejote ^{BC}	5.0324 ^{CDE}
	Lirio acuático ^A	11.2158 ^{AB}
	Bagazo de caña ^{CD}	2.1656 ^{DE}
	Glucosa ^D	0.7603 ^E
Raza 1472 ^A	Hipocotilos de frijol ^B	4.5941 ^{CDE}
	Ejote ^{BC}	5.4105 ^{CD}
	Lirio acuático ^A	12.8714 ^A
	Bagazo de caña ^{CD}	3.1270 ^{CDE}
	Glucosa ^D	0.7486 ^E

Los resultados de la actividad XYL (Tabla 3), no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre las dos razas de *C. lindemuthianum*. Entre los sustratos, se muestra que hay una diferencia estadísticamente significativa entre el lirio acuático donde se encontró la máxima actividad y el resto de los sustratos. Entre bagazo de caña, ejote, hipocotilos de frijol y glucosa, no hay diferencia significativa. Al realizar las pruebas cruzadas entre razas y sustratos las dos razas de *C. lindemuthianum* con lirio acuático presentan una diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de los sustratos analizados. Finalmente, entre ambas razas con hipocotilos de frijol, ejote, bagazo de caña y glucosa, no presentan diferencia significativa.

Tabla 3. Análisis de ANOVA (factorial 2 x 5) de la actividad endo- β -1,4-xilanasas en las dos razas de *C. lindemuthianum* considerando razas y sustratos ($P < 0.05$).

	Sustrato	Media
Raza 0 ^A	Hipocotilos de frijol ^B	6.8876 ^B
	Ejote ^B	9.8025 ^B
	Lirio acuático ^A	46.9114 ^A
	Bagazo de caña ^B	5.0384 ^B
	Glucosa ^B	4.1472 ^B
Raza 1472 ^A	Hipocotilos de frijol ^B	17.2574 ^B
	Ejote ^B	8.0856 ^B
	Lirio acuático ^A	44.6799 ^A
	Bagazo de caña ^B	6.5667 ^B
	Glucosa ^B	2.7290 ^B

Los resultados estadísticos obtenidos de la actividad CBH (Tabla 4), mostraron diferencia estadísticamente significativa entre la raza 0 y la raza 1472. A nivel de los sustratos, la actividad con glucosa tiene diferencia estadística significativa respecto a la actividad con los sustratos naturales. En la comparación entre sustratos y razas, la raza 0 en lirio acuático y ejote y la raza 1472 en hipocotilos de frijol presentan diferencia estadística significativa con la raza 1472 en lirio acuático. Entre la raza 0 y 1472 en hipocotilos de frijol, la raza 1472 en ejote y la raza 0 en bagazo de caña no hay diferencia estadística significativa.

Tabla 4. Análisis de ANOVA (factorial 2 x 5) de la actividad celobiohidrolasas en las dos razas de *C. lindemuthianum* considerando razas y sustratos ($P<0.05$).

	Sustrato	Media
Raza 0 ^B	Hipocotilos de frijol ^A	6.9146 ^{AB}
	Ejote ^A	4.5312 ^B
	Lirio acuático ^A	4.6799 ^B
	Bagazo de caña ^A	5.3514 ^{AB}
	Glucosa ^B	0.1863 ^C
Raza 1472 ^A	Hipocotilos de frijol ^A	6.1909 ^{AB}
	Ejote ^A	6.2053 ^{AB}
	Lirio acuático ^A	8.6836 ^A
	Bagazo de caña ^A	4.8506 ^B
	Glucosa ^B	0.5766 ^C

8. DISCUSIÓN

C. lindemuthianum es un hongo fitopatógeno que causa antracnosis en plantas de frijol (*P. vulgaris* L.) (O'Connell, Bailey and Richmond, 1985). Durante su proceso de infección, *C. lindemuthianum* secreta un conjunto de glicosil hidroalastas que degradan la pared celular vegetal, tales como las α -L-arabinofuranosidasas, las endo- β -1,4-xilanasas, y las β -xilosidasas, las cuales actúan sinérgicamente en la hidrólisis de arabinoxilanos, componentes importantes de la hemicelulosa (Saha, 2000; Münch, 2008; Scheller and Ulvskov, 2010).

El ejote de frijol (*P. vulgaris*), es utilizado de manera rutinaria en el laboratorio para la reactivación del crecimiento de las cepas de *C. lindemuthianum*, debido a que el cultivo por tiempo prolongado en PDA conduce a la pérdida en la capacidad de crecimiento. Este comportamiento sugiere que estos hongos parecen preferir para su crecimiento al sustrato natural representado por los ejotes e hipocotilos de frijol. Por otro lado, el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es una de las plantas acuáticas más invasoras a nivel mundial conocida por su efecto ecológico y socioeconómico (Villamagna, 2010). En los últimos años se ha buscado alternativas para su aprovechamiento y consecuentemente su disminución en los lagos y ríos. También, debido a su gran capacidad de biabsorción se ha utilizado como una técnica eficiente y muy económica de fitoremediación, en los cuerpos de aguas contaminados por cantidades muy altas de metales como cromo y cobre derivados de procesos industriales. Finalmente, el bagazo de caña es un residuo agro-industrial que contiene 50% de celulosa con un importante potencial biotecnológico y se ha utilizado como sustrato para el crecimiento de varios microorganismos como bacterias, hongos y levaduras (Pandey *et al.*, 2000). Para identificar los sustratos complejos en los cuales las razas 0 y 1472 de *C. lindemuthianum* crecen mejor, en este estudio se realizaron análisis de cinéticas de crecimiento en hipocotilos y ejotes de frijol, lirio acuático y bagazo de caña, en medios sólidos y líquidos.

En primera instancia, para determinar la suficiencia del sustrato natural en la aportación de la fuente de carbono y nitrógeno necesarios para el crecimiento en cultivo de dos hongos con diferente estilo de vida, el medio de cultivo en placa únicamente incluyó cada uno de los sustratos naturales elegidos, agua y agar. De acuerdo a los resultados, la diferencia entre ambas razas de *C. lindemuthianum* consistió en un crecimiento ligeramente más rápido (en particular la raza 1472) con lirio acuático y ejote, en comparación con hipocotilos y PDA (Fig. 4). Por el contrario, ambos hongos fueron incapaces de crecer en placas con bagazo de caña y agua, por lo que dada la naturaleza de la composición de este sustrato, rico en celulosa y lignina, se consideró adicionar una

fuelle de nitrógeno y sales para favorecer el crecimiento en placas con medio mínimo Mathur. Como resultado, ambos hongos mostraron un crecimiento micelial, que sin embargo fue más lento y menor comparado con los otros sustratos (Fig. 4). De manera general, en este análisis el lirio acuático molido y el ejote molido fueron los mejores sustratos aportando suficiente fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento micelial de *C. lindemuthianum*.

Por otro lado, también se evaluó la producción de biomasa micelial en peso seco de ambas razas de *C. lindemuthianum* en cultivo líquido de medio mínimo Mathur modificado, suplementado con hipocotilos de frijol molidos, ejote molido, lirio acuático molido, bagazo de caña molido y glucosa. De acuerdo a los resultados, el cultivo con hipocotilos de frijol no mostró diferencia significativa entre las dos razas (280 mg raza 0 y 256 mg raza 1472). En contraste, el cultivo en ejote permitió un crecimiento cercano a los 400 mg de peso seco y fue el segundo sustrato en donde hubo mayor producción de biomasa micelial de *C. lindemuthianum*, con diferencia significativa entre las dos razas favoreciendo a la raza 1472. Con base en estos resultados, se propone que la diferencia entre los hipocotilos y los ejotes de frijol como sustrato para el crecimiento, podría deberse a la proporción de hemicelulosa y pectina; los ejotes contienen mayor cantidad de pectina que los hipocotilos. Así que, es posible que la degradación de una mayor proporción de pectina, además de la hemicelulosa permita un mejor crecimiento para ambos hongos.

De manera notable, el cultivo de ambos hongos con lirio acuático mostró el mejor crecimiento, comparado con el resto de los sustratos probados. Sin embargo, la raza 1472 presentó mejor crecimiento micelial que la raza 0 (820.7 mg de peso seco vs 641.9 mg de peso seco, respectivamente). En contraste, el cultivo con bagazo de caña mostró una lenta producción de biomasa micelial en los primeros días de inducción y posteriormente presentó un ligero incremento sin diferencia significativa entre los dos hongos (147.85 mg de peso seco para la raza 0, y 137.63 mg para la raza 1472). Adicionalmente, los resultados de cultivo en bagazo de caña fueron similares o relativamente más bajos que los obtenidos en cultivos con glucosa como fuente carbono. Cabe destacar que el cultivo en glucosa presentó diferencia significativa entre las dos razas de *C. lindemuthianum*, favoreciendo a la raza no patógena (118 mg de peso seco para la raza 0 y 53.4 mg de peso seco para la raza 1472). Por mucho tiempo, se ha pensado que los hongos prefieren a la glucosa como fuente de carbono para su crecimiento, por ello entre los medios de cultivo tradicionalmente utilizados están el de papa-dextrosa y papa-dextrosa-agar. Sin embargo, en este estudio, los resultados indican que *C. lindemuthianum* no crece bien en glucosa o celulosa y que

prefiere sustratos complejos ricos en pectina y hemicelulosa, sugiriendo una especialización en actividad hemicelulolítica.

Previamente, se ha reportado que *C. lindemuthianum* secreta enzimas que degradan hemicelulosa, pectina, xilana y celulosa, en cultivos suplementados con paredes celulares vegetales (Anderson, 1978). Adicionalmente, se ha demostrado que secreta al medio endo-poligalacturonasa, α -L-arabinofuranosidasa y pectin liasas (Wijesundera *et al.*, 1989). Por otra parte, se reportó la actividad celulasa en la raza 1472 de *C. lindemuthianum* inducida con diferentes fuentes de carbono (Acosta-Rodríguez, *et al* 2005) y se ha comparado la producción extracelular de pectin liasa (PNL) y xilanasa (XYL) en las razas patógena y no patógena de *C. lindemuthinaum* en cultivos suplementados con diferentes sustratos (Hernández-Silva, 2007; Conejo-Saucedo *et al.*, 2016). Sin embargo, con excepción de paredes celulares de *P. vulgaris*, en la mayoría de los trabajos de *C. lindemuthianum* se han utilizado rutinariamente sustratos comerciales para la inducción de la actividad enzimática, por lo que se desconoce el perfil de producción enzimática bajo crecimiento en fuentes de carbono naturales. Entonces, considerando los resultados del crecimiento mostrado por las razas patógena y no patógena de *C. lindemuthianum* en este estudio, a continuación se reviso la actividad hemicelulolítica a través de la determinación de la actividad enzimática de endo- β -1,4-xilanasa, α -L-arabinofuranosidasa y β -xilosidasa, así como la actividad celulolítica con la determinación de la actividad de celobiohidrolasa, y se comparó la producción de las mismas en cultivo con glucosa y sustratos complejos naturales (hipocotilos de frijol, ejote, lirio acuático molido y bagazo de caña).

De manera general, en los cultivos con glucosa, la actividad enzimática mostró niveles basales para todas las enzimas, corroborando los resultados previamente reportados para ambas razas de *C. lindemuthianum* (Acosta-Rodríguez, *et al* 2005; Hernández-Silva, 2007; Conejo-Saucedo *et al.*, 2016). Estos niveles bajos de actividad enzimática en cultivos suplementados con glucosa se deben al proceso de represión catabólica, un mecanismo importante para suprimir la producción de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal durante el crecimiento de hongos en fuentes de carbono como la glucosa y la xilosa (Amore 2013). Por lo tanto, la actividad enzimática detectada en cultivos suplementados con glucosa, se le considera actividad basal, es decir, la producción de enzimas necesaria para el momento en que se cambie la fuente de carbono, y el hongo pueda comenzar a degradar un nuevo sustrato (Tani 2014). Previamente, se ha reportado que en otros hongos como *Aspergillus kawachii* y *Penicillium chrysogenum*, la expresión de genes que

codifican ABFs es reprimida en presencia de glucosa o sacarosa (Koseki et al. 2003; Sakamoto 2013).

Cuando se utilizaron hipocotilos como sustrato, la actividad enzimática secretada por ambas razas, mostró un incremento en la producción de todas las enzimas, ABF, XYL, XYLO, y CBH, congruente con el crecimiento observado, y explicable por la liberación de fuentes de carbono como la arabinosa, xilosa y celobiosa. Aunque existe un reporte previo sobre la actividad XYL producida por ambas razas de *C. lindemuthianum*, en cultivo con pared celular purificada de los hipocotilos de frijol, los datos no son comparables debido a la diferencia del método utilizado para calcular la actividad específica, sin embargo, ambas razas mostraron su máximo pico de actividad a los 12 días de incubación, pero la raza 1472 presentó mayor producción de actividad que la raza 0 (Conejo-Saucedo *et al.*, 2016). En este estudio, la raza 0 produjo altos niveles de XYL y XYLO más rápido que la raza 1472 en cultivo con hipocotilos, sin embargo, los análisis de ANOVA no mostraron diferencia significativa entre ambas razas.

Interesantemente, en cultivo con ejote de frijol, ambos hongos presentaron una rápida y alta producción de actividad ABF, niveles basales de XYLO, un incremento similar de la actividad XYL entre ambas razas (aunque no el mejor nivel y fué más rápido en la raza patógena), y un rápido incremento en la actividad CBH, que fue tres veces mayor en la raza 0 que en la 1472. Por otro lado, los análisis ANOVA de los datos de actividad enzimática de la ABF (Tabla 1), mostraron diferencia significativa entre ejote, bagazo de caña, glucosa y lirio acuático, revelando que la mejor actividad de esta enzima fue en medio con ejote. El incremento en la actividad enzimática, fue congruente con los niveles de crecimiento de ambos hongos observado a los tres días de cultivo con ejote de frijol. Considerando que el ejote presenta un mayor porcentaje de pectina que los hipocotilos, y que la pectina contiene ramificaciones laterales de arabinosa además de otros azúcares (Mohen 2008), los resultados sugieren que la liberación de arabinosa por la actividad de la ABF sobre la pectina y xilana, y la liberación de xilosa por la actividad de XYL sobre el polímero de xilana, aportó de manera más eficiente una fuente de carbono para el crecimiento de ambos hongos. Adicionalmente, en un estudio previo, cuando estos hongos se crecieron en cultivos suplementados con xilana, se detectó un notable incremento en la producción extracelular ABF, XYLO y XYL. La xilana es uno de los principales componentes de la hemicelulosa (Scheller & Ulvskov 2010), y se ha reportado que la degradación completa de xilana requiere la acción coordinada de una batería de enzimas que degradan de manera eficiente todos sus componentes

(Conejo-Saucedo et al. 2011). Las ABF, XYL y XYLO actúan sinérgicamente en la hidrólisis completa de arabinoxilanos (Lagaert et al. 2014).

Cuando se utilizó lirio acuático como sustrato, la raza 1472 mostró altos niveles de actividad ABF, XYL, XYLO y CBH. Particularmente, la raza 0 mostró menores niveles de la actividad enzimática ABF y CBH que la raza 1472. Es importante destacar que el lirio acuático posee un contenido muy alto en hemicelulosa (30-55%), de la cual el 25% del peso seco de la pared celular corresponde a xilosa (Nigam 2002). Así, los resultados sugieren que la alta actividad enzimática liberó una abundante cantidad de fuente de carbono, congruente con el mayor crecimiento micelial observado para ambas razas en cultivo líquido con lirio acuático. Por otro lado, se sabe que los productos de degradación de sustratos complejos (xilosa, xilobiosa y celobiosa) son capaces de activar factores de transcripción que promueven la transcripción de genes que codifican enzimas líticas, particularmente xilanasas y arabinofuranosidasas (Glass et al. 2013), incrementando con ello la producción de estas enzimas. Estos resultados coinciden con un estudio previo, donde se evaluó la producción de las enzimas hidrolíticas α -L-arabinofuranosidasa, celulasa, xilanasas y β -D-xilopiranosidasa, de los hongos filamentosos *Trichoderma harzianum*, *T. atroviride*, *Penicillium griseofulvum*, *P. commune* y *Aspergillus versicolor*, donde se usó como sustrato al lirio acuático en estado sólido de fermentación, obteniendo altos niveles de actividad enzimática, por lo que se propone que el lirio acuático es una buena fuente de carbono para la producción de estas enzimas (Arana-Cuenca et al., 2019). Adicionalmente, en otro estudio en donde utilizaron el hongo fitopatógeno *Myrothecium roridum* y el no patógeno *Fusarium solani*, aislados del lirio acuático, se midió actividad celulolítica y xilanolítica en tres sustratos (carboximetilcelulosa, aserrín y la hoja seca de lirio acuático, en incubación por 16 días), y se encontró que el hongo patógeno era capaz de producir celulasa y xilanasas, sin embargo, el no patógeno fue mejor productor de enzimas (Okunowo et al., 2010). En los resultados de este estudio, la raza 0 (no patógena) de *C. lindemuthianum*, presentó mayor actividad xilanasas que la raza patógena en medio con lirio acuático.

Finalmente, ambas razas patógena 1472 y no patógena 0, fueron incapaces de inducir actividad de hemicelulasas y celulasas en los cultivos con bagazo de caña como fuente de carbono. La mayoría de los resultados obtenidos en las actividades ABF, XIL, XYLO y CBH fueron similares o más bajos que los obtenidos en la actividad basal con glucosa. A pesar de que en los últimos días de la inducción hay producción de biomasa micelial no hay presencia de actividad enzimática. Aunque

se ha reportado que en *Trichoderma reesei*, *Aspergillus phoenicis* y *A. niger* secretan una gran cantidad de xilanasas y celulasas en medios enriquecidos con bagazo de caña (Gutierrez-correa *et al*, 1998), los resultados obtenidos en este trabajo indican que el bagazo de caña no es un buen sustrato para la producción de hemicelulasas y celobiohidrolasas en *C. lindemuthianum*. Esto podría deberse a la composición de la pared celular del bagazo de caña (50% de celulosa, 25% de lignina y 25% de hemicelulosa) (Pandey *et al.*, 2000). Es posible que el alto contenido de lignina en el bagazo de caña bloquee la liberación de monosacáridos y disácaridos que prueven la expresión de genes que codifican a las enzimas hidrolíticas. Por otro lado, se ha reportado que la lignina presenta efectos negativos al interactuar con algunas enzimas (celulasas y xilanasas); puede inhibir la actividad con los residuos tóxicos que se liberan al hidrolizar la lignina, y otro mecanismo puede ser una adsorción no productiva en donde la lignina se une a la enzima y muestra una fuerte adsorción enzimática y a su vez resultó una pérdida significativa de la actividad. También observaron que la lignina se precipita en la superficie de la celulosa y esto puede ser un impedimento estérico y reducir la accesibilidad del sustrato (Li and Zheng, 2017; Zhang, Wu and Xie, 2017; Li *et al.*, 2018). Adicionalmente, se reportó actividad xilanasa, arabinofuranosidasa, β -xilosidasa, endoglucanasas de *Thermoascus aurantiacus* utilizando como sustratos productos de degradación de la xilana (xilobiosa, xilosa) y xilana hidrolizada del bagazo de caña. La inducción de la α -L-arabinofuranosidasa fue muy similar en los medios inducidos con xilobiosa y xilana hidrolizada del bagazo de caña y en el caso de las xilanasas obtuvieron niveles bajos de actividad al igual que de actividad celulolítica (Brienzo, Monte and Milagres, 2012).

9. CONCLUSIONES

- El lirio acuático en medio de cultivo líquido favorece la mayor producción de biomasa micelial de las dos razas de *C. lindemuthianum*. Sin embargo, la raza 1472 (patógena) presentó mejor crecimiento micelial que la raza 0 (no patógena).
- *C. lindemuthianum* no crece bien en glucosa o celulosa, prefiere sustratos complejos ricos en pectina y hemicelulosa, sugiriendo una especialización en actividad pectinolítica y hemicelulolítica.
- En ambos hongos, la secreción de actividad ABF ocurre en los primeros nueve días en todos los sustratos probados.
- Ambas razas de *C. lindemuthianum* presentaron la mayor actividad de XYL en medio con lirio acuático.
- La raza 1472 (patógena) de *C. lindemuthianum* presentó la mayor actividad de ABF, XYLO y CBH en medio con lirio acuático.
- El patrón de secreción de actividad xilanolítica (XYL y XYLO) en medio con hipocotilos fue diferencial entre ambas razas, rápido en la raza 0 (no patógena) y retrasado en la raza 1472 (patógena).
- El patrón de secreción de actividad celulolítica (CBH) en todos los sustratos fue diferencial entre ambas razas, rápido en la raza 0 (no patógena) y retrasado en la raza 1472 (patógena).
- El bagazo de caña no es un buen sustrato para el crecimiento e inducción de actividad enzimática de *C. lindemuthianum*.

10. Literatura citada

- Acosta-Rodríguez, I. (2005). Degradation of cellulose by the bean-pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Production of extracellular cellulolytic enzymes by cellulose induction, 301–310. <https://doi.org/10.1007/s10482-004-6422-6>
- Albersheim, P. (1994). Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. *Biochemical Society Transactions*, 22(2), 374–378.
- Amore, A. . A. (2013). Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Current Genomics*, 14(4), 230–249. <https://doi.org/10.2174/1389202911314040002>
- Anderson, A. J. (1978). Extracellular Enzymes Produced by *Colletotrichum lindemuthianum*, 1585–1589.
- Annamalai, N. (2016). Cellobiohydrolases : Role , Mechanism , and Recent Developments, 29–36. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43679-1>
- Arana-Cuenca, A., Tovar-Jiménez, X., Favela-Torres, E., Perraud-Gaime, I., González-Becerra, A. E., Martínez, A., ... Téllez-Jurado, A. (2019). Use of water hyacinth as a substrate for the production of filamentous fungal hydrolytic enzymes in solid-state fermentation. *3 Biotech*, 9(1), 0. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1529-z>
- Ashton, L. (1984). Production of P e c t i n Lyase by *Colletotrichum lindemuthianum* in Culture, (1984), 285–290.
- Brienzo, M., Monte, J. R., & Milagres, A. M. F. (2012). Induction of cellulase and hemicellulase activities of *Thermoascus aurantiacus* by xylan hydrolyzed products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 113–119. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0798-z>
- Burton, R. A. (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology*, 6(10), 724–732. <https://doi.org/10.1038/nchembio.439>
- Caffall, K. H. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>
- Chen, H. (2014). *Biotechnology of lignocellulose: Theory and practice. Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7>
- Cnossen-Fassoni, A. (2013). The pectate lyase encoded by the pecCl1 gene is an important determinant for the aggressiveness of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Microbiology*, 51(4), 461–470. <https://doi.org/10.1007/s12275-013-3078-9>
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
- Conejo-Saucedo, U., Cano-Camacho, H., López-Romero, E., Rivera, M. G. V., Lara-Márquez, 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>
- Conejo Saucedo, U. (2011). Hemicellulases of fungi : A vision of their function in the coordinated degradation of polysaccharides of plant cell walls. *Current Trends in Microbiology*, 7, 1–13.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(November), 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Dumas, B. (1999). Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection.

- Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1769–1771. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10103279>
- Dyk, J. S. Van, & Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes — Factors affecting enzymes , conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
- Ebringerová, A. (2006). Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromolecular Symposia*, 232(333), 1–12. <https://doi.org/10.1002/masy.200551401>
- Fry, S. C. (1988). The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. *New York*, 203, 333. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2003.00980.x>
- Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. H. D., & Coradetti, S. (2013). Plant Cell Wall Deconstruction by Ascomycete Fungi, (June), 477–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044>
- González-Chavira, M., Guerra, R. R., Hernández-Godínez, F., Acosta-Gallegos, J. A., de la Vega, O. M., & Simpson, J. (2004). Analysis of pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* found in the central region of Mexico and resistance in elite germ plasm of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Disease*, 88(2), 152–156.
- Gutierrez-correa, M., & Tengerdy, R. P. (1998). Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse, 20(1), 45–47.
- Gutiérrez-rojas, I. (2015). Regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos : casos clásicos y nuevos modelos, 32(1), 1–12.
- Herbert, C. (2004). Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. *Fungal Genetics and Biology*, 41(2), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.09.008>
- Hernández-Silva, L. (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>
- Herrmann, M. C., Vrsanska, M., Jurickova, M., Hirsch, J., Biely, P., & Kubicek, C. P. (1997). The beta-D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional beta-D-xylan xylohydrolase. *The Biochemical Journal*, 321 (Pt 2, 375–381. <https://doi.org/10.1042/bj3210375>
- Isikgor, F. H., & Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.*, 6(25), 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>
- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., & Pont-Lezica, R. F. R. (2006). Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Science*, 11(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.006>
- 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>
- Keegstra, K. (2010). Plant Cell Walls. *American Society of Plant Biologists*, 154(October), 483–486. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161240>
- Knob, A. (2010). Beta-xylosidases from filamentous fungi: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(20), 8513–8525. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5946-6>
- Knogge, W. (1998). Fungal pathogenicity Wolfgang Knogge. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 324–328. Retrieved from <http://biomednet.com/elecref/1369526600100324>
- Koseki, T., Okuda, M., Sudoh, S., Kizaki, Y., Iwano, K., Aramaki, I., & Matsuzawa, H. (2003).

- Role of Two α - L -Arabinofuranosidases in Arabinoxylan Degradation and Characteristics of the Encoding Genes from Shochu Koji Molds , *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus awamori*, 96(3), 232–241.
- Kousar, S. (2013). Microbial xylosidases: Production and biochemical characterization. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, 11(2), 85–95.
- 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. (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>
- Lee, R. C., Hrmova, M., Burton, R. A., Lahnstein, J., & Fincher, G. B. (2003). Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with α -L-arabinofuranosidase and β -D-xylosidase activity: Characterization, primary structures, and COOH-terminal processing. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 5377–5387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210627200>
- Lerouxel, O. (2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides — a complex process. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(6), 621–630. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.09.009>
- Li, X., Li, M., Pu, Y., Ragauskas, A. J., Klett, A. S., Thies, M., & Zheng, Y. (2018). Inhibitory effects of lignin on enzymatic hydrolysis: The role of lignin chemistry and molecular weight. *Renewable Energy*, 123, 664–674. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.02.079>
- Li, X., & Zheng, Y. (2017). Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. *Biotechnology Advances*, 35(4), 466–489. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.010>
- Magdalena de Jesús, R. (2014). OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ARABINOXILOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE PERICARPIO DE MAÍZ NIXTAMALIZADO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PREBIÓTICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.
- Martínez, S. T., Martínez, P., González, V. C., & Higuera, B. L. (2012). Determinación in vitro de los patrones de inducción de una In vitro determination of secretion patterns of Fusarium and partial characterization Determinação “ in vitro ” dos padrões de indução de uma Orgânica y Bioquímica, 41(3), 359–376.
- 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)
- Milagres, A. M. F., Magalhães, P. O., & Ferraz, A. (2005). Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispora* cultivated on Pinus taeda. *FEMS Microbiology Letters*, 253(2), 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.055>
- Miyanaga, A., Koseki, T., Matsuzawa, H., & Wakagi, T. (2006). Crystal Structure of GH54 α - L -Arabinofuranosidase and Unique Function of CBM42 Attached to It. *Journal of Applied Glycoscience*, 148, 143–148.
- Morales, A., Niño, G., Carvajal, E., Gardea, A., Torres, P., López, Y., ... Jaime. (2013). Ferulated arabinoxylans from cereals. A review of their physico-chemical characteristics and gelling capability. *Rev. Fitotec. Mex*, 36(4), 439–446.
- Münch, S. (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>
- Nigam, J. N. (2002). Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid

- hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *Journal of Biotechnology*, 97(2), 107–116. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00013-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00013-5)
- Numan, M. T., & Bhosle, N. B. (2006). α -L-arabinofuranosidases: The potential applications in biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(4), 247–260. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0072-1>
- O’Connell, R. J., Bailey, J. A., & Richmond, D. V. (1985). Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology*, 27(1), 75–98. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(85\)90058-X](https://doi.org/10.1016/0048-4059(85)90058-X)
- Okafor, U. a., Okochi, V. I., Onyegeme-okerinta, B. M., & Nwodo-Chinedu, S. (2007). Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro - wastes. *African Journal of Biotechnology*, 6(July), 1710–1714. <https://doi.org/10.1001/2014.01/02>
- Okunowo, W. O., Gbenle, G. O., Osuntoki, A. A., Adekunle, A. A., & Ojokuku, S. A. (2010). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by a phytopathogenic *Myrothecium roridum* and some avirulent fungal isolates from water hyacinth. *Journal of Biotechnology*, 9(7), 1074–1078. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1598>
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Soccol, V. T., Vandenberghe, L. P. S., & Mohan, R. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues . II : cassava bagasse, 74, 81–87.
- Pedersen, M., Lauritzen, H. K., Frisvad, J. C., & Meyer, A. S. (2007). Identification of thermostable β -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 29(5), 743–748. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9314-9>
- Perfect, S. E. (1999). *Colletotrichum*: A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal–Plant Interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 27(2), 186–198. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>
- Perfect, S. E. (2001). Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 2(2), 101–108. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2001.00055.x>
- Rasmussen, L. E., Xu, C., Sørensen, J. F., Nielsen, M. K., & Meyer, A. S. (2012). Enzyme kinetics and identification of the rate-limiting step of enzymatic arabinoxylan degradation. *Biochemical Engineering Journal*, 69, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.08.004>
- Rodríguez-Guerra, R., Acosta-Gallegos, J. A., González-Chavira, M. M., & Simpson, J. (2006). Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de frijol. *Agricultura Técnica En México*.
- Saha, B. C. (2000). α -l-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5), 403–423. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00044-6)
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>
- Sakamoto, T. (2013). Substrate specificity and gene expression of two *Penicillium chrysogenum* α - L -arabinofuranosidases (AFQ1 and AFS1) belonging to glycoside hydrolase families 51 and 54, 1121–1130. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3978-3>
- Salazar Iribe, A. (2013). Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal. *REB. Revista de Educación Bioquímica*, 32(2), 67–75.
- Sanchez, G., María, B., Olivas, F., Arizpe, S., Rodríguez, P., Jiménez, L., ... Guerra, R. (2009). *Colletotrichum lindemuthianum* PATHOTYPES IN OAXACA AND SAN LUIS POTOSI, MEXICO, AND RESISTANCE IN COMMON BEAN.
- 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>

- Schiøtt, M., De Fine Licht, H. H., Lange, L., & Boomsma, J. J. (2008). Towards a molecular understanding of symbiont function: Identification of a fungal gene for the degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants. *BMC Microbiology*, 8(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-40>
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., Madhavan, A., Alphonsa, J. A., Vivek, N., ... Faraco, V. (2017). Water hyacinth a potential source for value addition: An overview. *Bioresource Technology*, 230, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.035>
- Suurnäkki, A., Tenkanen, M., Buchert, J., & Viikari, L. (1997). Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps (pp. 261–287). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/BFb0102077>
- Tani, S. (2014). Complex regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi, 4829–4837. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5707-6>
- Teeri, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15(5), 160–167. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01032-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01032-9)
- Valenciaga, D., & Chongo, B. (2004). La pared celular. Influencia de su naturaleza en la degradación microbiana ruminal de los forrajes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(4).
- Villamagna, A. M. (2010). Ecological and socio-economic impacts of invasive water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): a review, 282–298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02294.x>
- Wijesundera, R. L. C., Bailey, J. A., Byrde, R. J. W., & Fielding, A. H. (1989). Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 34(5), 403–413. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(89\)90067-2](https://doi.org/10.1016/0885-5765(89)90067-2)
- Zanoelo, F. F., Polizeli Md, M. D. L. T. D. M., Terenzi, H. F., & Jorge, J. A. (2004). Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant beta- D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31(4), 170–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0129-6>
- Zhang, H., Wu, S., & Xie, J. (2017). Evaluation of the effects of isolated lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 101, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.03.001>
- Zhang, N. (2015). Cellulose-hemicellulose interaction in wood secondary cell-wall. *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering*, 23(8), 085010. <https://doi.org/10.1088/0965-0393/23/8/085010>