



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



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

CARACTERIZACIÓN BIOINFORMÁTICA Y EXPERIMENTAL DEL SISTEMA DE
LACASAS EN EL GÉNERO *Trichoderma*

TESIS

QUE PRESENTA

M. C. Saila Viridiana Cázares-García

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN: BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR AGROPECUARIA

DIRECTOR

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Gerardo Vázquez-Marrufo

CO-DIRECTOR

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Alfredo H. Herrera-Estrella

Morelia, Michoacán, Febrero de 2014

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del Centro Multidisciplinario de Estrudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del D. C. Gerardo Vázquez-Marrufo y la co-asesoría del D. C. Alfredo Herrera-Estrella del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO, CINVESTAV-Irapuato).

El presente trabajo recibió apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo mediante el proyecto “Caracterización experimental y bioinformática del sistema de lacasas en el género *Trichoderma*” del Programa de Investigación 2012-2013. Se agradece también el apoyo otorgado por CONACyT mediante la beca con registro No. 231992 para la realización de estudios de posgrado.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**.

Con admiración al **D. C. Gerardo Vázquez-Marrufo** por su paciencia y entusiasmo para la realización de éste proyecto. Gracias por brindarme sus conocimientos y apoyo incondicional.

Al **D. C. Alfredo H. Herrera-Estrella** por aceptarme como su alumna y permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A la **D. C. Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas** por sus consejos, apoyo y amistad.

A la **D. C. Virginia A. Robinson-Fuentes** por siempre creer y confiar en mí.

A mi comité sinodal: **D. C. María Guadalupe Zavala-Páramo, D. C. Horacio Cano-Camacho, D. C. Patricia Ponce-Noyola**, por las sugerencias y aportes valiosos a ésta tesis.

Con todo mi cariño agradezco a mis compañeros **Araceli, Erandi, Julieta, Lili, Mar, Mina, Paulina, Erick, Abraham, Gaby Vázquez, Gaby López, Iliana, Silvia, Heidi, Irum, Nayeli, Ofelia, Daniel, Edgar, Idalia, Angélica, Andrei y José Luis**.

A **Ana Laura Guillén-Nepita** por tu gran amistad, por nunca dejarme sola, por compartirme tus conocimientos y ayuda en todo momento. Gracias por ser luz en mi camino.

DEDICATORIAS

A mis padres **Ma. Guadalupe** y **Gabriel** por motivarme a cumplir mis metas y por estar siempre a mi lado. Por que sin Ustedes nada hubiese sido posible.

A mi hijo **Gabriel Omar** por ser el motor de mi vida y mi mayor inspiración. Eres un gran maestro.

A **Kevin Geraldo**, gracias por estar ahí, por tu amor, por tu comprensión, por tu apoyo incondicional, por estar a mi lado.

A mis hermanos **Berenice** y **Gabriel** por su compañía y apoyo.

A mis amigas **Gissela** y **Claudia** por su cariño y amistad.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	1
SUMMARY	2
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1 Distribución y funciones de las lacasas fúngicas	3
1.2 Aspectos estructurales de las lacasas de hongos	5
1.3 Mecanismo de oxidación de las lacasas	8
1.4 El sistema de lacasas en hongos y sus aplicaciones	10
1.5 Las lacasas como una nueva herramienta en el potencial biotecnológico de <i>Trichoderma</i> spp.	13
II. HIPÓTESIS	26
III. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general	27
3.2 Objetivos particulares	27
IV. RESULTADOS	
4.1 CAPÍTULO 1. Cázares-García SV, Vázquez-Garcidueñas MS, Vázquez-Marrufo G (2013) Structural and phylogenetic analysis of laccases from <i>Trichoderma</i> : a bioinformatics approach.	29
4.2 CAPÍTULO 2. Selección de cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp. con actividad de lacasa extracelular.	43
4.3 CAPÍTULO 3. Caracterización estructural de la lacasa extracelular en cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp.	89
4.4 CAPÍTULO 4. Perfil enzimático y transcripcional de la actividad de lacasa extracelular en <i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040.	136
V. CONCLUSIONES GENERALES	182
VI. PERSPECTIVAS	183

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
ABTS	3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CEM	Caldo extracto de malta
CMN	Centro ononuclear
CMU	Cepario Michoacano Universitario
CTN	Centro trinuclear
EC	'Enzyme Comission'
GC	Coordenadas Geográficas
Lac	Lacasa
MCO	Multicobre Oxidasa
Mg	Miligramos
MI	Mililitros
MM	Medio Mínimo Vogel
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

No. Figura	Título	Página
1	Representación esquemática del sitio activo de las lacasas y los sitios de unión a cobre L1–L4.	6
2	Representación esquemática de la estructura tridimensional y topología de las lacasas.	8

IV. RESULTADOS

4.1. CAPÍTULO 1

1	Intron positions within the laccase genes of <i>Trichoderma</i> spp. define three gene subfamilies.	33
2	Aligment of laccase sequences from <i>Trichoderma</i> spp.	34
3	Phylogenetic analysis of laccases and of <i>Trichoderma</i> species.	38

4.2 CAPÍTULO 2

1	Mapa que indica la localización de las áreas de colecta de las muestras de donde se obtuvieron los aislados de <i>Trichoderma</i> spp.	49
2	Cinética de crecimiento de las cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp. en MM sólido.	55
3	Relaciones filogenéticas de los aislados de <i>Trichoderma</i> estudiados.	58
4	Cinéticas de crecimiento y actividad de lacasa extracelular de las cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp.	63

4.3 CAPÍTULO 3

1	Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes de lacasa <i>sensu stricto</i> extracelulares de especies del género <i>Trichoderma</i> .	102
---	---	-----

2	Electroforesis en geles de agarosa de la amplificación por PCR de los genes de lacasa <i>sensu stricto</i> de <i>Trichoderma</i> spp. utilizando los oligonucleótidos LacT-F/LacT-R.	103
3	Posición de intrones y exones dentro de los genes de lacasa <i>sensu stricto</i> extracelulares de especies del género <i>Trichoderma</i> .	104
4	Alineamiento múltiple de las lacasas <i>sensu stricto</i> extracelulares de <i>Trichoderma</i> spp.	106
5	Estructuras tridimensionales de las lacasas extracelulares de <i>Trichoderma</i> spp.	111
6	Sitio activo de las lacasas extracelulares de <i>Trichoderma</i> spp.	112
7	Representación esquemática de la superficie molecular y del sitio putativo de unión a sustrato de las lacasas extracelulares de <i>Trichoderma</i> spp.	114
8	Análisis filogenético de las lacasas extracelulares de las cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp.	115
S1	Especificidad de los oligonucleótidos LacT-F y LacT-R.	132

4.4 CAPÍTULO 4

1	Ensayos de decoloración y oxidación en placa de <i>T. atroviride</i> IMI 206040.	145
2	Cinéticas de crecimiento y actividad de lacasa extracelular de <i>T. atroviride</i> IMI 206040.	148
3	Región promotora del gen <i>Talac1</i> de <i>T. atroviride</i> IMI 206040.	149
4	Actividad extracelular de lacasa y expresión del gen <i>Talac1</i> de <i>T. atroviride</i> IMI 206040.	151
5	Análisis RT-PCR semicuantitativo del gen de lacasa extracelular <i>Talac1</i> de <i>T. atroviride</i> IMI 206040 en confrontación directa contra los hongos fitopatógenos <i>R. solani</i> , <i>S. rolfsii</i> y <i>F. oxysporum</i> .	152

ÍNDICE DE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

No. Tabla	Título	Página
1	Papel fisiológica de las lacasas en especies fúngicas	4
2	Aplicaciones biotecnológicas de lacasas fúngicas	13
3	Aplicaciones industriales de especies del género <i>Trichoderma</i>	14

IV. RESULTADOS

4.1. CAPÍTULO 1

1	Observed signature sequences in laccases	31
2	Accession numbers and structural characteristics of laccases <i>sensu stricto</i> from <i>Trichoderma</i> spp	32
3	Identity (%) among protein sequences of the members of the <i>Trichoderma</i> laccase family	36
4	Signal peptide sequences from <i>Trichoderma</i> laccases predicted by different software programs	37
5	Synonymous and non-synonymous substitution rates (%) between laccase genes of <i>Trichoderma</i> spp	40

4.2 CAPÍTULO 2

1	Datos de los aislados silvestres de <i>Trichoderma</i> spp. analizados en el presente trabajo	48
2	Ensayos cualitativos para evaluar la capacidad de decoloración/oxidación de aislados silvestres de <i>Trichoderma</i> spp.	60
3	Actividad extracelular de lacasa y producción de biomasa en cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp.	62

4.3 CAPÍTULO 3

1	Identidad y genes de lacasa de los aislados silvestres de <i>Trichoderma</i> spp.	95
2	Identidad (%) entre las secuencias de lacasa de las especies de <i>Trichoderma</i> spp.	108
3	Parámetros de calidad de los modelos 3D de las lacasas <i>sensu stricto</i> extracelulares de <i>Trichoderma</i> spp.	109
S1	Porcentaje de identidad entre los genes de lacasa de <i>Trichoderma</i> spp.	132
S2	Identidad (%) de las secuencias de lacasa de las especies de <i>Trichoderma</i> spp. con respecto a lacasas de hongos ascomicetos depositadas en la base de datos de NCBI Gean Bank.	132
S3	Identidad (%) de las secuencias de lacasa de las especies de <i>Trichoderma</i> spp. con respecto a lacasas de hongos ascomicetos y basidiomicetos.	133

4.4 CAPÍTULO 4

1	Actividad extracelular de lacasa y producción de biomasa en <i>T. atroviride</i> IMI 206040 con diferentes inductores.	147
---	--	-----

RESUMEN GENERAL

En el presente trabajo se analizó el sistema de lacasas en especies de hongos del género *Trichoderma*. El análisis bioinformático en los genomas de las cepas de referencia indica que el ancestro común del género *Trichoderma* poseía dos genes funcionales de lacasa, uno para la actividad extracelular y otro para la actividad intracelular. La evidencia bioinformática y filogenética muestra que las especies actuales presentan patrones diferenciales de retención de ambos genes (*T. atroviride* IMI 206040 y *T. virens* Gv29-8), pérdida de la actividad extracelular (*T. harzianum* y *T. reesei*) y adquisición adicional de genes mediante transferencia horizontal (*T. asperellum* CBS 433.97). En 23 aislados silvestres de *Trichoderma* spp. se encontraron diferencias en la capacidad para decolorar/oxidar medio de cultivo sólido suplementado con colorantes y compuestos fenólicos indicadores de la actividad de lacasa extracelular. La máxima actividad basal (763.88 mU/mL) e inducible con rastrojo de sorgo (2115.97 mU/mL) en cultivos líquidos fue producida por la cepa de *T. viride*. *T. atroviride*, no presenta actividad basal pero si inducible por rastrojo de sorgo. La actividad extracelular en *T. harzianum* y *T. tomentosum* es atribuible a una ferroxidasa-lacasa y no a una lacasa *sensu stricto*. Se diseñaron iniciadores específicos para la amplificación por PCR de los genes de lacasa extracelular en el género *Trichoderma* y se analizaron los productos de amplificación obtenidos para cepas silvestres de *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. viridescens*, *T. viride* y *T. koningii*. El análisis bioinformático estructural muestra proteínas con una arquitectura similar a las lacasas cristalizadas de hongos ascomicetos, con sutiles cambios conformacionales en el sitio activo y en la cavidad del sustrato, lo que sugiere un actividad catalítica diferencial intra e interespecífica. La cepa de referencia IMI 206040 de *T. atroviride* tampoco mostró actividad basal pero si inducible por compuestos orgánicos, rastrojo de sorgo y CuSO₄, comprobándose en éste último caso la regulación transcripcional del gen *Talac1*, el cual presenta diferentes elementos de regulación en *cis*, incluidos los de respuesta a metales. La confrontación *in vitro* de la cepa IMI 206040 contra hongos fitopatógenos mostró una regulación transcripcional patógeno-específica. La transcripción del gen *Talac1* parece estar asociada a la densidad celular (*quorum sensing*).

SUMMARY

In this work, the laccase system from species of the fungal genus *Trichoderma* was analyzed. The bioinformatic analysis in the genomes of reference strains showed that the common ancestor possessed two laccase genes, one coding for an enzyme with extracellular activity and the other, for intracellular activity. Bioinformatic and phylogenetic evidence show that species *T. atroviride* (IMI 2016040) and *T. virens* (Gv29-8) have differential patterns of conservation of those genes; that *T. harzianum* and *T. reesei* have lost the extracellular activity, and that *T. asperellum* (CBS 433.97) has acquired genes by horizontal transfer. Differences in the capacity to discolor colorants or oxidize phenolic compounds were observed in 23 wild *Trichoderma* spp. strains. Both, colorants and phenolic compounds are indicators of the extracellular laccase activity. *T. viride* showed the highest basal and induced with *Sorghum* stubble activities (763.88mU/mL and 2115.97mU/mL, respectively). *T. atroviride* did not shown basal activity but it was induced by *Sorghum* stubble. Extracellular laccase activity in *T. harzianum* and *T. tomentosum* is attributable to a ferroxidase-laccase and not to a laccase *sensu-stricto*. Specific primers for PCR amplification of extracellular laccase genes were designed. Amplification products and its sequences were obtained from wild *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. viridescens*, *T. viride* and *T. koningii*. Structural bioinformatic analysis showed that *in silico* translated proteins have a similar architecture to the Ascomycota crystallized laccases, with subtle conformational changes within the active site and the substrate cavity. This suggests intra and interspecies differences in the catalytic activity. Similar to the wild strain, the reference strain *T. atroviride* IMI 206040 showed no basal activity, but it was induced by organic compounds, sorghum stubble, and CuSO₄. The laccase gene of this strain, *Talac1*, presents different *cis*-regulatory elements, including those for metal response. The transcriptional regulation of *Talac1* during the confrontation of IMI206040 strain against phytopathogenic fungi was assessed and it showed a pathogen specific regulation. The transcription of *Talac1* gene seems to be associated to *quorum sensing*.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Distribución y funciones de las lacasas fúngicas

Las lacasas (benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) son metaloenzimas que pertenecen a la familia de las multicobre oxidasas (MCOs). Dichas proteínas están definidas como oxidorreductasas por la nomenclatura de la “Enzyme Commission” (EC), debido a su capacidad para acoplar la reducción del oxígeno molecular con la oxidación de un amplio rango de sustratos aromáticos, a través de un mecanismo de transferencia de electrones (Baldrian, 2006). Las lacasas son enzimas comunes en la naturaleza y se han encontrado ampliamente en plantas (McCaig *et al.* 2005) y hongos (Giardina *et al.* 2010), así como en insectos (Dittmer *et al.* 2004) y bacterias (Sharma *et al.* 2007). La primer lacasa fue reportada por Yoshida en 1883 al ser aislada del látex del árbol japonés de la laca *Rhus vernicifera*, del cual se deriva su nombre. En 1896, Bertrand y Laborde demostraron la presencia de las lacasas en hongos y a partir de entonces se han encontrado en diversas especies de Basidiomicetos y Ascomicetos (Kunamneni *et al.* 2007), pero no se ha determinado su presencia en Zigomicetos y Quitridiomicetos (Baldrian 2006). Entre los mayores productores de lacasa extracelular se encuentran los hongos basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* (Lettera *et al.* 2010), *Cerrena maxima* (Lyashenko *et al.* 2006a), *Rigidoporus lignosus* (Garavaglia *et al.* 2004), *Coprinopsis cinerea* (Rühl *et al.* 2013), *Pycnoporus cinnabarinus* (Camarero *et al.* 2007), *Lentinula edodes* (D’Annibale *et al.* 2004) y *Lentinus tigrinus* (Ferraroni *et al.* 2007), así como diversas especies de *Trametes* (Galhaup y Haldrich 2001, Smolander *et al.* 2008). La producción de lacasas extracelulares también se ha descrito en ascomicetos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* (Crowe y Olsson 2001) *Gaeumannomyces graminis* (Litvintseva y Henson 2002), *Fusarium oxysporum* (Cordoba y Roncero 2008) y *Botrytis cinerea* (Schouten *et al.* 2008), así como en especies de vida libre que incluyen a *Podospora anserina* (Fernández-Larrea y Stahl 1996), *Neurospora crassa* (Pöggeler 2011) y *Aspergillus niger* (Tamayo-Ramos *et al.* 2011).

Tabla 1. Papel fisiológico de las lacasas en especies fúngicas.

FUNCIÓN	ESPECIE	REFERENCIA
Degradación de lignocelulosa	<i>Cerrena maxima</i>	Lyashenko <i>et al.</i> 2006a
	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Rühl <i>et al.</i> 2013
	<i>Rigidoporus lignosus</i>	Garavaglia <i>et al.</i> 2004
Morfogénesis	<i>Tricholoma giganteum</i>	Wang y Ng 2004
	<i>Pleurotus cornucopiae</i>	Wong <i>et al.</i> 2010
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Lettera <i>et al.</i> 2010
	<i>Armillaria spp.</i>	Worrall <i>et al.</i> 1986
Síntesis de pigmentos	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Eisenman <i>et al.</i> 2007
	<i>Trychophyton rubrum</i>	Youngchim <i>et al.</i> 2011
	<i>Microsporium gypseum</i>	
	<i>Lentinula edodes</i>	Nagai <i>et al.</i> 2003
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Eggert <i>et al.</i> 1995
Patogénesis	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cordoba y Roncero 2007
	<i>Trichoderma viride</i>	Catalano <i>et al.</i> 2011
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Zhu y Williamson 2004
Protección	<i>Botrytis cinerea</i>	Schouten <i>et al.</i> 2008
	<i>Heveloma cylindrosporum</i>	Ramesh <i>et al.</i> 2008
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Fang <i>et al.</i> 2010

En los hongos, las lacasas llevan a cabo una gran variedad de funciones fisiológicas (Tabla 1), asociadas tanto al grupo taxonómico como al nicho ecológico de la especie en cuestión. En basidiomicetos, éstas enzimas participan principalmente en la biodegradación de la lignina (Sánchez 2009) y en la formación del cuerpo fructífero (Lettera *et al.* 2010). En hongos fitopatógenos las lacasas constituyen importantes factores de virulencia, además de estar implicadas en la protección del hongo contra los mecanismos de defensa de la planta (Cordoba y Roncero 2007). En diversas especies fúngicas la actividad de lacasa está relacionada con la síntesis de pigmentos, así como en procesos de esporulación, morfogénesis y detoxificación (revisado en Baldrian 2006, Giardiana *et al.* 2010). Mientras que las lacasas involucradas en la degradación de lignina y en procesos de patogénesis son enzimas extracelulares, aquellas responsables de otros procesos fisiológicos actúan a nivel intracelular (Kellner *et al.* 2007). En algunos casos la actividad de lacasa tiene una función principal asociada a diversos fenómenos

fisiológicos. Por ejemplo, en el caso de *Pycnoporus cinnabarinus* la actividad de lacasa asociada a la síntesis de pigmentos (Eggert *et al.* 1995) también interviene en la defensa antibacteriana (Eggert 1997). Algo similar se ha documentado en el hongo patógeno de insectos *Metarhizium anisopliae*, en el cual la actividad de lacasa relacionada con pigmentación, contribuye en la virulencia del hongo y su tolerancia a estrés abiótico (Fang *et al.* 2010).

1.2 Aspectos estructurales de las lacasas de hongos

El conocimiento actual sobre la estructura y las propiedades químicas y fisicoquímicas de las lacasas está basado en el estudio de más de 100 proteínas fúngicas que han sido purificadas, aunque sólo de algunas de ellas se tienen datos cristalográficos (Baldrian 2006). Las lacasas son proteínas monoméricas con pesos moleculares que van de los 50 a los 130 kDa, poseen puntos isoeléctricos (pI) ácidos (pH 2.6 - 6.7) y son estables en un intervalo de temperatura entre 30 y 50 °C (Morozova *et al.* 2007). Como ya se mencionó, no todas las lacasas son extracelulares, pero las lacasas secretadas están glicosiladas y presentan entre 3 y 10 sitios de N-glicosilación. El patrón de glicosilación de la mayoría de las lacasas consiste de cadenas ramificadas de manosa conectadas a residuos de Asn a través de moléculas de N-acetil-D-glucosamina. No obstante, también se han identificado unidades de arabinosa, xilosa, galactosa y glucosa (Vite-Vallejo *et al.* 2009). El contenido de carbohidratos representa entre el 10 y 35% del peso molecular de la enzima y contribuye al plegado y secreción de la proteína, a la protección contra proteólisis, a la estabilidad de los centros de cobre, y a la termoestabilidad de la proteína (Rodgers *et al.* 2009).

A la fecha se cuenta con la estructura cristalizada de las lacasas de los hongos basidiomicetos *C. cinerea* (Ducros *et al.* 1998), *T. versicolor* (Piontek *et al.* 2002), *R. lignosus* (Garavaglia *et al.* 2004), *Coriolus zonatus* (Lyashenko *et al.* 2006b), *C. maxima* (Lyashenko *et al.* 2006a), *L. tigrinus* (Ferraroni *et al.* 2007), *T. trogii* (Matera *et al.* 2008), *T. hirsuta* (Polyakov *et al.* 2009), *Trametes* sp. AH28-2 (Ge *et al.* 2010) y de los hongos ascomicetos *Melanocarpus albomyces* (Hakulinen *et al.* 2002) y *Thielavia arenaria* (Kallio *et al.* 2011). El análisis conformacional de éstas

enzimas ha contribuido a definir las características estructurales y catalíticas de las lacasas fúngicas (Figs. 1 y 2).

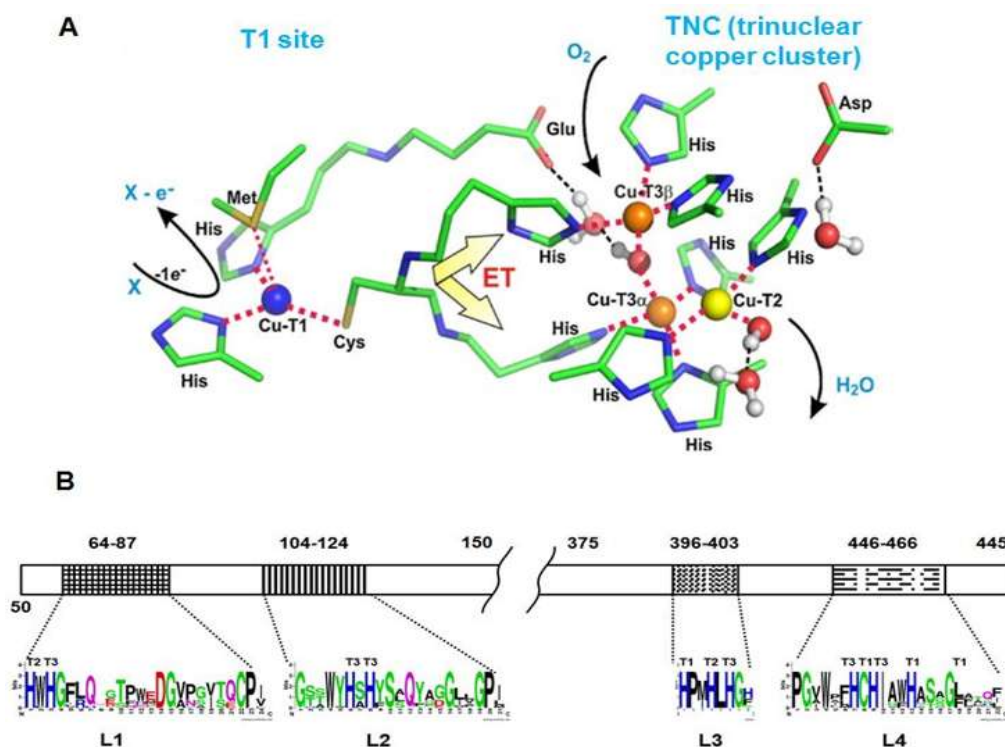


Figura 1. Representación esquemática del sitio activo de las lacasas y los sitios de unión a cobre L1-L4 **(A)** Sitio activo de las lacasas. La figura muestra un modelo del estado oxidado (reposo) de la enzima CueO (código PDB: 1KV7). El átomo de cobre T1 se encuentra de color azul, el cobre T2 de color amarillo y el par de cobres T3 de color naranja. La vía de transferencia de electrones del cobre T1 al CTN está indicada por una doble flecha amarilla. Los enlaces de coordinación de los átomos de cobre con los residuos de aminoácidos His-X-His están representados por líneas de puntos rojos. La flecha negra superior indica el canal de entrada del oxígeno al CTN y la flecha negra inferior indica el canal de salida de las moléculas de agua. Las líneas de puntos negros representan puentes de hidrógeno. Imagen tomada de Rulíšek y Ryde (2013). **(B)** Representación general del alineamiento múltiple de secuencias de lacasa. Las zonas sombreadas corresponden a las regiones conservadas L1-L4. Por debajo de éstas zonas se encuentran las secuencias logo que representan la frecuencia con la que aparece cada aminoácido en una posición determinada de las secuencias proteínicas alineadas. Imagen tomada de Kumar *et al.* (2003).

El sitio activo de las lacasas está constituido por cuatro átomos de cobre en su estado de oxidación +2 (Fig. 1A). Estos átomos de cobre están clasificados en tres tipos diferentes de acuerdo con sus patrones de absorción UV/Vis y su detección mediante Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE), los cuales son clasificados como Tipo 1 (T1), Tipo 2 (T2) y Tipo 3 (T3). El cobre T1 es responsable del intenso

color azul que poseen estas enzimas a 600 nm y es detectable mediante RPE. El cobre T2 tiene una débil absorción en la región visible, pero es activo en RPE. El par de cobres T3 forman un centro dinuclear que se caracteriza por una absorción a 330 nm y no son detectables por RPE (Ferraroni *et al.* 2007). El cobre T1 constituye un centro mononuclear y es el sitio de oxidación de los sustratos, en tanto que los cobres T2 y T3 forman un centro trinuclear (CTN) en donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno molecular a agua (Quintanar *et al.* 2007). En el centro mononuclear, el cobre T1 está coordinado trigonalmente por dos residuos de His y uno de Cys como ligandos ecuatoriales y una posición axial correspondiente a residuos de Met, Leu o Phe. El CTN T2/T3, está coordinado por ocho His que aparecen en un patrón altamente conservado de cuatro motivos His-X-His. El cobre T2 está coordinado por dos de éstas His y por una molécula de oxígeno. Los cobres T3 están unidos a la proteína por las seis His restantes y un ion hidroxilo, el cual mantiene el fuerte acoplamiento antiferromagnético distintivo de éste par de cobres (Bento *et al.* 2010) (Fig. 1A). Los residuos de aminoácidos que coordinan los átomos de cobre están distribuidos en zonas altamente conservadas de la proteína denominadas segmentos L1 a L4 (Fig. 1B). Dentro de estas regiones se encuentran también residuos conservados o parcialmente conservados que son críticos para mantener el plegado conformacional característico de las lacasas (Kumar *et al.* 2003).

Los estudios de cristalografía de rayos X (Piontek *et al.* 2002, Hakulinen *et al.* 2002, Kallio *et al.* 2011) revelaron la arquitectura molecular común de las lacasas (Fig. 2). El plegado general de estas enzimas consiste de tres dominios cupredoxina ordenados de manera secuencial (denominados con numerales romanos I-III) que están organizados en una estructura globular alrededor del sitio catalítico (Fig. 2A). Cada dominio exhibe una topología de barriles- β estrechamente relacionada a las proteínas azules de cobre como azurinas y plastocianinas (Nakamura *et al.* 2003) (Fig. 2B). El átomo de cobre T1 está localizado en el dominio I, en tanto que el CTN se encuentra en la interface entre los dominios I y III (Fig. 2B). Además, están presentes dos canales de solventes que proporcionan una ruta de acceso hacia el CTN. El primer canal permite la entrada y unión del oxígeno molecular a los cobres

T2/T3, en tanto que el segundo está involucrado en la translocación de las moléculas de agua desde el cobre T2 hacia la superficie de la proteína (Piontek *et al.* 2002) (Fig. 1A). En las lacasas de ascomicetos, el canal de entrada del oxígeno está bloqueado por los últimos residuos (13–14 aminoácidos) del extremo C-terminal. Esta región es escindida por proteólisis de tal forma que abre la entrada del oxígeno y produce la forma activa de la enzima (Hakulinen *et al.* 2002). La estructura tridimensional de las lacasas es estabilizada por dos puentes disulfuro que conectan el dominio I con los dominios II y III cada uno (Piontek *et al.* 2002).

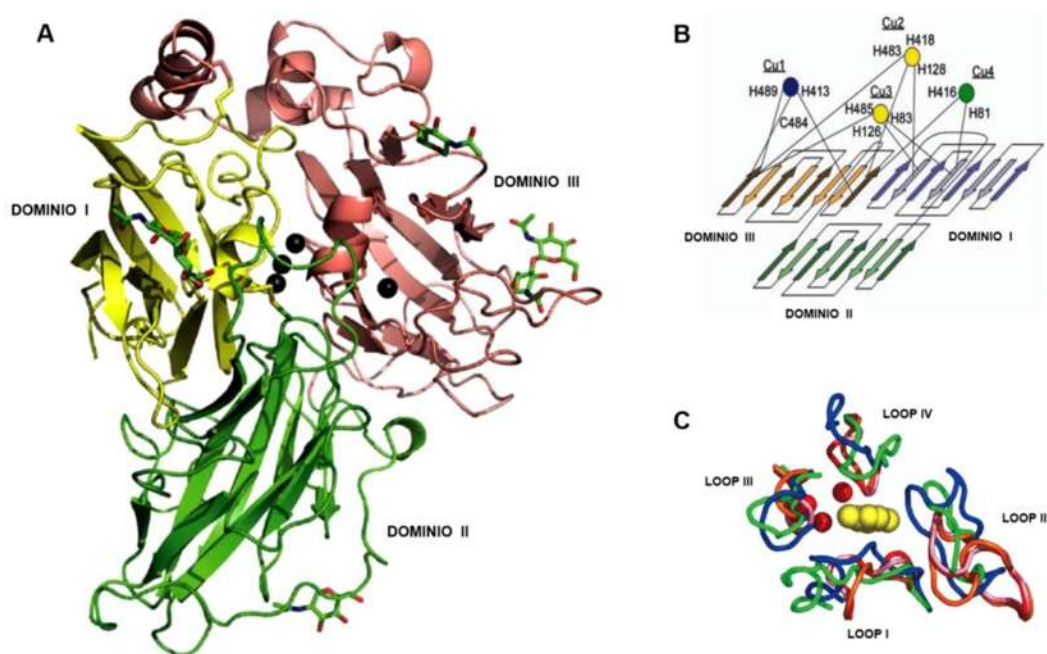


Figura 2. Representación esquemática de la estructura tridimensional y topología de las lacasas. **(A)** Diagrama de cintas de la lacasa de *Trametes* sp. AH28-2. Los átomos de cobre T1, T2 y T3-T3' se encuentran en negro. Los dominios cupredoxina se presentan en amarillo, verde y rosa. Imagen tomada de Ge *et al.* (2010) **(B)** Esquema de la topología de barriles β . Los dominios cupredoxina se presentan en lila, verde y dorado. Los residuos que coordinan a los átomos de cobre están mapeados en los dominios cupredoxina. Imagen de Taylor *et al.* (2005). **(C)** Superimposición estructural de los *loops* que forman el sitio de unión a sustrato de las lacasas de *T. versicolor* (rojo, código PDB: 1KYA), *T. versicolor* (rosa, código PDB: 1GYC), *C. cinereus* (naranja, código PDB: 1A65) y *M. albomyces* (azul, código PDB: 1GE0) y de la ascorbato oxidasa de *Cucurbita pepo* var. *melopepo* (verde, código PDB: 1GYC). Imagen de Larrondo *et al.* (2003).

1.3 Mecanismo de oxidación de la lacasa

El análisis detallado de lacasas cristalizadas reveló que la unión del sustrato ocurre cerca del cobre T1 (Piontek *et al.* 2002). Los residuos que constituyen el sitio de

unión a sustrato forman “loops” (I-IV) y se encuentran en los dominios II y III. En las lacasas de diversos organismos éstos “loops” poseen diferente longitud y composición de aminoácidos, lo que resulta en una gran diversidad del tamaño y la forma del sitio de unión a sustrato (Ge *et al.* 2010) (Fig. 2C). Esta característica estructural les ha proporcionado a las lacasas la capacidad de oxidar un amplio rango de sustratos, incluidos *orto*- y *para*-difenoles, fenoles metoxi-sustituidos, diaminas aromáticas, benzenotioles y algunos iones inorgánicos como $(\text{Mo}(\text{CN})_8)^{4-}$, $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{4-}$, $(\text{Os}(\text{CN})_6)^{4-}$ y $(\text{W}(\text{CN})_8)^{4-}$ (Morozova *et al.* 2007). Cuando es oxidado por una lacasa, el sustrato pierde un solo electrón y usualmente forma un radical libre. El producto inicial es inestable y puede someterse a una segunda oxidación catalizada por la enzima (por ejemplo, la conversión de fenoles a quinonas) o llevar a cabo reacciones no enzimáticas como hidratación, deprotonación o polimerización (Thurston 1994). La catálisis de las lacasas inicia con la oxidación de la molécula de sustrato en el cobre T1. Posteriormente, los electrones extraídos del sustrato son transferidos al CTN a través del tripéptido His-Cys-His, localizado en L4 (Fig. 1A), resultando en la conversión del estado oxidado de la enzima a un estado completamente reducido. A continuación, el par de cobres T3 transfieren los cuatro electrones al dioxígeno, produciendo dos moléculas de agua (Claus 2003) (Fig. 1A).

La reducción del dioxígeno se lleva a cabo mediante dos pasos secuenciales de transferencia de electrones. En el primer paso, el dioxígeno es reducido por dos electrones provenientes del par de cobres T3 y se genera un intermediario *peroxi*. Luego, los cobres T1 y T2 donan los electrones al intermediario *peroxi*, lo que resulta en la formación de un intermediario nativo, en el cual los cuatro cobres de la lacasa están en su forma oxidada y los átomos del CTN están unidos a grupos oxo e hidroxilo. El ligando facilita la deslocalización de los electrones en el CTN y hace que el intermediario nativo sea propenso a la reducción, permitiendo que la enzima entre rápidamente en otro ciclo catalítico (Giardina *et al.* 2010). La reducción del dioxígeno requiere también la transferencia de cuatro protones provenientes del sustrato. En las lacasas fúngicas la vía de transferencia de protones corresponde a un grupo de aminoácidos especializados cercanos al CTN (Hakulinen *et al.* 2008, Bento *et al.* 2010). Con el fin de reducir el oxígeno molecular, la lacasa opera como una batería

almacenando electrones de las oxidaciones individuales. Por lo tanto, es necesaria la oxidación sucesiva de cuatro electrones para reducir completamente a la enzima, generando así cuatro radicales libres (Bento *et al.* 2010).

Los estudios de cristalografía de rayos X han demostrado que el sitio de cobre T1 exhibe pocos cambios geométricos tras la reducción, dando lugar a altas tasas de transferencia de electrones. En este sentido, el potencial de reducción ($\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+}$) del cobre T1 determina la eficiencia de la catálisis sobre la oxidación de la mayoría de los sustratos de las lacasas (Li *et al.* 2004). Además, factores como la accesibilidad del sustrato, la formación de puentes de hidrógeno, el tipo de ligando axial del cobre T1, la orientación de los dipolos, la distancia entre los ligandos y los átomos de cobre y la distancia entre el cobre T1 y el CTN, afectan el potencial de reducción del cobre T1 (Piontek *et al.* 2002). En las lacasas fúngicas, el potencial de reducción del cobre T1 oscila entre 0.4 y 0.8 V vs ENH (Electrodo Normal de Hidrógeno) (Li *et al.* 2004). Los sustratos que poseen potenciales redox mayores a los calculados para las lacasas no pueden ser oxidados directamente por éstas. No obstante, el rango de sustratos disponibles para las lacasas puede incrementarse mediante la inclusión de mediadores redox de bajo peso molecular como el ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS), el 1-hidroxibenzotriazol (HBT) y el 3-hidroxiantranílico (Claus *et al.* 2007). Esta característica ha sido aprovechada para la aplicación de las lacasas en diversos procesos industriales y biotecnológicos, los cuales se mencionan en el siguiente apartado.

1.4 El sistema de lacasas en hongos y sus aplicaciones

En general, una misma especie fúngica produce más de una isoenzima de lacasa. El número de isoenzimas varía en cada especie y son el resultado de la presencia y expresión de diversos genes de lacasa en el genoma del hongo. También se han reportado isoformas que provienen del mismo gen y que difieren entre sí debido a *splicing* alternativo o modificaciones postraduccionales (Rühl *et al.* 2013). El hongo basidiomicete *C. cinerea* posee 17 genes de lacasa, siendo el mayor reportado hasta el momento en una misma especie fúngica (Kilaru *et al.* 2006). De éstos genes, al menos 5 son expresados funcionalmente y se tienen datos bioquímicos de dos de

ellos (Rühl *et al.* 2013). Otro basidiomiceto con un número elevado de genes de lacasa es *P. ostreatus*, en el que se ha documentado la presencia de 12 genes, de los cuales únicamente 6 se han asociado a la función catalítica y se conocen sus características bioquímicas (Castanera *et al.* 2012). Dentro de los ascomicetos, el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* posee 6 genes de lacasa, todos caracterizados funcionalmente (Cordoba y Roncero 2007). En *Clavariopsis aquatica* se identificaron 5 genes y únicamente 2 se han asociado a actividades catalíticas (Solé *et al.* 2012). La redundancia de genes de lacasa también se ha descrito en *G. graminis* (Litvintseva y Henson 2002), *A. niger* (Tamayo-Ramos *et al.* 2011), *P. anserina* y *N. crassa* (Pöggeler 2011). En la mayoría de éstas especies, los genes de isoenzimas de lacasa se identificaron mediante herramientas bioinformáticas por lo que aún no han sido relacionados a una actividad funcional específica.

En los hongos, la síntesis y secreción de las diferentes isoenzimas de lacasa están influenciada por diversos factores como los niveles de nutrientes, las condiciones de cultivo (Levin *et al.* 2010), el estado de desarrollo del hongo (Lettera *et al.* 2010), así como por la adición de diferentes inductores orgánicos e inorgánicos al medio de cultivo (Pezzella *et al.* 2012). Se ha demostrado el efecto de éstos factores a nivel de la transcripción de los genes de lacasa en muchas especies fúngicas (Piscitelli *et al.* 2011). En la mayoría de éstos trabajos se han reportado respuestas diferenciales entre especies y entre isoenzimas de una misma especie (Rühl *et al.* 2013). Por ejemplo, en el hongo ectomicorrízico *Tuber melanosporum* los genes *Tmelcc1* y *Tmelcc2* presentan diferentes niveles de expresión en tres estados de desarrollo distintos del hongo, sugiriendo diferentes funciones fisiológicas (Zarivi *et al.* 2013). El perfil transcripcional de los genes de lacasa de *P. ostreatus* bajo diferentes condiciones de crecimiento (fermentación en estado sólido, líquido e inducido) mostró un patrón complejo de expresión, siendo los genes *Lacc2* y *Lacc10* los responsables primarios de la actividad de lacasa detectada en el medio de cultivo (Castanera *et al.* 2012). También se demostró la síntesis diferencial de los transcritos de los genes *lcc1*, *lcc2* y *lcc3* en *Corioloopsis rigida*, al adicionar Cu^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+3} , cafeína, anfotericina B y ácido siríngico al medio de cultivo. Además, se encontró que la inducción por cobre está asociada al estado de crecimiento del hongo, siendo

mayor durante la trofofase que durante la idiofase (Saparrat *et al.* 2010). En la cepa I-62 de *Trametes* sp., los genes *lcc1* y *lcc2* son inducidos por la adición de alcohol veratrílico al medio de cultivo en diferentes estados de desarrollo, mientras que el gen *lcc3* no es inducido por dicho alcohol y es reprimido por glucosa (Mansur *et al.* 1998). Dada la multiplicidad de genes de lacasa en los hongos, los ensayos de expresión bajo diferentes condiciones de cultivo y fase de desarrollo son de utilidad para determinar el papel fisiológico de las isoformas encontradas en un mismo organismo. Aunado a ello, el estudio de la regulación de la expresión de los genes de lacasa puede aprovecharse para incrementar los niveles de actividad de lacasas nativas en hongos con fines biotecnológicos.

Como se mencionó anteriormente, tanto la baja especificidad por sustrato como los amplios potenciales redox posibilitan el uso de las lacasas fúngicas en diversos procesos biotecnológicos. Entre las aplicaciones de las lacasas se pueden mencionar la delignificación y blanqueo de pulpa Kraft, el tratamiento de aguas residuales, la remoción de hidrocarburos policíclicos aromáticos y compuestos xenobióticos como pesticidas, explosivos y colorantes, la construcción de celdas de biocombustible y biosensores, la síntesis de pigmentos y compuestos antimicrobianos, y la remoción de lignina de material lignocelulósico (Baldrian 2006, Morozova *et al.* 2007, Giardina *et al.* 2010). Algunas de estas aplicaciones y las especies fúngicas de las cuales provienen las lacasas evaluadas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Aplicaciones biotecnológicas de lacasas fúngicas.

APLICACIÓN	FUENTE	REFERENCIA
Biosensores y células de combustible	<i>Aspergillus oryzae</i>	Kulys y Vidziunaite 2003
	<i>Cerrena unicolor</i>	Jarosz-Wilkolazka <i>et al.</i> 2005
	<i>Trametes hirsuta</i>	Smolander <i>et al.</i> 2008
Campo médico	<i>Myceliophthora thermophila</i>	Mikolasch <i>et al.</i> 2007
	<i>Trametes sp.</i>	Mikolasch <i>et al.</i> 2007
	<i>Paraconiothyrium variabile</i>	Faramarzi y Forootanfar 2011
Industria alimentaria	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Georis <i>et al.</i> 2003
	<i>Trametes versicolor</i>	Minussi <i>et al.</i> 2007
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Mensah <i>et al.</i> 2012
Industria textil	<i>Melanocarpus albomyces</i>	Shaw <i>et al.</i> 2004
	<i>Trametes versicolor</i>	Pazarlioğlu <i>et al.</i> 2005
	<i>Aspergillus niger</i>	Naeem <i>et al.</i> 2008
Procesamiento de lignocelulosa	<i>Trametes hirsuta</i>	Palonen y Viikari 2004
	<i>Trametes hirsuta</i>	Kudanga <i>et al.</i> 2008
	<i>Pycnoporus</i>	Camarero <i>et al.</i> 2007
	<i>Cinnabarinus</i>	
Biorremediación	<i>Corioloopsis gallica</i>	Yagüe <i>et al.</i> 2000
	<i>Lentinula edodes</i>	D'Annibale <i>et al.</i> 2004
	<i>Pycnoporus coccineus</i>	Jaouani <i>et al.</i> 2005
Síntesis orgánica	<i>Coriolus hirsutus</i>	Karamyshev <i>et al.</i> 2003
	<i>Myceliophthora thermophila</i>	Hahn <i>et al.</i> 2009
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Hahn <i>et al.</i> 2009

1.5 Las lacasas como una nueva herramienta en el potencial biotecnológico de *Trichoderma spp.*

Las especies del género *Trichoderma* son hongos ascomicetos de vida libre colonizadores de suelo, raíces y ambientes foliares, que se caracterizan por un rápido crecimiento, su habilidad para asimilar una gran variedad de sustratos y por su capacidad para degradar compuestos tóxicos (Sharma *et al.* 2011). Las especies del género *Trichoderma* se consideran los estados anamórfos del género *Hypocrea*, la fase sexual que se encuentra dentro del orden Hypocreales y la familia Hypocraceae (Samuels 2005). Algunas de las especies de *Trichoderma*, particularmente *Hypocrea jecorina*/*T. reesei* son conocidas como productoras de enzimas y proteínas

recombinantes a nivel industrial, específicamente celulasas y hemicelulasas (Saloheimo y Pakula 2012). Otras, como *H. lixii*/ *T. harzianum*, *H. virens*/ *T. virens* y *H. atroviridis*/ *T. atroviride* producen altos niveles de compuestos antifúngicos, antibióticos, reguladores del crecimiento de las plantas y enzimas degradadoras de pared celular, por lo que son usados como agentes de control biológico contra hongos fitopatógenos y nemátodos (Sharma *et al.* 2011) (Tabla 3).

Tabla 3. Aplicaciones industriales de especies del género *Trichoderma*.

ESPECIE(S)	MOLÉCULA	APLICACIÓN	REFERENCIA
<i>H. jecorinal</i> / <i>T. reesei</i> <i>H. koningii</i> / <i>T. koningii</i> <i>H. horientalis</i> / <i>T. longibrachiatum</i>	Celulasas	Desteñido de telas Detergentes Biopulpeo Clarificación de jugos y vinos Industria del almidón y la panificación Tratamiento de forrajes Producción de biocombustibles	Karmakar y Ray 2011
	Xilanasas	Producción de xilitol Extracción de saborizantes y pigmentos Panificación Peeling enzimático de cereales Estudios estructurales de carbohidratos	Watanabe <i>et al.</i> 2006 Polizeli <i>et al.</i> 2005
<i>H. atroviridis</i> / <i>T. atroviride</i>	Lacasa 6-pentil- α -pirona	Biorremediación Aroma para alimentos	Chakroun <i>et al.</i> 2010 Oda <i>et al.</i> 2009
<i>H. lixii</i> / <i>T. harzianum</i>	Lacasa Lacasa Mutanasa Azafilona Butenolida	Degradación de colorantes Biopulpeo y biorremediación Pasta de dientes Biopesticidas/Biofertilizantes	Sadhasivam <i>et al.</i> 2009 Sadhasivam <i>et al.</i> 2010 Wiater <i>et al.</i> 2005 Vinale <i>et al.</i> 2006
<i>H. koningii</i> / <i>T. koningii</i>	Trichokoninas	Control biológico	Xiao-Yan <i>et al.</i> 2006
<i>H. rufal</i> / <i>T. viride</i>	Lacasa Gliotoxina Gliovirina Viridiol	Micoparasitismo Control biológico Herbicida	Catalano <i>et al.</i> 2011 Mukherjee y Kenerley 2010
<i>H. gelatinosa</i> / <i>T. gelatinosus</i>	Hirsutellone A	Antibiótico	Supothina <i>et al.</i> 2007

La Tabla 2 permite tener una idea del alto impacto que las especies del género *Trichoderma* han tenido sobre la humanidad. No obstante, las posibilidades biotecnológicas de dicho grupo taxonómico están lejos de encontrarse agotadas, reportándose continuamente nuevas características bioquímicas o fisiológicas susceptibles de alguna aplicación. Una de las propiedades bioquímicas a la fecha poco exploradas en *Trichoderma* spp. es la producción de lacasas extracelulares. La actividad de lacasa extracelular ha sido detectada en varias cepas de *Trichoderma* spp., incluidos aislados no identificados a nivel de especie (Flegel *et al.* 1982, Assavaning *et al.* 1992), así como en distintas cepas de *T. atroviride* (Hölker *et al.* 1999), *T. viride*, *T. reesei*, *T. harzianum* (Hölker *et al.* 2002; Pokorný *et al.* 2005) y *T. longibrachiatum* (Krastanov *et al.* 2007; Gochev y Krastanov, 2007).

Recientemente se ha reportado la purificación y caracterización bioquímica de una lacasa extracelular de la cepa silvestre CTM 10476 de *T. atroviride* (Chakroun *et al.* 2010). Dicha cepa mostró una actividad máxima de 4.36 U/mL hacia el ζ ? de cultivo en presencia de CuSO_4 . La enzima purificada presentó un peso molecular de 80 kDa y un pI de 3.5. La lacasa fue estable en un intervalo de pH entre 4 y 5, siendo el óptimo de 3 para la oxidación del ABTS y de 5 para la de 2,6-Dimetoxifenol (2,6-DMP). La proteína retuvo el 80% de su actividad luego de 4 h de incubación a 40 °C, mostrando actividad óptima a 50 °C en presencia de 2,6-DMP. La documentada capacidad de las lacasas extracelulares de especies del género *Trichoderma* para oxidar compuestos xenobióticos que incluyen tanto pesticidas como colorantes (Sadhasivam *et al.* 2009, Chakroun *et al.* 2010, Sadhasivam *et al.* 2010), genera amplias perspectivas para su aplicación en procesos de biorremediación.

La evidencia sobre la participación de las lacasas en procesos fisiológicos y ecológicos en especies de *Trichoderma* spp. es escasa. En ese sentido, se ha reportado la supuesta actividad de lacasa asociada a la pared celular de conidias de *T. harzianum* y *T. atroviride*, proponiéndose su participación en la síntesis de pigmentos (Hölker *et al.* 2002). Mas recientemente se utilizó la cepa Δtku70 de *T. virens* para determinar la participación de la lacasa LCC1 en el micoparasitismo de esclerocios de los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Catalano *et al.* 2011). La cepa Δtku70 tiene eliminado el gen de la proteína KU70, la

cual participa en procesos de reparación de ADN mediante recombinación no-homóloga, por lo que al eliminar dicha proteína se incrementa la posibilidad de generar mutantes específicas mediante la recombinación homóloga. De manera interesante, en la cepa silvestre el gen *lcc1* mostró una inducción de la transcripción significativa únicamente en etapas tempranas de la colonización de esclerocios de *B. cinerea*, mientras que en el caso de la colonización de esclerocios de *S. sclerotiorum*, los niveles de transcrito estuvieron altos a lo largo de todo el proceso. La eliminación del gen *lcc1* (mutante $\Delta tku70\Delta lcc1$) alteró la habilidad de *T. viride* para atacar a los dos tipos de esclerocios; no obstante, mientras que la capacidad para parasitar esclerocios de *B. cinerea* se redujo significativamente, la invasión contra esclerocios de *S. sclerotiorum* incrementó. Tomados en conjunto, los datos del estudio de Catalano *et al.* (2011) sugieren la participación de la lacasa LCC1 de *T. viride* en más de un mecanismo de micoparasitismo, que funciona de manera diferencial dependiendo del hongo fitopatógeno en cuestión.

Es importante hacer énfasis en el hecho de que el estudio de Catalano *et al.* (2011) es el único en cual se describe un gen de lacasa extracelular en *Trichoderma* spp. y se analiza su regulación transcripcional. No obstante, no existe información alguna respecto a las características estructurales del (los) gen(es) o la(s) proteína(s) en dicho grupo taxonómico. La falta de análisis genético molecular sobre la actividad de lacasa extracelular limita el conocimiento sobre el papel fisiológico y disminuye las posibilidades de aplicación biotecnológica de dicha actividad enzimática en especies del género *Trichoderma*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Assavanig, A., Amornkitticharoen, B., Ekpaisal, N., Meevootisom, V., Flegel, T. W. 1992. Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 198–202.
- [2] Baldrian, P. 2006 Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215–242.
- [3] Bento, I., Silva, C. S., Chen, Z., Martins, L. O., Lindley, P. F., Soares, C. M. 2010. Mechanisms underlying dioxygen reduction in laccases. Structural and modelling studies focusing on proton transfer. *BMC Structural Biology* 10:28.

- [4] Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, Á. T., Romero, J., Gutiérrez, A., del Río, J. C. 2007. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology* 40(5): 1264–71.
- [5] Castanera, R., Pérez, G., Omarini, A., Alfaro, M., Pisabarro, A. G., *et al.* 2012. Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 78(11): 4037–45.
- [6] Catalano, V., Vergara, M., Hauzenberger, J. R., Seiboth, B., Sarrocco, S., *et al.* 2011. Use a non-homologous end-joining-deficient strain ($\Delta ku70$) of the biocontrol fungus *Trichoderma virens* to investigate the function of the laccase gene *lcc1* in sclerotia degradation. *Current Genetics* 57: 13–23.
- [7] Chakraborty, H., Mechichi, T., Martinez, M. J., Dhouib, A., Sayadi, S. 2010. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry* 45: 507–513.
- [8] Claus, H. 2003 Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* 179: 145–150.
- [9] Cordoba, C. D., Roncero, M. I. G. 2008. Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 98 (5): 509–519.
- [10] Crowe, J. D., Olsson, S. 2001. Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Applied and Environmental Microbiology* 67(5): 2088–94.
- [11] D'Annibale, A., Ricci, M., Quarantino, D., Federic F., Fenice, M. 2004. *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research in Microbiology* 155: 596–603.
- [12] Dittmer, N. T., Suderman, R. J., Jiang, H., Zhu, Y. C., Gorman, M. J., Kramer, K. J., Kanost, M. R. 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 29–41.
- [13] Ducros, V., Marek, B. A., Wilson, K. S. Brown, S. H. Ostergaard, P, Schneider, P. *et al.* 1998. Crystal structures of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Structural Biology* 5: 310–316.
- [14] Eggert, C. 1997. Laccase is responsible for antimicrobial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Microbiological Research* 152:315–318.
- [15] Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. D., Eriksson, K. E. L. 1995. Laccase mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. *FEBS Letters* 376:202–204.
- [16] Eisenman, H. C., Mues, M., Weber, S. E., Frases, S., Chaskes, S., *et al.* 2007. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology* 153: 3954–62.

- [17] Fang, W., Fernandes, E. K. K., Roberts, D. W., Bidochka, M. J., Leger, R. J. S. 2010. A laccase exclusively expressed by *Metarhizium anisopliae* during isotropic growth is involved in pigmentation, tolerance to abiotic stresses and virulence. *Fungal Genetics and Biology* 47(7): 602–607.
- [18] Faramarzi, M. A., Forootanfar, H. 2011. Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles produced by laccase from *Paraconiothyrium variable*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 87: 23–27.
- [19] Fernández-Larrea, J., Stahl, U. 1996. Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserine*. *Molecular Genetics and Genomics* 252: 539–551.
- [20] Ferraroni, M., Myasoedova, N. M., Schmatchenko, V., Leontievsky, A. A., Golovleva, L. A., Scozzafava, A., Briganti, E. 2007. Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. *BMC Structural Biology* 7:60.
- [21] Flegel, T. W., Meevootisom, V., Kiatpapan, S. 1982. Indications of Ligninolysis by *Trichoderma* strains isolated from soil during simultaneous screening for fungi with cellulase and laccase activity. *Journal of Fermentation Technology* 60(5): 473–475.
- [22] Galhaup, C., Haltrich, D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 225–232.
- [23] Garavaglia, S., Cambria, M. T., Miglio, M., Ragusa, S., Lacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Rizzi, M. 2004. The Structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *Journal of Molecular Biology* 342: 1519–1521.
- [24] Ge, H., Gao, Y., Hong, Y., Zhang, M., Xiao, Y., Teng, M., Niu, L. 2010. Structure of native laccase B from *Trametes* sp. AH28-2. *Acta Crystallographica* F66: 254-258.
- [25] Georis, J., Lomascolo, A., Camarero, S., Dorgeo, V., Herpoel, I., Asther, M., et al. 2003. *Pycnoporus cinnabarinus* laccases: an interesting tool for food or non-food applications. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet* 68: 263–266.
- [26] Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 369–385.
- [27] Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 369–385.

- [28] Gochev, V. K., Krastanov, A. I. 2007. Fungal laccases (Review) *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 13: 75–83.
- [29] Hahn, V., Mikolasch, A., Manda, K., Gördes, D., Thurow, K., Schauer, F. 2009. Laccase-catalyzed carbon–nitrogen bond formation: coupling and derivatization of unprotected L-phenylalanine with different para-hydroquinones. *Amino Acids* 37(2): 315–321.
- [30] Hakulinen, N., Andberg, M., Kallio, J., Koivula, A., Kruus, K., Rouvinen, J. 2008. A near atomic resolution structure of a *Melanocarpus albomyces* laccase. *Journal of Structural Biology* 162: 29–39.
- [31] Hakulinen, N., Kiiskinen, L. L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., Rouvinen, J. 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural and Molecular Biology* 9 (8): 601–605.
- [32] Hölker, H., Dohse, J., Höfer, M. 2002. Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiologica* 47(4): 423–427.
- [33] Hölker, H., Ludwing, S., Scheel, T., Höfer, M. 1999. Mechanisms of coal solubilization by the deuteromycetes *Trichoderma atroviride* and *Fusarium oxysporum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 57–59.
- [34] Jaouani, A., Guillen, F., Penninckx, M. J., Martinez, A. T., Martinez, M. J. 2005. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 478–486.
- [35] Jarosz-Wilkolazka, A., Ruzgas, T., Gorton, L. 2005. Amperometric detection of mono- and diphenols at *Cerrena unicolor* laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure. *Talanta* 66:1219–24.
- [36] Kallio, J. P., Gasparetti, C., Andberg, M., Boer, H., Koivula, A., Kruus, K., Rouvinen, J., Hakulinen, N. 2011. Crystal structure of an ascomycete fungal laccase from *Thielavia arenaria* – common structural features of asco-laccases. *FEBS Journal* 278(13): 2283–95.
- [37] Karamyshev, A. V., Shleev, S. V., Koroleva, O. V., Yaropolov, A. I., Sakharov, I. Y. 2003. Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 556–564.
- [38] Karmakar, M., Ray, R. R. 2011. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology* 6(1): 41–53.
- [39] Kellner, H., Luis, P., Buscot, F. 2007. Diversity of laccase-like multicopperoxidase genes in *Morchellaceae*: identification of genes potentially involved in extracellular activities related to plant litter decay. *FEMS Microbial and Ecological* 61: 153–163.
- [40] Kiiskinen, L. L., Rättö, M., Kruus, K. 2004. Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology* 97: 640–646.

- [41] Kilaru, S., Hoegger, P. J., Kües, U. 2006. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Current Genetics* 50: 45–60.
- [42] Krastanov, A. I., Gochev, V. K., Girova, T. D. 2007. Nutritive medium dependent biosynthesis of extracellular laccase from *Trichoderma* spp. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 13: 349–355.
- [43] Kudanga, T., Prasetyo, E. N., Sipila, J., Nousiainen, P., Widsten, P., Kandelbauer, A., *et al.* 2008. Laccase-mediated wood surface functionalization. *Engineering in Life Sciences* 8(3): 297–302.
- [44] Kulys, J., Vidziunaite, R. 2003. Amperometric biosensors based on recombinant laccases for phenols determination. *Biosensors Bioelectron* 18: 319–25.
- [45] Kumar, S., Phale, P., Durani, S., Wangikar, P. P. 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering* 83(4): 386–394.
- [46] Kunamneni, A., Ballesteros, A., Plou, F. J., Alcalde, M. 2007. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Mendez-Vilas, A. Ed., pp. 233–244, Formatex, Badajoz, Spain, 2007.
- [47] Larrondo, L. F., Salas, L., Melo, F., Vicuña, R., Cullen, D. 2003. A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. *Applied and Environmental Microbiology* 69(10): 6257–63.
- [48] Lettera, V., Piscitelli, A., Leo, G., Birolo, L., Pezzella, C., Sannia, G. 2010. Identification of a new member of *Pleurotus ostreatus* laccase family from mature fruiting body. *Fungal Biology* 114: 724–730.
- [49] Levin, L., Malignani, E., Ramos, A. M. 2010. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technology* 101: 4554–63.
- [50] Li, H., Webb, S. P., Ivanic, J., Jensen, J. H. 2004. Determinants of the relative reduction potentials of type-1 copper sites in proteins. *Journal of the American Chemical Society* 126: 8010–19.
- [51] Litvintseva, A. P., Henson J. M. 2002. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Applied and Environmental Microbiology* 68(3): 1305–1311.
- [52] Lyashenko, A. V., Bento, I., Zaitsev, V. N., Zhukhlistova, N. E., Zhukova, Y. N. *et al.* 2006a. X-ray structural studies of the fungal laccase from *Cerrena maxima*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11: 963–973.

- [53] Lyashenko, A. V., Zhukova, Y. N., Zhukhlistova, N. E., Zaitsev, V. N., Stepanova, E. V. *et al.* 2006b. Three-dimensional structure of laccase from *Coriolus zonatus* at 2.6 Å resolution. *Crystallography Reports* 51(5): 817–823.
- [54] Mansur, M., Suárez, T., González, A. E. 1998. Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environmental Microbiology* 64(2): 771–774.
- [55] Matera, I., Gullotto, A., Tilli, S., Ferraroni, M., Scozzafava, A., Briganti, F. 2008. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with *p*-toluate. *Inorganica Chimica Acta* 361: 4129–37.
- [56] McCaig, B. C., Meagher, R. B., Dean, J. F. D. 2005. Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 221: 619–636.
- [57] Mensah, C. A., Adamafio, N. A., Amaning-Kwarteng, K., Rodrigues, F. K. 2012. Reduced tannin content of laccase-treated cocoa (*Theobroma cacao*) pod husk. *International Journal of Bifurcation and Chaos* 6: 31–36.
- [58] Mikolasch, A., Niedermeyer, T. H. J., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E., Schauer, F., *et al.* 2007. Novel cephalosporins synthesized by amination of 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives using fungal laccases. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 55: 412–416.
- [59] Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., Durán, N. 2007. Phenols removal in musts: strategy for wine stabilization by laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 45(3–4): 102–107.
- [60] Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., Yaropolov, A. I. 2007. “Blue” Laccases. Review. *Biochemistry (Moscow)* 72(10): 1136–1150.
- [61] Mukherjee, P. K., Kenerley, C. M. 2010. Regulation of morphogenesis and biocontrol properties in *Trichoderma virens* by a VELVET protein, Vel1. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(7): 2345–52.
- [62] Naeem, A., Abdul, H., Safia, A., Abdul, G. K. 2008. Decolorization of structurally different textile dyes by *Aspergillus niger* SA1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1067–72.
- [63] Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Ogawa, M., Saito, K., Takesawa, T., Kanda, K., Sato, T. 2003. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology* 149: 2455–2462.
- [64] Nakamura, K., Kawabata, T., Yura, K., Go, N. 2003. Novel types of two-domain multi-copper oxidases: possible missing links in the evolution. *FEBS Letters* 553: 239–244.

- [65] Oda, S., Isshiki, K., Ohashi, S. 2009. Production of 6-pentyl-(alpha)-pyrone with *Trichoderma atroviride* and its mutant in a novel extractive liquid-surface immobilization (Ext-LSI) system. *Process Biochemistry* 44:625–630.
- [66] Palonen, H., Viikari, L. 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnology and Bioengineering* 86(5): 550–557.
- [67] Pazarlioğlu, N. K., Sarişik, M., Telefoncu, A. 2005. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochemistry* 40: 1673–78.
- [68] Pezzella, C., Lettera, V., Piscitelli, A., Giardina, P., Sannia, G. 2012. Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* DOI 10.1007/s00253-012-3980-9.
- [69] Piontek, K., Antorini, M., Choinowsky, T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry* 277(40): 37663–9.
- [70] Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., Faraco, V. 2011. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics* 12: 104–112.
- [71] Pöggeler, S. 2011. Evolution of multicopper oxidase genes in coprophilous and non-coprophilous members of the order sordariales. *Current Genomics* 12: 95–103.
- [72] Pokorný, R., Vargovič, P., Hölker, U., Janssen, M., Bend, J., Hudecová, D., Varečka, L. 2005. Developmental changes in *Trichoderma viride* enzymes abundant in conidia and the light-induced conidiation signalling pathway. *Journal of Basic Microbiology* 45(3): 219–229.
- [73] Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Amorim, D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 577–597.
- [74] Polyakov, K. M., Fedorova, T. V., Stepanova, E. V., Cherkashin, E. A., Kurzeev, S. A. *et al.* 2009. Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D* 65: 611–617.
- [75] Quintanar, L., Stoj, C., Taylor, A. B., Hart, P. J., Kosman, D. J., Solomon, E. I. 2007. Shall we dance? How a multicopper oxidase chooses its electron transfer partner. *Accounts of Chemical Research* 40: 445–452.
- [76] Ramesh, G., Sweera, R., Reddy, M. S. 2008. Enhancement of laccase in ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* in presence of different substrates. *Advances in Environmental Biology* 2(3): 115–120.
- [77] Rodgers, C. J., Blanford, C. F., Giddens, S. R., Skamnioti, P., Armstrong, F. A., Gurr, S. J. 2009. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? Review. *Trends in Biotechnology* 28(2): 63–72.

- [78] Rühl, M., Majcherczyk, A., Kües, U. 2013. Lcc1 and Lcc5 are the main laccases secreted in liquid cultures of *Coprinopsis cinerea* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 103: 1029–39.
- [79] Rulíšek, L., Ryde, U. 2013. Theoretical studies of the active-site structure, spectroscopic and thermodynamic properties, and reaction mechanism of multicopper oxidases. *Coordination Chemistry Reviews* 257: 445–458.
- [80] Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. 2009. Redox-mediated decolorization of recalcitrant textile dyes by *Trichoderma harzianum* WL1 laccase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 1733–41.
- [81] Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. 2010. Deployment of *Trichoderma harzianum* WL1 laccase in pulp bleaching and paper industry effluent treatment. *Journal of Cleaner Production* 18: 799–806.
- [82] Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K., Feng-Huei, Lin. 2008. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry* 43: 736–742.
- [83] Saloheimo, M., Pakula, T. M. 2012. The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Microbiology* 158: 46–57.
- [84] Samuels, G. J. 2005. Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 195–206.
- [85] Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27: 185–194.
- [86] Saparrat, M., Balatti, P. A., Martínez, M. J., Jurado, M. 2010. Differential regulation of laccase gene expression in *Coriopsis rigida* LPSC No. 232. *Fungal Biology* 114: 999–06.
- [87] Schouten, A., Maksimova, O., Cuesta-Arenas, Y., van den Berg, G., Raaijmakers, J. M. 2008. Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4 diacetylphloroglucinol. *Environmental Microbiology* 622(10): 1145–57.
- [88] Sharma, P., Goel, R., Capalash, N. 2007. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 823–832.
- [89] Sharma, P., Kumar, P. V., Ramesh, R., Saravanan, K., Deep, S., et al. 2011. Biocontrol genes from *Trichoderma* species: A review. *African Journal of Biotechnology* 10(86): 19898–07.
- [90] Shaw, S. D., Freeman, H. S. 2004. Dyes from enzyme-mediated oxidation of aromatic amines. *Textile Research Journal* 74: 215–22.
- [91] Smolander, M., Boer, H., Valkiainen, M., Roozeman, R., Bergelin, M., et al. 2008. Development of a printable laccase-based biocathode for fuel cell applications. *Enzyme and Microbial Technology* 43(2): 93–102.

- [92] Solé, M., Müller, I., Pecyna, M. J., Fetzer, I., Harms, H., Schlosser, D. 2012. Differential regulation by organic compounds and heavy metals of multiple laccase genes in the aquatic hyphomycete *Clavariopsis aquatic*. *Applied and Environmental Microbiology* 78(13): 4732–39.
- [93] Supothina, S., Isaka, M., Wongsu, P. 2007. Optimization of culture conditions for production of the anti-tubercular alkaloid hirsutellone A by *Trichoderma gelatinosum* BCC 7579. *Letters in Applied Microbiology* 44(5): 531–537.
- [94] Tamayo-Ramos, J. A., Barends, S., Verhaert, R. M. D., de Graaff, L. H. 2011. The *Aspergillus niger* multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccase-like encoding genes. *Microbial Cell Factories* 10(1): 78.
- [95] Taylor, A. B., Stoj, C. S., Ziegler, L., Kosman, D. J., Hart, P. J. 2005. The copper-iron connection in biology: structure of the metallo-oxidase Fet3p. *PNAS* 102(43): 15459–64.
- [96] Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Mycrobiology* 140: 19–26.
- [97] Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E., Lorito, M., Sivasithamparam, K. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology* 43(2): 143–148.
- [98] Vite-Vallejo, O., Palomares, L. A., Dantán-González, E., Ayala-Castro, H. G., Martínez-Anaya, C. *et al.* 2009. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology* 45: 233–239.
- [99] Wang, H. X., Ng, T. B. 2004. Purification of a novel low-molecular mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315(2): 450–454.
- [100] Watanabe, N., Akiba, T., Kanai, R., Harata, K. 2006. Structure of an orthorhombic form of xylanase II from *Trichoderma reesei* and analysis of thermal displacement. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 62(7): 784–792.
- [101] Wiater, A., Szczodrak, J., Pleszczyńska, M. 2005. Optimization of conditions for the efficient production of mutan in streptococcal cultures and post-culture liquids. *Acta Biologica Hungarica* 56:137–150.
- [102] Wong, J. H., Ng, T. B., Jiang, Y., Liu, F., Cho, S., Sze, W., Zhang, K. Y. 2010. Purification and characterization of a laccase with inhibitory activity toward HIV-1 reverse transcriptase and tumor cells from an edible mushroom (*Pleurotus cornucopiae*). *Protein and Peptide Letters* 17(8): 1040–47.
- [103] Worrall, J. J., Chet, I., Hutterman, A. 1986. Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria* spp. *Journal of General Microbiology* 132: 2527–33.

- [104] Xiao-Yan, S., Qing-Tao, S., Shu-Tao, X., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S., Yu-Zhong, Z. 2006. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters* 260(1): 119–125.
- [105] Yagüe, S., Terrón, M. C., González, T., Zapico, E., Bocchini, P., Galletti, G. C., González, A. E. 2000. Biotreatment of tannin-rich beer-factory wastewater with white-rot basidiomycete *Corioloopsis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14(10): 905–910.
- [106] Youngchim, S., Pornsuwan, S., Nosanchuk, J. D., Dankai, W., Vanittanakom, N. 2011. Melanogenesis in dermatophyte species in vitro and during infection. *Microbiology* 157: 2348–56.
- [107] Zarivi, O., Bonfigli, A., Colafarina, S., Aimola, P., Ragnelli, A. M., Miranda, M., Pacioni, G. 2013. Transcriptional, biochemical and histochemical investigation on laccase expression during *Tuber melanosporum* Vittad. Development. *Phytochemistry* 87: 23–29.
- [108] Zhu, X., Williamson, P. R. 2004. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research* 5: 1-10.

II. HIPÓTESIS

Las especies del género *Trichoderma* producen lacasas extracelulares con características bioquímicas semejantes, codificadas por genes relacionados estructural y filogenéticamente.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el sistema de lacasas en *Trichoderma* spp.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar cepas productoras de lacasa extracelular a partir de aislados silvestres de *Trichoderma* spp. Depositados en el Cepario Michoacano Universitario.
- Caracterizar los genes y las proteínas putativas de lacasa extracelular tanto en cepas de colección como en aislados silvestres de *Trichoderma* spp.
- Evaluar la posible regulación transcripcional de la actividad de lacasa extracelular en *T. atroviride* durante el proceso de micoparasitismo.

IV. RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO I

**Cázares-García SV, Vázquez-Garcidueñas MS, Vázquez-Marrufo G (2013)
Structural and phylogenetic analysis of laccases from *Trichoderma*: a
bioinformatics approach.**

ARTÍCULO I

Se reporta la identificación y caracterización bioinformática de los genes codificantes de lacasas *sensu stricto* en las especies de *Trichoderma* spp. de las cuales se cuenta con la secuencia completa del genoma; se documenta el análisis estructural y filogenético para diferenciar las lacasas intracelulares de las extracelulares y se propone un modelo evolutivo sobre la actividad de lacasa en el género *Trichoderma*. Artículo publicado en la revista internacional indizada *PLoS ONE*.

Structural and Phylogenetic Analysis of Laccases from *Trichoderma*: A Bioinformatic Approach

Saila Viridiana Cázares-García¹, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas², Gerardo Vázquez-Marrufo^{1*}

¹ Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico, ² División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico

Abstract

The genus *Trichoderma* includes species of great biotechnological value, both for their mycoparasitic activities and for their ability to produce extracellular hydrolytic enzymes. Although activity of extracellular laccase has previously been reported in *Trichoderma* spp., the possible number of isoenzymes is still unknown, as are the structural and functional characteristics of both the genes and the putative proteins. In this study, the system of laccases *sensu stricto* in the *Trichoderma* species, the genomes of which are publicly available, were analyzed using bioinformatic tools. The intron/exon structure of the genes and the identification of specific motifs in the sequence of amino acids of the proteins generated *in silico* allow for clear differentiation between extracellular and intracellular enzymes. Phylogenetic analysis suggests that the common ancestor of the genus possessed a functional gene for each one of these enzymes, which is a characteristic preserved in *T. atroviride* and *T. virens*. This analysis also reveals that *T. harzianum* and *T. reesei* only retained the intracellular activity, whereas *T. asperellum* added an extracellular isoenzyme acquired through horizontal gene transfer during the mycoparasitic process. The evolutionary analysis shows that in general, extracellular laccases are subjected to purifying selection, and intracellular laccases show neutral evolution. The data provided by the present study will enable the generation of experimental approximations to better understand the physiological role of laccases in the genus *Trichoderma* and to increase their biotechnological potential.

Citation: Cázares-García SV, Vázquez-Garcidueñas MS, Vázquez-Marrufo G (2013) Structural and Phylogenetic Analysis of Laccases from *Trichoderma*: A Bioinformatic Approach. PLoS ONE 8(1): e55295. doi:10.1371/journal.pone.0055295

Editor: Alfredo Herrera-Estrella, Cinvestav, Mexico

Received: September 27, 2012; **Accepted:** December 20, 2012; **Published:** January 31, 2013

Copyright: © 2013 Cázares-García et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors are grateful for the support of the Coordinación de la Investigación Científica-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CIC-UMSNH), Research Support Program 2012. SVCG acknowledges a scholarship from CONACYT-México for doctoral studies. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx

Introduction

Laccases (benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) are metalloenzymes that belong to the multicopper oxidase (MCO) family. These enzymes catalyze the oxidation of various aromatic substrates with the concomitant reduction of molecular oxygen to water. This redox process is mediated by two centers that contain four atoms of copper in their +2 oxidation state. These copper atoms are classified as T1 (blue copper), T2 or T3 according to their spectroscopic characteristics [1]. Laccases are generally monomeric glycoproteins with molecular weights that range from 60 to 70 kDa, and up to 30% of their molecular weight is made up of carbohydrates [2]. These enzymes are widely distributed in nature, and the physiological functions that they perform depend both on their origin and on their biochemical and structural properties. In fungi, laccase activities have been related to the degradation of lignocellulose material, the production of pigments, sporulation, processes of morphogenesis, phenomena of pathogenesis toward plants and animals [3], the oxidation of antibiotics produced by microorganisms that are antagonists of plant pathogens and antimicrobial components of plants, such as flavonoids or phytoalexins [4]. This great functional versatility is partly due to the fact that laccases possess low substrate specificity and exhibit a broad range of redox potentials [2]. Because of this

flexibility, these enzymes are able to act on ortho- and para-diphenols, methoxy-substituted phenols, aromatic diamines and benzenothioles. Furthermore, these enzymes can oxidate organic and inorganic metallic compounds. In addition, the gamut of substrates for laccases can extend to non-phenolic compounds through the inclusion of redox mediators, with which they are able to oxidize large polymers, such as lignin, cellulose or starch [5]. This peculiarity has been exploited by various biotechnological processes, including biopulping, bioremediation, the breakdown of colorants, the enzymatic conversion of chemical intermediates and the synthesis of pharmaceutical products, among others [6].

The majority of laccases used in biotechnology are derived from fungal species. The presence of laccases has been documented in various groups of fungi, including yeasts [7], filamentous ascomycetes [8] and white [9] and brown rot fungi [10], as well as mycorrhizal species [11]. In general, until now it has been found that fungi produce more than one laccase enzyme, the expression of which are closely related to environmental conditions or the stage of the life cycle and lifestyle of the fungus [12,13]. For these reasons, these enzymes are synthesized in variable quantities, which makes the identification of the complete laccase system in a single species difficult. The characterization of families of laccase genes has progressed due to the availability of genomic sequences. Tblastn analysis has allowed for the definition of the complete

number of laccase genes and their corresponding proteins in both basidiomycete [11,14,15] and ascomycete fungi [8,12].

Species of the genus *Trichoderma* are characterized by rapid growth, the ability to assimilate a large variety of lignocellulose substrates and resistance to toxic chemical products [16]. Several species in the genus, particularly *T. reesei*/*Hypocrea jecorina*, are good producers of extracellular enzymes that degrade plant cell walls, such as cellulases and hemicellulases, for which reason they have been used in the production of recombinant proteins at industrial levels. Other species, such as *T. harzianum*/*H. lixii*, *T. virens*/*H. virens* and *T. atroviride*/*H. atroviridis*, are used as biological control agents against fungal pathogens of plants and nematodes [17].

Extracellular laccase activity has been detected in various strains of *Trichoderma* spp., including isolates not identified at the species level [18] as well as distinct strains of *T. viride*, *T. reesei*, *T. atroviride* and *T. longibrachiatum* [19,20]. Laccase activity associated with the conidia of *T. atroviride*, *T. viride* and *T. harzianum* has also been documented. In these strains, it is hypothesized that the enzyme is found in the membrane or in the periplasmic space [21,22]. Recently, the purification and characterization of extracellular laccases in wild strains of *T. harzianum* [23], *T. atroviride* [24] and *T. reesei* [25] have been documented. Catalano *et al.* [26] have evaluated the role of an extracellular laccase from *T. virens* in the mycoparasitism of that species against the sclerotia of the phytopathogens *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*.

Despite the fact that currently there are access to the complete sequence of the genomes of *T. atroviride*, *T. virens* [27], *T. reesei* [28], *T. harzianum* (<http://genome.jgi-psf.org/Triha1/Triha1.home.html>) and *T. asperellum* (<http://genome.jgi-psf.org/Trias1/Trias1.home.html>), at this date, an *in silico* analysis has not been performed that would characterize the number of genes coding for laccase activity in these species and the structural characteristics of the coded proteins.

It has been documented that laccases *sensu stricto* from ascomycetes has a number of signatur characteristics not present in laccases from basidiomycetes. These signatures that are additional to the LI–LA domains [29] and allow differentiate such proteins from other Multi-copper oxidases (MCOs), includes an SDS-gate [30], a C-terminal DSSL/I/V domain [31], and the presence of a F/L residue in axial coordination of the T1 copper [32]. Although two of the studies cited above included a search to detect the presence of laccases in some of the genomes available for the species of the *Trichoderma* genus [25,26], a comparative analysis of the identified genes to elucidate the number of laccases *sensu stricto*, the relationships between them, their possible cellular localization and their putative functions has not been performed. This analysis constitutes the principal objective of the present study.

Materials and Methods

From the NCBI GenBank database, we obtained the sequences of various multicopper oxidases, including those of *Saccharomyces cerevisiae* (Fet3p, 763529), *Melanocarpus albomyces* (Laccase, 40788173), *Cucurbita maxima* (Ascorbate oxidase, 885589) and *Myrothecium verrucaria* (Bilirubin oxidase, 456712), which were used as queries to search for laccase genes in species of *Trichoderma*. Various members of the family of MCOs were used to assure the identification of all possible laccases in the genomes analyzed based on the identity of copper binding sites. In addition, only the genes and sequences of amino acids from crystallized proteins were used, for which there is no doubt regarding their identity. A Blastp/Blastn analysis was performed on the database of the public genomes of *T. asperellum* (<http://genome.jgi-psf.org/Trias1/>

<http://genome.jgi-psf.org/Trias1/home.html>), *T. atroviride* (<http://genome.jgi-psf.org/Triat2/Triat2.home.html>), *T. harzianum* (<http://genome.jgi-psf.org/Triha1/Triha1.home.html>), *T. virens* (http://genome.jgi-psf.org/TriviGv29_8_2/TriviGv29_8_2.home.html) and *T. reesei* (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>). Sequences were selected for the presence of the four preserved motifs of copper-binding characteristic of all MCOs.

To analyze the structural characteristics of *Trichoderma* spp. laccases, the online programs of the Center for Biological Sequence Analysis (CBS) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) were used. The programs SignalP Version 4.0 and PrediSi were used to determine the presence of the peptide signal for secretion and putative cleavage sites, whereas NetNGlyc 1.0 was used to determine the sites of N-glycosylation (Asn-XXX-Ser/Thr). For those proteins that were classified as intracellular, we used the packages TargetP Version 1.1, iPSORT (<http://ipsort.hgc.jp/>) and MitoProt (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) to establish their putative subcellular localization. The position and composition of the cupredoxin domains were analyzed in SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>).

For the phylogenetic analysis of the putative sequences of laccase, multiple alignment was performed with CLUSTALX Version 2.0.11 (<http://www.clustal.org/clustal2/>) using the pre-determined parameters. The sequences used for phylogenetic analysis with their respective accession numbers for GenBank and JGI genome portal are presented below (the key used in this article for each species appears in parentheses). **Ascomycetes:** *Ajellomyces dermatitidis* (Ade) 327349048; *Arthroderma gypseum* (Agy) 315039999; *Aspergillus niger* (Ani) fge1_e_gw1_12.409, e_gw1_4.1637, gw1_10.607; *Botryotinia fuckeliana* (Bfu) 15022487, 15022489, 347830053; *Botrytis aclada* (Bac) 378942783; *Chaetomium globosum* (Cgl) CHGG03552.1, CHGG02290.1, CHGG10025.1, 06172.1; *Colletotrichum lagenarium* (Cla) 12862766; *Cryphonectria parasitica* (Cpa) 167469, 69047730; *Fusarium oxysporum* (Fox) 152013644; *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* (Ggg) 19309738, 19309740; *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) 19171197, 19171195, 19171193; *Hortaea acidophila* (Hac) 63146072, 67773582; *Magnaporthe oryzae* (Mor) 389627974; *Melanocarpus albomyces* (Mal) 40788173; *Monilia fructigena* (Mfr) 120431232; *Myceliophthora thermophila* (Mth) 367028915; *Myriocoonium* sp. (Msp) 160332827; *Neurospora crassa* (Ncr) NCU9279.5, NCU05604.5, NCU05113, NCU04528, NCU02201.5, NCU07920.5, NCU09023.5, NCU00526.5; *Phoma* sp. (Psp) 166812033; *Podospira anserina* (Pan) Pa_7_4200, Pa_5_4660, Pa_5_1200, Pa_5_9860, Pa_6_7880, Pa_7_3560, Pa_1_15470; Pa_1729781, Pa_5_4140; *Pyrenophora tritici-repentis* (Ptr) 189188518, 189192570; *Sclerotinia minor* (Smi) 120431228; *Sclerotinia sclerotiorum* (Ssc) 156056931; *Sordaria macrospora* (Sma) SMAC09326, SMAC06098, SMAC03641, SMAC03042, SMAC09228, SMAC09572, SMAC01222; *Sporotrichum thermophile* (Sth) 99853; *Thielavia arenaria* (Tar) 333361328; *Thielavia terrestris* (Tte) 2011187; *Trichoderma asperellum* (Tas) 154312, 71665, 68620; *Trichoderma atroviride* (Ta) 54145, 40409; *Trichoderma harzianum* (Th) 539081; *Trichoderma reesei* (Tr) 122948; *Trichoderma virens* (Tv) 48916, 194054; *Yarrowia lipolytica* (Yli) 340748006. **Basidiomycetes:** *Agaricus bisporus* (Abi) 2833227, 2833228; *Coprinopsis cinerea* (Cci) 42721544, 4838342, 4838344, 4838346; *Coriolopsis gallica* (Cga) 12484399; *Coriolus hirsutus* (Chi) 167465; *Gelatorpina subvermispora* (Gsu) 31088842; *Lentinula edodes* (Led) 18146854, 18146856, 6466812; *Marasmius quercophilus* (Mqu) 6318611; *Pleurotus ostreatus* (Pos) 15594026, 2833235, 2833237, 3006039; *Polyporus ciliatus* (Pci) 9957143, 9957145, 9957147; *Pycnoporus cinnabarinus* (Pcn) 10179427, 3128389, 5732664; *Trametes pubescens* (Tpu) 20270770; *Trametes* sp. (Tsp) 21616730, 56785436; *Trametes trogii* (Ttr) 119416759; *Trametes versicolor* (Tve) 15778442, 2388517,

2593857; *Trametes villosa* (Tv4) 2842752, 2842753; *Valsariella cokeana* (Vvo) 42416980. **Plant:** *Arabisidaea italiana* (Ach) 332191557; *Rhus venicifera* (Rve) 19912797. Redundant sequences, that is, those from the same species with an identity greater than 95%, were discarded.

The alignments obtained were manually adjusted. Based on the generated alignments, phylogenetic trees were constructed with MEGA Version 5.05 (<http://megasoftware.net/>) through the Neighbor Joining method using three different models of evolutionary distance (p -distances, Dayhoff and Jones-Taylor-Tornton). Statistical significance was evaluated with a bootstrapping of 1000 repetitions. The phylogenetic trees were confirmed using the maximum likelihood method (data not shown), and the alignments were differentially edited to corroborate the topology of the obtained trees.

A phylogram of the analyzed species of *Trichoderma* was constructed using the *tpi2* gene (coding for RNA polymerase B II) through Bayesian analysis in accordance with [27]. The rates of synonymous and non-synonymous substitutions of *Trichoderma* laccases in the nucleotide sequences aligned by codons were calculated with the SNAP package (www.hiv.lanl.gov/content/sequence/SNAP/SNAP.html).

Results and Discussion

Number and Structure of Laccase Genes in *Trichoderma*

To determine the number of laccase genes in the five analyzed species of *Trichoderma*, we conducted a Blastp/Blastn analysis of the database of the genome of each species. The search produced a total of 47 sequences that presented the four copper binding motifs characteristic of MCOs. In *T. reesei*, a total of 7 genes were identified: in *T. harzianum*, 9 genes; *T. atroviride* and *T. virans* presented 10 genes each, and in *T. asperellum*, 11 genes were found. To determine which of the identified genes coded for laccases *sensu stricto*, the structural characteristics previously reported in the literature that distinguish laccases from other copper blue oxidases were sought based on a comparative analysis of laccase sequences and crystallographic evidence (Table 1). Based on this analysis, a single gene coding for laccases was found in *T. reesei* and *T. harzianum*, two genes were found in *T. atroviride* and *T. virans* and three genes in *T. asperellum* (Table 2); the rest of the identified genes belong to other members of the MCO family and were not considered in further analyses.

The number of laccase genes in ascomycete fungi varies considerably. Among the species that are characterized by having a larger number of laccase genes are *P. oosporina* and *S. macrospora* with 9 genes [12], *N. crassa* with 8 [12], *A. niger* with 6 [3], and *C.*

globosum with 4 [13]. Among the species characterized by having a low number of laccase genes are *G. graminis* with 3 genes in *var. vitici* [33] and 2 in *var. graminis* [33]. Yeasts are a particular case within the ascomycetes, as it has been reported that they do not have laccase genes [13], although the presence of 2 genes [7] has been documented in *H. acidiphila*. Thus, *Trichoderma* belongs within the group of fungi with a low number of laccase genes. Nevertheless, the results of the structural analysis performed in the present study indicate that the laccase genes previously reported in ascomycetes should be reviewed in the future, as it is possible that several of them do not code for *sensu stricto* laccases (see below).

To determine the relative position of the laccase genes in the genomes of all *Trichoderma* species, approximately 15 kb upstream and downstream regions were analyzed in each case. This analysis shows that the different laccase encoding genes within the same genome of the analyzed species are not arranged in clusters, but are far from each other. It was also found that the genomic context of the corresponding orthologous genes is similar between all analyzed species (data not shown). In general, the genes encoding for intracellular laccases show a higher synteny than the extracellular ones. To date, there are no data in the literature that allow us to compare the relative position of laccase genes for ascomycetes. However, the arrangement of the laccase genes in *Trichoderma* is consistent with what was found in the basidiomycete *L. bicolor*, where most laccases encoding genes are randomly distributed [11]. Nevertheless, the existence of laccase gene clusters has been observed in *C. cinerea* [14] and *P. ostreatus* [10]. These differences in genomic architecture indicate that this type of genes does not have a conserved location within fungal genomes but that their disposition reflects the evolutionary history of each species.

The nucleotide sequence length of *Trichoderma* spp. laccase encoding genes varies between 1765 (Tas_154312) and 2303 bp (Tas_71665). The GC percentage of these genes ranges from 46% (Tas_71665) to 58% (Tr_122948). The number and position of introns in laccase encoding genes in fungi have been employed to classify them into subfamilies [11,14]. The structure of the genes found in the five species of *Trichoderma* separates them into three subfamilies. In each subfamily, the number of introns is preserved, and their positions are similar (Fig. 1). The first subfamily exhibits an intron between 64 and 68 bp in size and is made up of a gene of each one of the species *T. atroviride*, *T. asperellum* and *T. virans* (Fig. 1A). The second subfamily is characterized by having two introns of between 53 and 111 bp, with one of these genes being found in the five species of *Trichoderma* (Fig. 1B). In general, the subdivision of *Trichoderma* laccase encoding genes in these two

Table 1. Observed signature sequences in laccases.

Signature	Reference
Axial coordination	Leu or Phe [32]
L1	H-W-H-G-X9-D-G-X5-QCPI [29]
L2	G-T-X-W-Y-H-S-H-X3-Q-Y-C-X-D-G-L-X-G-X-(FLIM)
L3	H-P-X-H4-H-G-H
L4	G-(PA)-W-X-(LFV)-HCH-DAE-X-H-X3-G-(LMF)-X3-(LFM)
SDS gate	Ser143, Ser511 and Asp561 in Talcc1 [42]
C-termini	Asp-Ser-Gly-(Leu/le/Val) [31]

In the fungal laccase signature sequences L1-L4, an X represents an undefined residue, whereas the multiple residues within brackets represent a partially conserved residue.

doi:10.1371/journal.pone.0055295.t001

Table 2. Accession numbers and structural characteristics of laccases *sensu stricto* from *Trichoderma* spp.

Species	ID ^a	Length precursor	Signal P ^b	N-glycosylation Asn-X-Ser/Thr ^b	MW ^c (kDa)	pI ^d
<i>T. asperellum</i>	154312	566	VLA-FP	N91, N120, N132, N232, N245, N273, N309, N409, N544	62.05	4.35
	68620	590	nd	nd	64.90	6.25
	71665	600	AVA-LS	N36, M85, N129, N320, N351, N351, N421, N425, N455, N472, N508	66.34	5.43
<i>T. atroviride</i>	54145	566	VYA-FP	N91, N120, N132, N232, N245, N273, N290, N309, N402, N544	61.83	4.44
	40409	590	nd	nd	65.21	6.51
	539081	589	nd	nd	65.16	4.97
<i>T. harzianum</i>	539081	589	nd	nd	65.16	4.97
<i>T. reesei</i>	122948	568	nd	nd	63.37	6.06
	48916	566	VCA-IP	N91, N120, N132, N232, N245, N273, N309, N402, N412, N426, N544	62.14	4.32
<i>T. virens</i>	194054	588	nd	nd	65.23	6.49

^aID, identification number in the *Trichoderma* species genome; ^bDenotes the location of signal peptide cleavage sites in amino acid sequences from *Trichoderma* laccases; nd, non detected. ^cMW, estimated molecular weight. ^dpI, predicted isoelectric point.
doi:10.1371/journal.pone.0055295.t002

subfamilies is in agreement with previous reports of a low number of introns in this type of genes in the ascomycetes. In two varieties of *G. graminis*, the gene sequences of *LAC1* and *LAC2* present 2 introns [33], just as in the single gene for extracellular laccase reported for the aquatic species *Myriocentrum* sp. [34]. The presence of 3 introns has been reported in the *lac2* gene [35] in the case of *P. anserina* and in the *Belcc1* and *Belcc2* genes of *B. cinerea* [4]. In the yeast *H. acidophila*, 3 introns have been documented in the gene that encodes for the extracellular enzyme and 2 for the intracellular enzyme gene [7]. A unique case is that of the Tas_71665 gene of *T. asperellum*, with a structure of seven introns and for which no orthologous genes were found in the other analyzed *Trichoderma* species (Fig. 1C). The only ascomycetes laccase gene that surpasses this number is the *lac-1* gene of *C. parasitica*, which possesses 12 introns [36]. These two last genes represent intermediaries in the structure of introns/exons between the majority of ascomycetes and the basidiomycetes *C. cinerea* and *L. bicolor*, in which two subfamilies of genes have been found whose number of introns varies between 13 and 15 [11,14]. The introns found in the *Trichoderma* laccase genes preserve the splicing sites that comply with the GT/AG rule [37]. Previous data show the usefulness of the number and location of introns for generating subfamilies of ascomycetes laccase genes. This information could be useful for the identification of genes with distinct functions within a single species or for recognizing the same gene in different species. This analysis is beyond the scope of the present study and should be conducted in greater detail in the future. Interestingly, as a demonstration of the usefulness of gene family classification based on the presence of introns, the subfamilies of laccase genes formed in *Trichoderma* agree with classes established according to laccase protein structural characteristics (see below).

Structural Characteristics of *Trichoderma* Laccases

In general, the identification of laccases according to their amino acid sequence involves the recognition of the four segments L1–L4 [29]. However, such regions are common to all MCO family members including ascorbate oxidases, ferroxidases and

bilirubin oxidases, meaning that their presence is not sufficient to confirm that a protein sequence corresponds to a laccase *sensu stricto*. Because of this finding, in the present study we also considered the SDS-gate and the C-terminus end, which are distinctive characteristics of ascomycetes laccases (Table 1). The set of structural characteristics found in the amino acid sequence of *Trichoderma* laccases is detailed below.

The analysis of the amino acid sequences of the 9 putative laccases that were found shows that their lengths are similar to the typical laccases of fungi (566–600 aa), and the calculated molecular mass for the protein sequences is between 61.83 and 66.84 kDa with acidic isoelectric points (Table 2). These results are in agreement with what has previously been reported for fungal laccases, which regularly have molecular weights between 60 and 70 kDa and which have isoelectric points (pI) that vary between pH 4.0–6.0 [3]. In particular, within the genus *Trichoderma*, purified laccases from the wild strains WL1 of *T. harzianum* and CTM 10476 of *T. atroviride* presented, in their glycosylated form, molecular weights of 79 and 80 kDa, respectively [23,24]. Analysis in SWISS-MODEL of the proteins found in the genomes reviewed in this study showed that each one of the sequences is formed by three cupredoxin domains that are ordered in sequential form and are common to all the MCO family members [30]. As expected, the residues of amino acids that bind to copper T1 were located in domain I, whereas the residues that coordinate coppers T2/T3 were distributed between domains I and III (Fig. 2).

Laccases are distinguished by the presence of four consensus sequences, L1–L4, which possess a length of between 8 and 24 amino acid residues and are distributed along the polypeptide chain. Within these regions, one finds amino acid residues that serve as ligands for the copper atoms, as well as other preserved or partially preserved residues, which are critical for maintaining the conformational folding of the enzyme. Such characteristic sequences are found based on the multiple alignment of more than 100 laccases of plants and fungi [29] and represent the distinctive mark for the identification of putative new laccases.

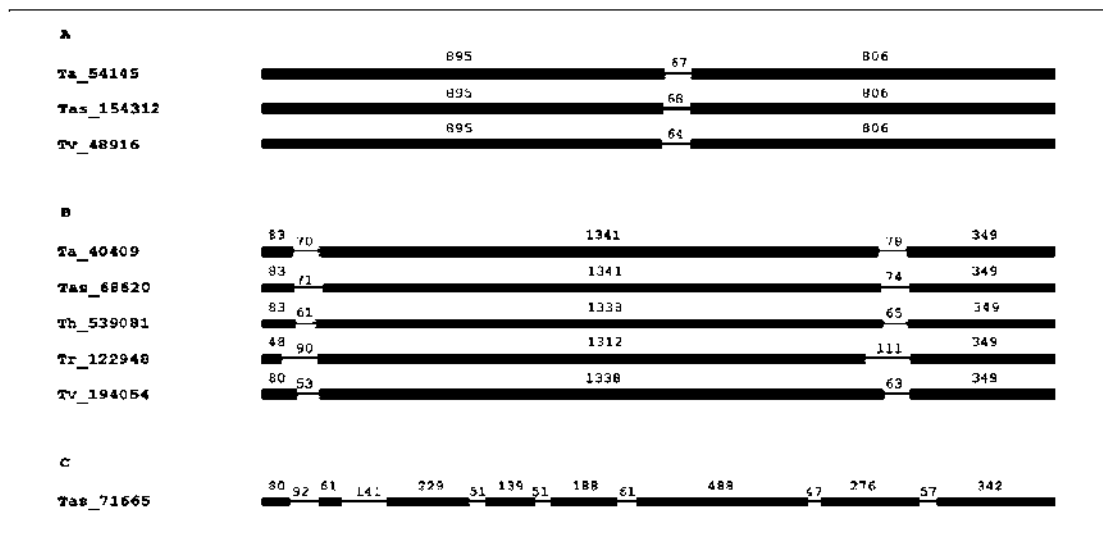


Figure 1. Intron positions within the laccase genes of *Trichoderma* spp. define three gene subfamilies. The thin lines indicate intron positions and the black lines indicate the exons. The first subfamily (A) contains only one intron, the second subfamily (B) contains two introns and the final (C) subfamily contains seven introns.

doi:10.1371/journal.pone.0055295.g001

Regions L1–L4 in the *Trichoderma* sequences have a high degree of similarity with the consensus designated by [29] (Fig. 2). However, some amino acid residues differ from the consensus. This finding is especially evident in L2, where Thr is replaced by a Ser in the second position. This change of amino acid is found in the Lac2 of *G. graminis* var. *tritici* and *G. graminis* var. *graminis* [33], as well as in the Lac1 of *B. fuckeliana* (anamorph = *B. cinerea*) [4], both of which are ascomycete fungi. In this same segment, in *Trichoderma*, changes in the consensus QYCDGL are observed: Tyr is replaced by Ala, Cys by Ser/Ala/Trp, Asp by Gly/Glu and Leu by Val (Fig. 2). Thus, the results obtained here show that although laccases of basidiomycetes fully comply with the consensus designated by L2 [15], this region varies considerably in ascomycete laccases. In segments L1 and L4 of the *Trichoderma*, gene changes that involve residues of amino acids with propensities toward similar conformations or similar hydrophobic indices are observed. For example, in L1, Trp is replaced by Phe (Fig. 2). This same change is observed in *C. parasitica* Lac3 [38]. In segment L4, the amino acid located 10 residues downstream from the preserved Cys corresponds to the axial position of copper T1. This residue is usually a Met in the MCOs; however, in the laccases, the Met residue is replaced by a Leu or Phe [39], as in the *Trichoderma* spp. putative laccases (Fig. 2).

Axial coordination is one of the factors affecting the redox potential (E_0) of laccases [39]. It has been previously suggested that laccases with high E_0 (700–800 mV) possess a Leu or Phe in axial coordination, whereas laccases with a Met residue have low E_0 (500 mV). Based on the substitution of this residue, laccases are classified into three classes: Lac 1 (M, Met), Lac 2 (L, Leu) and Lac 3 (F, Phe) [32]. Taking this characteristic into account, the putative laccases Ta_40409, Tas_68620, Th_539081, Tr_122948 and Tv_194054, are classified as Lac 2, whereas Tas_71665, Tas_154312, Ta_54145 and Tv_48916 are classified as Lac 3. These results are consistent with the hypothesis that Lac 1 laccases are primarily present in plants [32]. This classification has been

performed in one isoenzyme of each of the ascomycetes: *C. parasitica*, *N. crassa*, and *P. anserina*, belonging to class 2 [32]. Although this classification is still used to elucidate the functional relatedness between laccases, it is important to take into account that crystallographic data obtained from native high potential laccase of *T. versicolor* (TvL) have helped to describe other structural characteristics that might contribute to high E_0 in these enzymes [40]. Such structural features include a reduction of electron density in the metal and the ligating amino acid. In high redox potential laccases, the distance between Ca^{2+} and one of the histidines from the T1 binding pocket is longer compared with that in enzymes of the middle potential group; the hydrogen bond between Glu-160 and Ser-113 in TvL seems to be responsible for this [40]. Interestingly, this particular serine is conserved in *Trichoderma* laccases, but the Glu residue is not present. Furthermore, it is well known that several factors can affect the E_0 value of metalloproteins, including electrostatic intramolecular interactions, and solvation effects [41]. It is important to conduct further studies that allow for determining those factors involved in the modulation of redox potential in *Trichoderma* laccases.

Laccases have been the subject of intense investigation directed at understanding both their catalytic mechanism and the molecular determinants that modulate their broad range of E_0 [40]. Although the laccase reaction scheme is not entirely understood, it is known that both binding and the oxidation of the substrate occurs in the T1 site and the electrons are transferred to the T2/T3 center, where the reduction of molecular oxygen takes place [40]. The reduction of a dioxygen molecule to two water molecules requires four electrons and four protons. The electron transfer pathway to the trinuclear center corresponds to the preserved motif Hys-Cys-Hys located at L4 [39], which is present in *Trichoderma* laccases (Fig. 2). Conversely, proton transfer is assisted by the so-called SDS-gate [30]. This gate is formed by two residues of Ser and one of Asp and is conserved in ascomycete laccases but has not been detected in basidiomycete laccases. In 7.

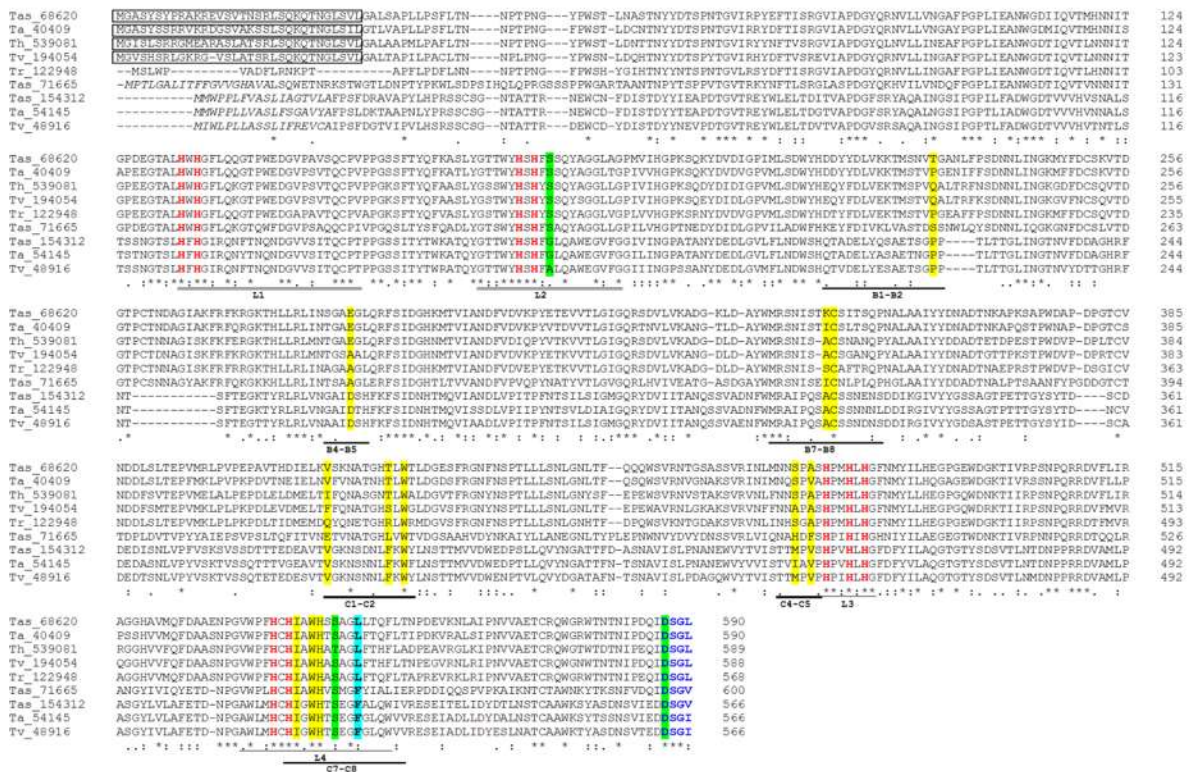


Figure 2. Alignment of laccase sequences from *Trichoderma* spp. The alignment was constructed with the Clustal X multiple-sequence alignment program. The accession number of each sequence in the JGI GeneBank is indicated on the left of the alignment. An asterisk indicates that the residues at a position are identical in all sequences in the alignment; a colon indicates that conserved substitutions have been observed and a period indicates semiconserved substitutions. Putative signal sequences are indicated by italics and the mitochondrial targeting peptides are enclosed in boxes. The conserved residues involved in copper binding are in red, and the complete L1–L4 regions are indicated by a double line under the alignment. The sequences of potential substrate loops were identified based on loops I–IV of the rMaL [44] and TaLcc1 [42], laccases of *M. albomyces* and *T. arenaaria*, respectively, and are underlined with a bold line. Amino acids shaded in yellow indicate residues in contact with the substrate. The residues forming the SDS gate are shaded in green in color, and the amino acid shaded in blue classified the laccases as class 1 (Met), class 2 (Leu) or class 3 (Phe). The conserved C-termini are in dark blue. doi:10.1371/journal.pone.0055295.g002

arenaaria laccase TaLcc1, this gate is formed by Ser143, Ser511 and Asp561 [42]. Multiple alignment with TaLcc1 identified the SDS-gate amino acids in *Trichoderma* spp. laccases (Fig. 2). However, in Tas_154312 and Ta_54145, the amino acid that corresponds to Ser143 in TaLcc1 is replaced by Gly and in Tv_48916, by Ala. Additionally, in Th_539081, the residue that corresponds to Ser511 in TaLcc1 is replaced by a Thr (Fig. 2). This result suggests that *Trichoderma* laccases have adopted various strategies to facilitate the transfer of protons to the trinuclear site, thus modifying its catalytic activity.

An essential aspect of the catalytic activity of laccases is the mode of interaction and reaction with various substrates. The availability of a chemical compound to be used as a laccase substrate depends on both the nature and position of the substituents in the phenolic ring of the compound and also on the chemical environment of the substrate binding site. The

amino acid residues that constitute the substrate cavity form loops and are found in domains II and III. In the laccases of various organisms, the loops have different amino acid compositions, which results in diversity in the size and shape of the substrate binding site [43]. The nine *Trichoderma* spp. proteins present the substrate binding sites that are described in the tridimensional structure of crystallized laccases. As in other laccases, the sequences that form loops I–IV are little conserved in comparison with MaL and TaLcc1 (wild proteins of *M. albomyces* and *T. arenaaria*, respectively), except in loop IV in C7–C8, which is also part of the L4 segment (Fig. 2). It has been determined that Pro192 in MaL (Ala193 in TaLcc1) in the loop I/B1–B2 interacts with the organic substrate [31]. This residue is present in five *Trichoderma* spp. laccases, although in this position, Th_539081 and Tv_194054 possess a Gln residue whereas Tas_68620 and Tas_71665 have Thr and Ser,

respectively (Fig. 2). In B4-B5, fungal laccases typically have Glu or Asp as the substrate ligand [31,42]. Directed mutagenesis studies performed on MaL have shown that the Glu235 (Asp 236 in TaLcc1) carboxy group is of great importance for substrate binding because it stabilizes the cationic radical that is formed when Hys503 initiates the catalytic cycle [44]. However, in Tas_71665, Tr_122948 and Tv_194054, this residue is replaced by Ala. The multiple alignment of these sequences with other members of the MCO family revealed that in the same position, Ala is only present in a laccase of the dermatophyte fungus *A. gyrocum* (anamorph = *Microrhizium gyp-seum*). In the recombinant *M. albobryces* laccase (rMaL) expressed in *T. reesei*, the Cys residue of the tripeptide Ala297-Cys298-Gly299 (Leu297-Cys298-Gly299 in TaLcc1) located in loop II/B7-B8 is conserved in *Trichoderma* spp. laccases. This amino acid is also involved in substrate binding and was found in *N. crassa*, *P. anserina* and *C. parasitica* laccases [44]. Furthermore, the involvement of rMaL Phe427 (Val428 in TaLcc1) of loop IV/G4-G5 in aligning substrate molecules in the correct orientation for oxidation has been suggested [44]. In the laccases of various organisms, including *Trichoderma* spp., this residue varies considerably, although the majority of basidiomycete laccases display Pro in this position. The differences found in the loop sequences of *Trichoderma* spp. laccases suggest a low substrate specificity and, most likely, various catalytic capacities, which indicates that each possesses different physiological functions, which is reinforced by subcellular localization (see below).

A preserved segment of four residues of amino acids has been identified at the C-terminal end of *Trichoderma* spp. laccases (Fig. 2), a highly conserved sequence in ascomycetes corresponding to the consensus Asp-Ser-Gly-Leu/Ile/Val. In laccases of the ascomycetes *M. albobryces* [31], *P. anserina* [35], *T. armaria* [42], *N. crassa* [45] and *M. thermophila* [46] the C-terminal end is post-translationally processed, leaving the active protein with the sequence Asp-Ser-Gly-Leu (DSGL) as the final amino acid residues at this end. As in the *Trichoderma* spp. laccases, the majority of ascomycete laccases do not present this C-terminal extension, which is removed post-translationally. Determination of the three-dimensional structure of MaL and TaLcc1 revealed that the C-terminal end DSGL is packed within a tunnel that leads to the trinuclear site and forms a plug [31]. In the crystal structure of other known laccases, this cavity is open and allows molecular oxygen to access the catalytic site [42]. In MaL and TaLcc1, the C-terminus plug impedes the movement of molecular oxygen and other solvents to the enzyme. Furthermore, the C-terminus carboxyl group forms a hydrogen bridge with the lateral chain of Hys140 in MaL (Hys141 in TaLcc1), which also coordinates copper ^{II}. Directed mutagenesis studies performed on MaL cDNA revealed that a change or deletion of the C-terminal end dramatically affects enzyme activity [47]. Given those findings, it was suggested that ascomycete laccases use the C-terminal DSGL plug to carry out their catalytic function, forming a proton transfer pathway [42]. The C-terminus block appears to be a characteristic trait of ascomycete laccases because it has not been described in basidiomycete laccases. Nevertheless, *Rigidobolus lignarius* RIL laccase presents the C-terminus sequence DSGLA. Among basidiomycete laccases, RIL is the most closely related phylogenetically with ascomycete laccases; for this reason, it was initially suggested that this sequence of the C-terminal end was more an evolutionary relic than a functional characteristic of the enzyme [39]. However, more recent observations documented in this study have shown that the C-terminal end DSGL is not an evolutionary relic in fungi, as it provides important functions for the ascomycete enzyme. Furthermore, even when laccases of basidiomycetes lack

DSGL motif, it was recently established –using directed evolution approach– that the C-terminus would play a role in enzyme performance by influencing optimal pH and *k_{in}* values for phenolic compounds [48]. This evidence requires further comparative studies between ascomycetes and basidiomycetes regarding the evolution of the C-terminal end and its functional role.

In the course of the analysis to identify laccases *sensu stricto* in *Trichoderma* and to compare them with those reported in other ascomycetes, the particular case of the 6 enzymes reported for *Aspergillus niger* [8] emerged, specifically those designated as Mco G, Mco J and Mco M. When we perform an analysis to find the signatures of laccases *sensu stricto* (Table 1), we find that the Mco G protein lacks the DSGL motif. Furthermore, Mco J and Mco M have a deletion of approximately 50 aa immediately after the I4 segment, which includes the DSGL motif. Interestingly, it was found that these two last “truncated” enzymes oxidize a limited number of substrates, whereas the former attacks all probed substrates. This suggests that some laccases from ascomycetes can be partially functional even if not presenting all the elements to be considered as laccases *sensu stricto*. These beings a special case and beyond the objectives of the present work, further analyses of these three enzymes were not performed and they were excluded from the phylogenetic analysis (see below).

Over the course of the evolutionary process, laccases have maintained a high degree of similarity in terms of amino acid sequence and three-dimensional structure. Generally, the laccase sequences of members of a group of fungi exhibit levels of amino acid identity of 50% or more, whereas the identity levels between sequences of members of different groups is approximately 30% [49]. These identity values are met, in general, for *Trichoderma* spp. laccases. The identity percentage among the 9 laccases varied between 30 and 88% (Table 3). The Tas_54145/Tas_514312/Tv_48916 triad is more similar among themselves with an identity value above 83%. The rest of the laccases possess identity values between 51 and 86%. An identity percentage comparison between laccases of a single species has not been conducted in ascomycetes. In the case of basidiomycetes, the percentages of identity of the 8 *C. cinerea* laccases varied between 46 and 77% [50], whereas in the case of *P. ostreatus*, these values were between 45 and 89% between the 6 enzymes found [49]. Thus, *Trichoderma* laccases present a greater interval of identity than those found in basidiomycete species, indicating a strong selective pressure on the various genes.

With respect to their relationship to the laccases of other fungal species, Tas_154312, Ta_54145 and Tv_48916 proteins share 53% identity with *G. graminis* var. *tritici* and *G. graminis* var. *graminis* Lac2 [33] and an identity of between 63 and 65% with *F. oxysporum* Lcc4 laccase [10]. The group of enzymes Tas_68630, Ta_40409, Th_539081, Tr_122948 and Tv_194054 possess an identity greater than 63% with *F. oxysporum* lcc1 [10] and less than 30% with other ascomycete laccases. Interestingly, *F. oxysporum* lcc1 laccase is an intracellular laccase like the *Trichoderma* laccases, which show a stronger phylogenetic relation with it (see below). The Tas_71665 protein has an identity of between 51.4 and 56.2% with the putative laccases of *B. fuckeliana*, *S. sclerotiorum* and *P. tritici* *repentis*. The identities of the nine *Trichoderma* spp. laccases with respect to crystallized MaL and TaLcc1 laccases are between 27 and 37%. When comparing *Trichoderma* laccases with those from the basidiomycete fungi *T. versicolor*, *P. ostreatus* and *A. bisporus*, the identity is below 25%. The identity values clearly show the separation of the *Trichoderma* spp. laccases into three subfamilies, which is directly related to the putative subcellular localization of laccases *sensu stricto* (see following paragraph).

Table 3. Identity (%) among protein sequences of the members of the *Trichoderma* laccase family.

	Protein	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Tas_68620	85.4	76.9	77.7	77.1	53.1	31.7	32.1	30.9
2	Ta_40409		75.2	76.1	76.1	53.1	33.6	33.4	32.7
3	Th_539081			86.7	75.7	52.1	30.5	31.5	30.5
4	Tv_194054				77.3	51.9	32.1	32.4	31.0
5	Tr_122948					51.0	30.6	31.0	30.8
6	Tas_71665						30.9	31.0	30.4
7	Tas_154312							88.5	86.2
8	Ta_54145								83.7
9	Tv_48916								

Proteins designated as the corresponding genes in the JGI GeneBank.
doi:10.1371/journal.pone.0055295.t003

Prediction of Subcellular Localization of *Trichoderma* spp. Laccases and Possible Physiological Functions

The majority of known fungal laccases are monomeric proteins with extracellular activity, although intracellular laccases have also been identified, particularly in white rot fungi [3]. The localization of laccases is associated with their physiological function and determines the range of substrates available for the enzyme. In fungi, the functions of extracellular laccases related to the degradation of lignocellulose material, recycling of organic material, reduction of oxidative stress and pathogenesis toward plants and animals have been extensively studied [3,4]. Of the nine *Trichoderma* spp. laccases, it was determined that four correspond to extracellular laccases: one each in *T. atroviride* and *T. viride*, and two in *T. asperellum*. The rest are intracellular proteins found in the five species analyzed (Table 2). The putative signal peptide of the extracellular laccases corresponds to the first 18 residues and presents the typical characteristics of signal peptides, that is, a highly hydrophobic region and Ala and Val residues in positions -1 and -3, respectively, relative to the cleavage site [51]. The mature forms of the laccases Tas_71665, Tas_154312, Ta_54145 and Tv_48916 possess between 9 and 11 putative N-glycosylation sites (Table 2). The average glycosylation is usually between 10 and 25%, although laccases with a carbohydrate content of greater than 30% have been detected [2]. Glycosylation influences enzyme secretion, and it has been suggested to play an important role in catalytic center stabilization, protection against hydrolysis, copper retention, and laccase thermal stability [52]. Extracellular laccase activity has previously been reported in *Trichoderma* spp. [18,21], arriving in certain cases at purification of the protein [23,24]. Levasseur *et al.* [25] reported homologous overexpression of the *T. reesei* gene 124079 in the strain Rut-C30, and even when the recombinant protein presented biochemical properties similar to those reported for other laccases, the structural analysis carried out in this study suggests that the enzyme TrLAC1 studied by those authors corresponds to a pigment synthesis MCO and not to a laccase *in sensu stricto*. That is, the amino acid sequence obtained for this enzyme does not present either the SDS-gate or the C-terminal end DSGL/V. Recently, Catalano *et al.* [26] evaluated the participation of the extracellular *T. viridis* LCC1 laccase (corresponding to laccase Tv_48916 analyzed in this study) in mycoparasitism towards sclerotia of the phytopathogens *B. cinerea* and *S. sclerotiorum*. The hypothesis in that study was that LCC1 is capable of attacking the sclerotia melanin of the studied fungi. However, although their results show that the enzyme can participate in mycoparasitism by

T. reesei against *S. sclerotiorum*, the same result was not obtained against *B. cinerea* sclerotia, making it necessary to conduct more studies in this area. It would also be important to experimentally evaluate other functions of extracellular *Trichoderma* laccases, such as those cited at the beginning of this section.

The analysis carried out with various bioinformatic packages suggests the intracellular localization of laccases Ta_40409, Tr_122948, Tv_194054, Th_539081 and Tas_68620. Unlike extracellular laccases, little is known about the activity of intracellular laccases, both for the genus *Trichoderma* and for other fungal species. In several reports, the presence of laccase activity associated with the membrane or periplasmic space during the maturation of *T. atroviride*, *T. viride* and *T. harzianum* conidia [21,22] has been suggested. The results of the present study show that *Trichoderma* spp. do not possess laccases associated with the plasma membrane, such laccase activity associated with conidia reported in those studies is possibly due to the extracellular enzyme that remained trapped in the periplasmic space or the cell wall during the process of maturation of these structures. In this sense, fungal proteins have been reported to be located either adhering to the cell wall or in the extracellular medium, among which are included hydrophobins and adhesins [53,54], as well as hydrolytic enzymes [55]. Although, in certain cases, the interaction of the protein with the cell wall is only transitory, occurring while the protein reaches the extracellular medium, in other cases, specific mechanisms have been proposed for the retention of the proteins in the wall and their simultaneous localization in the extracellular medium [56]. There has also been documentation of *Aspergillus* enzymes that are secreted into the medium when the fungus is grown in a solid substrate but are retained in the cell wall when the fungus grows in submerged cultures [57]. This finding indicates that it is possible that some *Trichoderma* laccases remain trapped in the periplasmic space or cell wall during conidia maturation, which is a possibility that should be investigated more thoroughly in the future. In ascomycetes, the activity of intracellular laccase has been detected in *H. acidophila* and has been related to the synthesis of melanin [7]. In the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*, laccase activity is found to be associated with the membrane and constitutes a virulence factor [56], whereas the phytopathogenic fungus *F. oxysporum* possesses two intracellular laccases, Lcc1 and Lcc3, which may be involved in the protection of the fungus against oxidative stress and toxic compounds [10]. In the basidiomycetes *L. bicolor* [11] and *P. ostreatus* [15], these isoenzymes are involved in the development of the fruiting body. In addition, it is possible that the intracellular

laccases of fungi participate in the transformation of low molecular weight phenolic compounds produced in the cell [3]. Laccases associated with conidia are linked to the synthesis of pigments and other substances that protect the cell from stress factors, such as enzymatic lysis, temperature and UV light [3,10]. It is possible that *Trichoderma* intracellular laccases are related to any of the processes described above; further experimental work is needed to confirm any of these functions.

Surprisingly, when using various bioinformatics programs to analyze four of the laccases classified as intracellular by the package SignalP 4.0, the laccases presented a signal peptide and processing characteristics of mitochondrial localization (Fig. 2; Table 4). The MitoProt program shows processing sites congruent with the mitochondrially located peptide of the other packages (Table 4). These results should be viewed cautiously, as currently there are no reports of mitochondrial localization of laccases either in fungi or in any other biological group in which this enzymatic activity has been found.

With the unexpected finding of signs mitochondrial localization of laccase in *Trichoderma*, the first question that arises is whether this is feasible for enzymes that in fungi have only been reported as either cytoplasmic or associated with the plasma membrane or extracellular. Possible hypotheses, assuming that the prediction of mitochondrial localization is correct, arise from what has been documented for proteins in other fungi. There are examples in fungi of subcellular localization changes or the presence in two distinct cellular compartments of the same enzymatic activity. The latter case has been referred to as dual localization, dual targeting or dual distribution [58]. In *S. cerevisiae*, it has been found that up to a third of the proteins considered to be mitochondrial can present an alternative subcellular localization [59]. Among the best-studied examples of dual mitochondria-cytoplasmic localization in fungi are aconitase [60] and fumarate [61]. Moreover, in these two examples, the proteins present in mitochondria and cytoplasm come from the same gene, which generates a single transcript and a single translation product, that is, they are not isoenzymes in distinct compartments. However, in these two examples, the "original" localization of the protein is mitochondrial, and the "new" localization is cytoplasmic, which is the opposite of what would be occurring with the products of *Trichoderma* laccase proteins. Nevertheless, it is possible to consider the relocation of a secretion protein to mitochondria in fungi. Recently it has been documented that tryptophan-rich sensory protein/peripheral-type benzodiazepine receptor (referred to as

TspO/MBR) that is found in the Golgi-associated secretory pathway in plants is directed toward mitochondria when expressed heterologously in *S. cerevisiae* [62]. The modification of the subcellular localization of a protein may be caused by a change of a single amino acid in the signal peptide, which can be generated by a single nucleotide mutation [63].

The second question that arises pertains to the function of a laccase in mitochondria. Experimental evidence suggests that a protein that reaches a new subcellular location can develop new functions [63]. Although it is difficult to speculate about the possible function of a mitochondrial laccase in fungi, it is feasible to establish hypotheses based on our understanding of the structural aspects of this enzyme. As mentioned above, laccases are enzymes that can bind four copper atoms, which are important for catalytic activity. Intracellular Cu^{2+} can have damaging effects because it induces the formation of reactive oxygen species (ROS); therefore, there are mechanisms that regulate its concentration [64]. Further, it has been documented that mitochondria possess a pool of copper that responds to changes in copper levels in the cytoplasm [65]. It is possible that the mitochondrial location of *Trichoderma* laccases contributes to the homeostasis of mitochondrial Cu^{2+} under particular circumstances, which is a possibility that would be important to evaluate experimentally in the future.

The prediction of the subcellular localization of eukaryotic proteins is a complicated task in that there is always a certain degree of uncertainty; therefore, protocols and bioinformatics packages have been designed that have optimized the certainty of the prediction [66]. Although speculative hypotheses are proposed in agreement with bioinformatics and experimental evidence collected in eukaryotes in general and in fungi in particular, it would be most prudent to assume that the four *Trichoderma* enzymes can be considered to be intracellular, which is supported by the phylogenetic analysis (see following paragraph). The here described role of putative mitochondrial signal peptides in the subcellular localization of *Trichoderma* laccases can be experimentally verified in the future. One way to do this, is to design an expression vector in which the putative mitochondrial target sequences are fused to the green fluorescent protein (gfp) gene and monitoring the localization of the expressed recombinant protein.

Phylogenetic Analysis of *Trichoderma* spp. Laccases

A phylogenetic analysis performed according to two distinct criteria separated *Trichoderma* laccases into two distinct clades with a bootstrap value of 99%. Interestingly, all intracellular laccases

Table 4. Signal peptide sequences from *Trichoderma* laccases predicted by different software programs.

Protein	SignalP ^a	PrediSi ^a	TargetP ^b	iPSORT ^c	MitoProt ^d
Tas_68620	N(0.140)	N (0.4239)	M (0.776)	–	CleavSite 14 (0.3382)
Ta_40409	N(0.152)	N (0.373)	M (0.676)	mTP (0.66667)	CleavSite 4 (0.7146)
Th_539081	N(0.168)	N (0.0)	M (0.931)	mTP (0.133333)	– (0.3726)
Tv_194054	N(0.159)	N (0.4244)	M (0.698)	mTP (0.66667)	CleavSite 13 (0.9523)
Tr_122948	N(0.148)	N (0.0)	Other (0.779)	–	– (0.1994)
Tas_71665	Y(0.680)	Y (0.5662)	S (0.905)	SP (2.06667)	– (0.379)
Tas_154312	Y(0.878)	Y (0.7464)	S (0.887)	SP (2.12)	CleavSite 26 (0.2047)
Ta_54145	Y(0.877)	Y (0.7953)	S (0.663)	SP (1.72667)	– (0.45)
Tv_48916	Y(0.803)	Y (0.6639)	S (0.843)	SP (1.48667)	– (0.1851)

The values between parentheses are the probability that the prediction is accurate. ^aN, non present; Y, present. ^bM, mitochondrial; S, secretory. ^cmTP, mitochondrial targeting peptide; SP, secretory signal peptide. ^dCleavSite, location of signal peptide cleavage sites.

doi:10.1371/journal.pone.0055295.t004

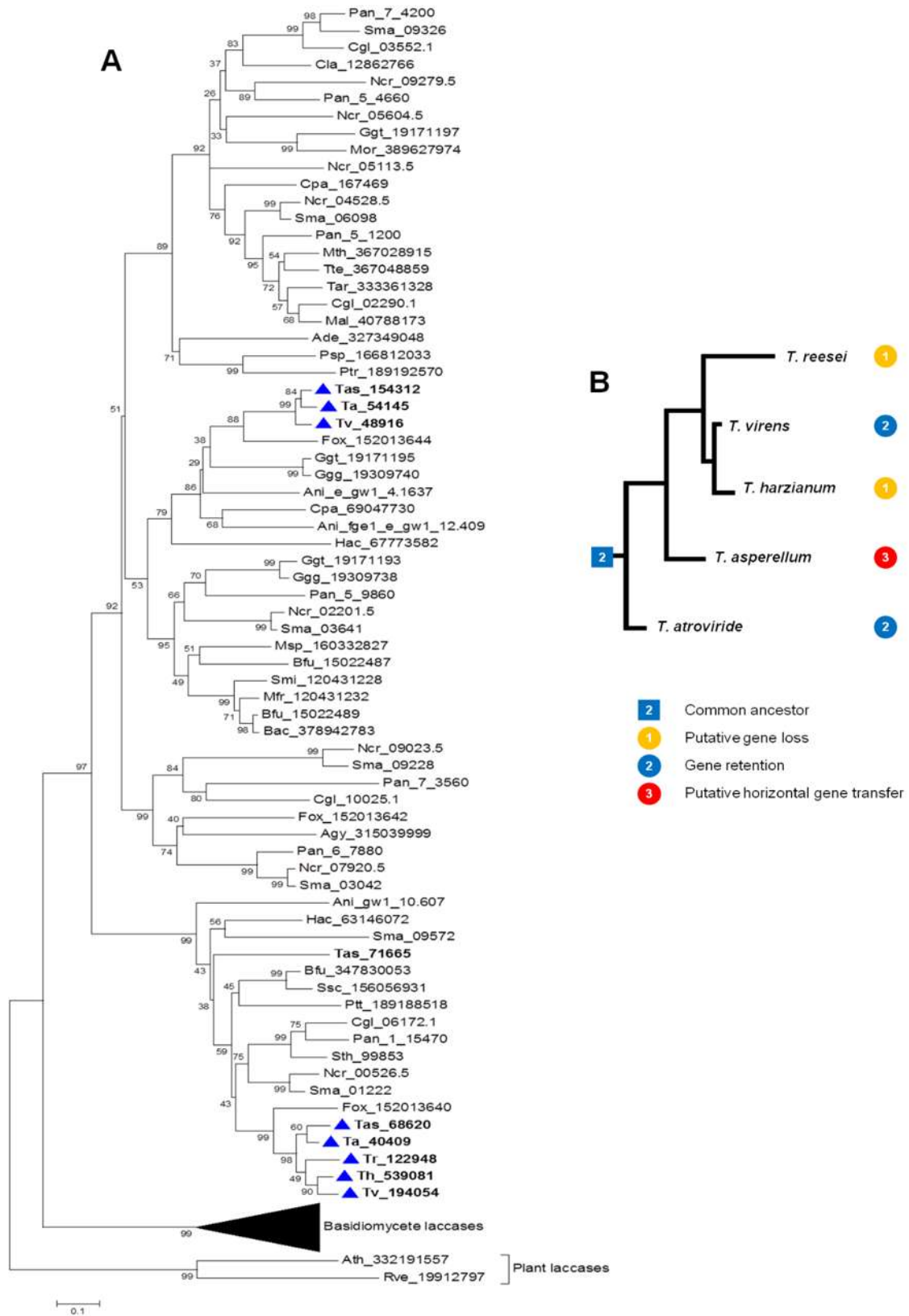


Figure 3. Phylogenetic analysis of laccases and of *Trichoderma* species. (A) Neighbor-joining tree of the deduced amino acid sequences of the five *Trichoderma* laccases and selected laccases of other ascomycetes, basidiomycetes and plants. The tree is calculated using the Jones-Taylor-Thornton (JTT) model in Mega Ver 5.05 based on a ClustalX alignment. Bootstrap values are from 1000 replications. The scale bar indicates a distance equivalent to 0.2 amino acid substitutions per site. Species and strains are indicated in the experimental procedures. Upward triangles indicate *Trichoderma* intracellular laccases and downward triangles extracellular ones. Green circles denote the laccases from *M. albomyces* [44] and *T. atrearia* [42]. (B) Phylogenetic tree of *Trichoderma* species showing gain, loss and retention of laccase genes. doi:10.1371/journal.pone.0055295.g003

are grouped in the first of these clades. The remaining three extracellular laccases are included in the second clade with the exception of Tas_71665 (Fig. 3a), which grouped in the clade of intracellular proteins but in a different terminal branch.

Although *Trichoderma* extracellular laccases exhibit close phylogenetic relationships with *F. oxysporum*, *G. graminis*, *A. niger* and *C. parasitica* orthologs, intracellular laccases show relationships with *S. thermophile*, *N. crassa*, *S. macrospora*, *P. anserina*, *F. oxysporum* and *C. globosum* orthologs. One may suggest the hypothesis that the phylogenetic closeness between these isoenzymes involves structural similarities in terms of the regions and amino acids discussed above for *Trichoderma* laccases. It is important to emphasize that all the proteins included in the phylogenetic analysis of Figure 3a were "curated" according to the same criteria as those of *Trichoderma* (Table 1) to ensure that they included only laccases *sensu stricto*. Because of this approach, the phylogram generated here excludes proteins that were used in previous phylogenetic analyses of ascomycete laccases [12,25], which are possibly another members of MCO family. In the future, it will be important to consider this aspect of treatment to obtain more robust phylogenetic patterns that will provide a clearer idea of the evolutionary process of this enzymatic function in ascomycetes. This approach will allow for a better definition of laccases with similar functions among distinct species of this group of fungi.

The phylogenetic separation of the subfamilies of laccases is fully congruent with the analysis of sites or characteristic sequences of each subfamily of genes discussed above. Both the structure and number of genes found in the species of *Trichoderma* and the phylogenetic analysis suggest that the common ancestor of said genus possessed two laccases, with one being intracellular and the other extracellular.

Comparative genomic analysis together with the results of molecular phylogeny leads to the conclusion that the ancestral state of *Trichoderma/Hypocea* was mycoparasitism and that it later acquired saprophytic characteristics that helped it to pursue its prey through lignified substrates [27]. These studies have shown that *T. atroviride* is the earliest species within the genus, whereas *T. viridis* and *T. reesei* appeared later. Furthermore, during the evolutionary process, *T. reesei* lost a significant quantity of the genetic information present in *T. atroviride*, which was retained in *T. viridis* [27]. The number of *Trichoderma* laccase genes and the phylogenetic analysis of the proteins coded by these genes are congruent with the described scenario (Fig. 3b). With the generated data, it is possible to support the hypothesis that during the process of speciation, species such as *T. atroviride* and *T. viridis* maintained the original number of laccase genes present in the common ancestor, while *T. harzianum* and *T. reesei* represent species that lost copies of extracellular laccase. On the other hand, several lines of evidence strongly suggest that the Tas_71665 gene of *T. asperellum* was acquired through a horizontal gene transfer event. This gene has the following structural features, which are discussed in the previous sections: i) it has the lowest GC-content (46%) of all known laccase genes; ii) it has a unique structure with seven introns; iii) the genome context of this gene differs from those of other laccase genes in *T. asperellum*; iv) no orthologous genes were found in the other analyzed *Trichoderma* species; v) compared to

laccases in other genera of ascomycetes, this protein shows higher identity values (51.4–52.6%) with laccases of *B. fuckeliana*, *S. sclerotiorum* and *P. tritici-repentis*; vi) in the phylogenetic analysis, the protein encoded by this gene does not cluster together with other laccases from *Trichoderma*. Most of these features have been recognized as evidence of horizontal gene transfer in fungi [67]. It has been previously suggested that in *S. macrospora* and *P. anserina* – belonging to the same Order as *Trichoderma* (Sordariales) – the acquisition of laccase genes occurred through horizontal transfer – [12]; the author postulating the possibility of gene transfer from *S. sclerotiorum* to *S. macrospora*. Taken together, our results strongly suggest that *T. asperellum* acquired the Tas_71665 gene through horizontal gene transfer, either from one of the known necrotrophic phytopathogens *B. fuckeliana*, *S. sclerotiorum* and *P. tritici-repentis*, or from a related fungus. This is noteworthy because there is experimental evidence showing mycoparasitic activity of *Trichoderma*, although not specifically *T. asperellum*, against *B. fuckeliana* and *S. sclerotiorum* [26], which indicates that this gene could have been acquired during the mycoparasitic process. This pattern of retention/loss/gain of laccase genes by groups of species in *Trichoderma* may reflect phenomena of selective pressure associated with the lifestyle of each of these species.

The phylogeny obtained shows that the hypothesis of two laccase genes in the common *Trichoderma* ancestor with later events of retention, loss or gain can be extended to the Ascomycetes group. In fact, this asymmetrical pattern of change in gene families has been reported for the case of family 28 of ascomycetes glyco-yl hydrolases [68], where duplications and losses of genes in distinct groups of fungi within this subdivision are observed. Detailed studies of ascomycete genomes to locate more laccase isoenzymes and carry out a broader phylogenetic analysis would allow for the corroboration of this hypothesis.

Analysis of the evolutionary patterns of *Trichoderma* laccases shows that the proportion of synonymous substitutions of the majority of enzymes varies between 56 and 78%, indicating saturation (Table 5). The exceptions were Tas_154312 and Ta_54145 (36%), as well as Tas_68620 and Ta_40409 (43%). The majority of the non-synonymous substitutions show values higher than 70%, indicating saturation. A low percentage of non-synonymous substitution is found in 36–37%, between 6 and 8%. These values, together with the percentage non-synonymous/percentage synonymous (pn/ps) proportions, show that the majority of *Trichoderma* extracellular laccases evolved under a process of purifying selection with the exception of Ta_71665, which has values that indicate neutral modifications (Table 5). In the case of the intracellular laccases, the majority of values indicate neutral changes, although in the case of the pair Tas_68620 and Ta_40409, purifying selection is shown.

Levasseur *et al.* [25] found that the TrLAC gene, identified by those authors as a *T. reesei* laccase, evolved under positive selection. However, as mentioned above, our data suggest that this gene is not a laccase *sensu stricto* but rather is another member of the MCO family. To this date, there are no studies that would allow us to compare the evolutionary patterns of *Trichoderma* laccases found in this study with those of ascomycete laccases.

Table 5. Synonymous and non-synonymous substitution rates (%) between laccase genes of *Trichoderma* spp.

Gene	Value ^a	Ta_54145	Tv_48916	Tas_71665	Th_539081	Tv_194054	Tr_122948	Tas_68620	Ta_40409
Tas_154312	ps	36	60	78	74	77	71	76	72
	pn	6	7	75	72	73	70	74	74
	pn/ps	0.16	0.11	0.96	0.97	0.94	0.98	0.97	1.02
Ta_54145	ps		56	78	72	74	68	77	76
	pn		8	75	73	73	69	75	75
	pn/ps		0.14	0.96	1.0	0.98	1.01	0.97	0.98
Tv_48916	ps			76	75	74	70	74	72
	pn			74	73	73	71	74	74
	pn/ps			0.97	0.97	0.98	1.01	1.00	1.02
Tas_71665	ps				76	77	74	74	74
	pn				75	70	73	74	74
	pn/ps				0.98	0.9	0.98	1.00	1.00
Th_539081	ps					75	72	66	71
	pn					72	72	36	37
	pn/ps					0.96	1.00	0.54	0.52
Tv_194054	ps						73	69	69
	pn						72	71	71
	pn/ps						0.98	1.02	1.02
Tr_122948	ps							68	66
	pn							72	72
	pn/ps							1.05	1.09
Tas_68620	ps								43
	pn								8
	pn/ps								0.18

Genes designed as in the JGI GeneBank. ^aps, percentage of synonymous substitutions; pn, percentage of non-synonymous substitutions; pn/ps, ratio of synonymous, non-synonymous substitutions.

doi:10.1371/journal.pone.0055295.t005

Conclusions

The search for laccases *sensu stricto* in ascomycetes involves the location in the amino acid sequence of motifs that are not present in basidiomycete laccases. The characterization of such motifs allows for better description of the possible functional properties of the proteins. The identification of ascomycete laccases *sensu stricto* is important to conduct robust phylogenetic analyses of this enzymatic function. The genus *Trichoderma* has preserved a limited number of functional laccase genes in the course of the evolutionary process. Structural and phylogenetic evidence suggests that the common ancestor of *Trichoderma* spp. had two laccase genes, with one being intracellular and the other extracellular. Species within the genus *Trichoderma* tend to preserve

intracellular laccase activity, whereas evolution patterns of extracellular activity are variable. In the case of *T. asperillum*, there is strong evidence of horizontal gene transference through the mycoparasitic processes. The herein presented data will contribute to the understanding of the functional role of laccases in the genus *Trichoderma* and to the optimization of their biotechnological applications.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GVM MSVG. Performed the experiments: SVCG. Analyzed the data: GVM SVCG MSVG. Contributed reagents/materials/analysis tools: MSVG GVM. Wrote the paper: SVCG GVM.

References

- Quintana L, Stoj C, Taylor AB, Hart PJ, Kosman DJ, et al. (2007) Shall we dance? How a multicopper oxidase chooses its electron transfer partner. *Acc Chem Res* 40: 443–452.
- Giarziana P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, et al. (2010) Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci* 67: 369–385.
- Baldrian P (2008) Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 32: 319–349.
- Schouten A, Wagemakers L, Stefanato FL, van der Kaaij KM, van Kan JAL (2002) Resveratrol acts as a natural prodrug and induces self-intoxication by a specific laccase. *Mol Microbiol* 43: 993–994.
- Maté D, García-Ruiz E, Camarero S, Alcalde M (2011) Directed evolution of fungal laccases. *Curr Genomics* 12: 113–122.
- Stradella, Shielder R, Selgal S, Kamharla M, Kumar A (2011) Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res* doi:10.4061/2011/247861.
- Tetsch I, Benz J, Höller U (2006) Molecular and enzymatic characterization of extra- and intracellular laccases from the acidophilic ascomycete *Hollia asidiphila*. *Anton Leeuw* 90: 183–191.
- Tamayo-Ramos JA, Barends S, Verhaert RMD, de Graaff JH (2011) The *Aspergillus niger* multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccase-like encoding genes. *Microb Cell Fact* 10: 74.
- Hoshida H, Nakao M, Kanazawa H, Kubo K, Hatakawa T, et al. (2001) Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression, of the laccase cDNA in yeast. *J Biosci Bioeng* 92: 372–380.

10. Cordoba CD, Roncero MIG (2008) Functional analyses of laccase genes from *Fusarium acysponum*. *Mycology* 98: 509–518.
11. Courty PE, Hoegger PJ, Kilaru S, Kohler A, Buée M, et al. (2009) Phylogenetic analysis, genomic organization, and expression analysis of multi-copper oxidases in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *New Phytol* 182: 736–750.
12. Poggele S (2011) Evolution of multicopper oxidase genes in coprophilous and non-coprophilous members of the order sordariales. *Curr Genomics* 12: 95–103.
13. Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR, Kues U (2006) Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J* 273: 2308–2326.
14. Kilaru S, Hoegger PJ, Kues U (2006) The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Curr Genet* 50: 45–60.
15. Lettera V, Piscitelli A, Leo G, Birolo L, Pezzella C, et al. (2010) Identification of a new member of *Pleurotus ostreatus* laccase family from mature fruiting body. *Fungal Biol* 114: 724–730.
16. Kubicek CP, Bisset J, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger C, Szakacs G (2003) Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet Biol* 38: 310–319.
17. Schuster A, Schmoll M (2010) Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 787–799.
18. Assavanig A, Amornkitticharoen B, Ekpaial N, Meevootisom V, Flegel TW (1992) Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 198–202.
19. Krastanov AI, Gochev VK, Girova TD (2007) Nutritive medium dependent biosynthesis of extracellular laccase from *Trichoderma* spp. *Bulg J Agric Sci* 13: 349–355.
20. Gochev VK, Krastanov AI (2007) Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. *Bulg J Agric Sci* 13: 171–176.
21. Hölker H, Dohse J, Höfer M (2002) Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiol* 47: 423–427.
22. Pokorný R, Vargovič P, Hölker U, Janssen M, Bend J, et al. (2005) Developmental changes in *Trichoderma virens* enzymes abundant in conidia and the light-induced conidiation signalling pathway. *J Basic Microbiol* 45: 219–229.
23. Sadhasivam S, Savitha S, Swaminathan K (2009) Redox-mediated decolorization of recalcitrant textile dyes by *Trichoderma harzianum* WLI laccase. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 1733–1741.
24. Chakroun H, Mechichi T, Martínez MJ, Dhoubi A, Sayadi S (2010) *Trichoderma atroviride*: application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochem* 45: 507–513.
25. Levasseur A, Saloheimo M, Navarro D, Andberg M, Pontarotti P, et al. (2010) Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete *Trichoderma reesei*: a functional, phylogenetic and evolutionary study. *BMC Biochem* 11: 32.
26. Catalano V, Vergara M, Hausenberger JR, Seiboth B, Sarracco S, et al. (2011) Use a non-homologous end-joining-deficient strain (Δ ku70) of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* to investigate the function of the laccase gene *lcc1* in sclerotia degradation. *Curr Genet* 57: 13–23.
27. Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martínez DA, Druzhinina IS, et al. (2011) Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style for *Trichoderma*. *Genome Biol* 12: R40.
28. Martínez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, et al. (2008) Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol* 26: 553–560.
29. Kumar S, Phale P, Durani S, Wangikar PP (2003) Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol Bioeng* 83: 386–394.
30. Hakulinen N, Andberg M, Kallio J, Koivula A, Kruss K, et al. (2008) A near atomic resolution structure of a *Melanocarpus albomyces* laccase. *J Struct Biol* 162: 29–39.
31. Hakulinen N, Kuiskinen II, Kruss K, Saloheimo M, Paananen A, et al. (2002) Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Struct Biol* 9: 601–605.
32. Eggert C, LaFayette PR, Temp U, Eriksson KEL, Dean JFD (1998) Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol* 64: 1766–1772.
33. Liivintseva AP, Henson JM (2002) Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Appl Environ Microbiol* 68: 1305–1311.
34. Martin C, Pecyna M, Kellner H, Jehmlich N, Junghans C, et al. (2007) Purification and biochemical characterization of a laccase from the aquatic fungus *Mycocentrum* sp. UHH 1–13–18–4 and molecular analysis of the laccase-encoding gene. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 613–624.
35. Fernández LJ, Stahl U (1996) Isolation and characterization of a laccase gene from *Pleurotus anserina*. *Mol Gen Genet* 252: 539–551.
36. Choi GH, Larson TG, Nuss DL (1992) Molecular analysis of the laccase gene from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in an isogenic hypovirulent strain. *Mol Plant Microbe Interact* 5: 119–128.
37. Shapiro MB, Senepathy P (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 15: 7155–7174.
38. Chung HJ, Kwon BR, Kim JM, Park SM, Park JK, et al. (2008) A tannic acid-inducible and hypoviral-regulated laccase3 contributes to the virulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 1582–1590.
39. Garavaglia S, Cambria MT, Miglio M, Ragusa S, Iacobazzi V, et al. (2002) The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J Mol Biol* 342: 1519–1531.
40. Piontek K, Antorini M, Choinowsky T (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem* 277: 37663–37669.
41. Li H, Webb SP, Ivanić J, Jensen JH (2004) Determinants of the reactive reduction potentials of type-1 copper sites in proteins. *J Am Chem Soc* 126: 8010–8019.
42. Kallio JP, Gasparetti C, Andberg M, Boer H, Koivula A, et al. (2011) Crystal structure of an ascomycete fungal laccase from *Thielavia ananias* – common structural features of asco-laccases. *FEBS J* 278: 2283–2295.
43. Ge H, Gao Y, Hong Y, Zhang M, Xiao Y, et al. (2010) Structure of naïve laccase B from *Trametes* sp. AH28–2. *Acta Cryst F66*: 254–258.
44. Kallio JP, Auer S, Jänis J, Anderberg M, Kruss K, et al. (2009) Structure-function studies of a *Melanocarpus albomyces* laccase suggest a pathway for oxidation of phenolic compounds. *J Mol Biol* 392: 895–909.
45. German UA, Muller G, Hunziker PE, Lerch K (1988) Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase amino- and carboxyl-terminal processing of a precursor. *J Biol Chem* 263: 885–896.
46. Bulter T, Alcalde M, Sieber V, Meinhold P, Schlachtbauer C, et al. (2003) Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl Environ Microbiol* 69: 987–995.
47. Andberg M, Hakulinen N, Auer S, Saloheimo M, Koivula A, et al. (2009) Essential role of the C-terminus in *Melanocarpus albomyces* laccase for enzyme production, catalytic properties and structure. *FEBS J* 276: 6285–6300.
48. Pardo I, Vicente AI, Mate DM, Alcalde M, Camarero S (2012) Development of chimeric laccases by directed evolution. *Biotechnol Bioeng* doi 10.1002/bit.24588.
49. Pezzella C, Autore F, Giardina P, Piscitelli A, Sanna G, et al. (2009) The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Curr Genet* 55: 45–57.
50. Hoegger PJ, Navarro-González M, Kilaru S, Hoffmann M, Westbrook ED, et al. (2004) The laccase gene family in *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Curr Genet* 45: 9–18.
51. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10: 1–6.
52. Vite-Vallejo O, Palomares LA, Dantán-González E, Ayala-Castro HG, Martínez-Anaya C, et al. (2009) The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme Microb Technol* 45: 233–239.
53. Martin F, Laurent P, de Carvalho D, Voiblet C, Balestrini R, et al. (1999) Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function and expression in symbiosis. *Fungal Genet Biol* 27: 161–174.
54. Brandhorst T, Klein B (2000) Cell wall biogenesis of *Blastomyces dermatitidis*. Evidence for a novel mechanism of cell surface localization of a virulence-associated adhesin via extracellular release and reassociation with cell wall chitin. *J Biol Chem* 275: 7925–7934.
55. Soragni E, Bolchi A, Balestrini R, Gambaretto C, Percudani R, et al. (2001) A nutrient-regulated, dual localization phospholipase A₂ in the symbiotic fungus *Tuber bochii*. *The EMBO J* 20: 5079–5090.
56. Zhu X, Williamson PR (2004) Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res* 5: 1–10.
57. Oda K, Kakizono D, Yamada O, Lefuji H, Akita O, et al. (2006) Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl Environ Microbiol* 72: 3448–3457.
58. Yogev O, Pines O (2011) Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function. *Biochim Biophys Acta* 1808: 1012–1020.
59. Ben-Menachem R, Tal M, Shadur T, Pines O (2011) A third of the yeast mitochondrial proteome is dual localized: a question of evolution. *Proteomics* 11: 4468–4476.
60. Regev-Rudzi N, Karnieli S, Ben-Haim NN, Pines O (2005) Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: seeing small amounts is believing. *Mol Biol Cell* 16: 4163–4171.
61. Yogev O, Naama D, Pines O (2011) Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions. *FEBS J* 278: 4230–4242.
62. Vanhee C, Guillon S, Masquelier D, Degand H, Deleu M, et al. (2011) A TSPO-related protein localizes to the early secretory pathway in *Arabidopsis*, but is targeted to mitochondria when expressed in yeast. *J Exp Bot* 62: 497–508.
63. Byun-McKay SA, Geeta R (2007) Protein subcellular relocalization: a new perspective on the origin of novel genes. *TRENDS Ecol Evol* 22: 338–344.
64. Stohs SJ, Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18: 321–336.
65. Cobine PA, Ojeda LD, Rigby KM, Winge DR (2004) Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix. *J Biol Chem* 279: 14447–14455.
66. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2: 953–971.
67. Fitzpatrick DA (2012) Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiol Lett* 329: 1–8.
68. Sprockett DD, Piontkivska H, Blackwood CB (2011) Evolutionary analysis of glycosyl hydrolase family 28 (GH28) suggests lineage-specific expansions in necrotrophic fungal pathogens. *Gene* 479: 29–36.

4.2 CAPÍTULO II

ARTÍCULO II

En éste artículo en preparación se reporta el escrutinio y selección de cepas con potencial ligninolítico en 23 aislados silvestres de *Trichoderma* spp., para someter en la revista internacional indizada *Journal of Microbiology and Biotechnology*.

SELECCIÓN DE CEPAS SILVESTRES DE *Trichoderma* spp. CON ACTIVIDAD DE LACASA EXTRACELULAR

Saila Viridiana Cázares-García^a, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas^b, Virginia A. Robinson-Fuentes^b, Marina Arredondo-Santoyo^a, Gerardo Vázquez-Marrufo^a

^aCentro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

^bDivisión de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. E-mail: gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx

RESUMEN

El género *Trichoderma* incluye especies de gran importancia biotecnológica debido a su capacidad para producir glucanasas y xilanasas extracelulares que atacan al material lignocelulósico. Son pocos los estudios relacionados con la producción de lacasa extracelular en especies de *Trichoderma*, y se ha evaluado un número limitado de cepas. En el presente trabajo se reactivaron cepas silvestres de *Trichoderma* spp. preservadas en agua por tres años, identificándose como *T. harzianum*, *T. tomentosum*, *T. koningii*, *T. atroviride*, *T. viride*, *T. gamsii* y *T. viridescens* mediante análisis de la región ITS de rDNA y el gen *tef1*. La selección de cepas con actividad de lacasa extracelular se realizó con ensayos de decoloración/oxidación en medio sólido, empleando colorantes azo, antraquinona, indigoide y trifenilmetano, además de ácido tánico y guayacol. Todas las cepas fueron capaces de decolorar Naranja de Metilo y oxidaron eficientemente al ácido tánico, pero no pudieron decolorar Azul Directo 71 ni Chicago Sky Blue 6B y oxidaron débilmente al guayacol. Se seleccionaron las cepas CMU-1 (*T. harzianum*), CMU-8 (*T. atroviride*), CMU-218 (*T. viride*) y CMU-221 (*T. tomentosum*) para evaluar la actividad de lacasa extracelular en medio líquido. La cepa CMU-8 no presentó actividad basal de lacasa, mientras que las cepas CMU-1, CMU-218 y CMU-221 presentaron una actividad basal de 1313.88 mU/mL, 763.88 mU/mL y 799.53 mU/mL,

respectivamente. Al adicionar rastrojo molido en la cepa CMU-1 se inhibió la actividad con respecto al cultivo basal 0.66 veces, mientras que las cepas CMU-8, CMU-218 y CMU-221 incrementaron su actividad 1321.52, 2.77 y 1.87 veces, respectivamente. Los resultados muestran que las cepas analizadas poseen potencial biotecnológico en procesos de degradación de xenobióticos y pueden ser buena fuente de lacasa extracelular.

Palabras clave: *Trichoderma*, lacasa extracelular, decoloración, rastrojo.

INTRODUCCIÓN

La lignocelulosa es el bloque de construcción de las plantas y el material orgánico renovable más abundante sobre la Tierra. Los componentes mayoritarios de la lignocelulosa son celulosa, hemicelulosa y lignina (Sánchez, 2009). La lignina es un biopolímero aromático que rodea a las microfibrillas de celulosa y hemicelulosa, proporcionándole gran resistencia e insolubilidad a la estructura vegetal (Theuerl y Buscot, 2010). Bioquímicamente, la lignina es una red polimérica heterogénea, amorfa y altamente ramificada, sintetizada a partir de la copolimerización oxidativa de alcoholes *p*-hidroxicinamílicos (*p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico) que están unidos fuertemente mediante enlaces C–C y C–O–C (Sánchez, 2009). Debido a su complejidad estructural, la lignina es recalcitrante al ataque químico y biológico, por lo que actúa como barrera de la degradación del material lignocelulósico. En la naturaleza, los organismos de vida libre principalmente responsables de la degradación de la lignina son los hongos aeróbicos filamentosos (Dashtban *et al.* 2010). La habilidad de los hongos para degradar lignina se debe a su capacidad para secretar enzimas oxidativas. Las enzimas ligninolíticas más importantes a este respecto son las lignino peroxidasas (LiP; EC 1.11.1.14), las manganeso peroxidasas (MnP; 1.11.1.13), las peroxidasas versátiles (VP; EC 1.11.1.16) y las lacasas (EC 1.10.3.2) (Leonowich *et al.* 2001). En particular, las lacasas son consideradas las enzimas más activas en la depolimerización de la lignina debido a su capacidad para oxidar subunidades fenólicas y no fenólicas mediante la inclusión de mediadores redox de bajo peso molecular (Nyanhongo *et al.* 2002).

Las lacasas son metaloenzimas que pertenecen a la familia de las Multicobre Oxidasas (MCOs). Son proteínas con una presencia ubicua en la naturaleza, ya que han sido reportadas en plantas, insectos, bacterias y en prácticamente todas las especies de hongos examinadas (Theuerl y Buscot, 2010). Las lacasas fúngicas, además de catalizar la oxidación de la lignina, participan en la síntesis de pigmentos, en procesos de patogénesis, en interacciones competitivas, en la formación del cuerpo fructífero y en la respuesta a estrés ambiental (Morozova *et al.* 2007). Esta diversidad funcional se debe a que las lacasas exhiben altos potenciales redox y tienen baja especificidad por sustrato, por lo que actúan sobre difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, hidroxindoles y benzenotioles (Giardiana *et al.* 2010). La versatilidad catalítica de las lacasas fúngicas ha sido aprovechada para su aplicación en la delignificación y blanqueo de pulpa Kraft, en la síntesis de biopolímeros y biocombustibles, en el tratamiento de forrajes, en la remoción de colorantes, en la fabricación de biosensores y en nanotecnología (Mikolasch y Schauer, 2009; Kudanga *et al.* 2011).

La amplia utilidad biotecnológica de las lacasas extracelulares ha motivado el interés en el escrutinio de nuevas cepas fúngicas con altos niveles de producción de dicha actividad enzimática (Levin *et al.* 2004; Dhouib *et al.* 2005), buscando proteínas con diferente especificidad por sustrato, estabilidad y actividad, bajo diversas condiciones de pH y temperatura (Halaburji *et al.* 2011). La selección de cepas ligninolíticas se ha realizado tanto en medio sólido adicionado con colorantes o sustratos fenólicos como indicadores (Kiiskinen *et al.* 2004), como mediante el monitoreo espectrofotométrico de cultivos en medio líquido (Kumar *et al.* 2011). Entre los indicadores de actividad de lacasa extracelular usados comúnmente se encuentran el guayacol, el ácido tánico (Kiiskinen *et al.* 2004), el ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)) (Dhouib *et al.* 2005) y colorantes poliméricos como el Azul Remazol Brillante-R (RBBR) y Poly R-478 (Selvam *et al.* 2012). Por otra parte, además de inductores inorgánicos y orgánicos (Piscitelli *et al.* 2011), se ha evaluado la inducción de la actividad de lacasa extracelular de hongos durante el proceso de degradación de distintos residuos agrícolas (Arora y Gill 2000). lo cual tienen particular importancia en procesos de biocomposteo y alimentación

animal (Okano *et al.* 2005). Entre los residuos agrícolas de mayor interés en términos de nutrición de rumiantes se encuentran los rastrojos de sorgo, maíz y trigo (Dashtban *et al.* 2009), con los cuales se ha evaluado la inducción de lacasa extracelular en distintas especies fúngicas (Arora y Gill 2000; Patel *et al.* 2009).

Las especies del género *Trichoderma* son habitantes ubicuos del suelo, de distribución cosmopolita, considerados como los estados anamórfos del género *Hypocrea*, la fase sexual que se encuentra dentro del orden *Hypocreales* y la familia *Hypocraceae*, en el grupo Ascomycota (Samuels, 2006). Son componentes predominantes de la micoflora en suelos agrícolas, praderas, bosques, marismas, desiertos y agua, en donde actúan como degradadores del material lignocelulósico de troncos y hojarasca (Kubicek *et al.* 2003). Algunas de las especies de *Hypocrea/Trichoderma*, particularmente *H. jecorinal/T. reesei* son conocidas como productoras de celulasas y hemicelulasas a nivel industrial (Hermosa *et al.* 2000). Otras, como *H. lixii/T. harzianum* y *H. atroviridis/T. atroviride* producen altos niveles de compuestos antifúngicos, antibióticos y enzimas degradadoras de quitina y β -glucano, por lo que han contribuido al control biológico de fitopatógenos y nemátodos (Roberts *et al.* 2010). La alta adaptabilidad ecológica, así como las capacidades metabólicas de las especies de *Hypocrea/Trichoderma* lo han convertido en uno de los géneros fúngicos de mayor interés industrial.

Aunque algunos trabajos han documentado la actividad extracelular de lacasa en cepas silvestres de *Trichoderma* spp. (Sadhasivam *et al.* 2008; Chakroun *et al.* 2010), todavía es escaso el número de cepas caracterizadas en ese sentido. Recientemente se ha evaluado el papel de la actividad de lacasa extracelular de *T. viride* en el proceso de micoparasitismo (Catalano *et al.* 2011) y nuestro grupo de trabajo ha extendido la evidencia sobre la presencia de genes de lacasa extracelular a otras especies del género (Cázares-García *et al.* 2013). En el presente trabajo se reactivaron de su conservación en agua a 23 aislados silvestres de *Hypocrea/Trichoderma* provenientes del estado de Michoacán, México y se evaluó su capacidad de decoloración/oxidación mediante ensayos en medio sólido. Las cepas que presentaron mejores resultados de decoloración y oxidación fueron seleccionadas para determinar los niveles de actividad de lacasa extracelular en

cultivo en medio líquido tanto en estado basal como inducido con rastrojo de sorgo. Se comparan los resultados obtenidos con los reportes existentes sobre decoloración/oxidación y producción de lacasa extracelular en *Trichoderma* spp. y otros grupos de ascomicetes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de estudio

Se analizaron un total de 23 aislados silvestres los cuales forman parte del Cepario Michoacano Universitario (CMU), perteneciente al Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Michoacán, México). Las cepas de estudio se obtuvieron de muestras obtenidas de distintos ecosistemas de bosque templado del estado de Michoacán (Tabla 1, Fig. 1). Los aislados provienen de muestras de cuerpos fructíferos de distintas especies de basidiomicetos. El aislamiento de las primeras cepas fue circunstancial, pero debido a la presencia frecuente de *Trichoderma* spp. asociado a basidiocarpos se consideró interesante mantener las cepas obtenidas y aislar más cepas con el interés futuro de buscar asociaciones *Trichoderma*-basidiomycetes. Las cepas tenían 3 años guardadas en agua a temperatura ambiente y se reactivaron para su estudio. Antes de su almacenamiento, las cepas fueron asignadas al género *Trichoderma* mediante el análisis de la región interespaciadora (ITS) de la Unidad Ribosomal Nuclear, aunque no se identificaron a nivel de especie. Las cepas se almacenaron en el Cepario Michoacano Universitario y a cada una de ellas se le asignó una clave de identificación que consiste en las siglas del nombre del cepario (CMU) seguido de un número que hace referencia a su localización dentro del mismo (Arredondo-Santoyo, 2009) (Tabla 2).

Tabla 1. Datos de los aislados silvestres de *Trichoderma* spp. analizados en el presente trabajo.

CLAVE CMU	Fecha de colecta	Localidad de colecta	Tipo de vegetación dominante	Sustrato de colecta	CG
CMU-1	24.09.05	Puerto Madroño (Atecuaro)	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19°34'26.7", W 101°13'36"
CMU-8	03.09.05	Parque Nacional "José Ma. Morelos". Charo	Bosque Pino-Encino	Humus	N 19° 39'44", W 101°00'27"
CMU-14	03.09.05	Parque Nacional "José Ma. Morelos". Charo	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19° 39'44", W 101°00'27"
CMU-16	03.09.05	Parque Nacional "José Ma. Morelos". Charo	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19° 39'44", W 101°00'27"
CMU-18	08.09.05	Parque Nacional "José Ma. Morelos". Charo	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19° 39'44", W 101°00'27"
CMU-19	08.09.05	Parque Nacional "José Ma. Morelos". Charo	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19° 39'44", W 101°00'27"
CMU-21	25.09.04	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19°49.368', W 100°39.246'
CMU-23	25.09.04	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19°49.368', W 100°39.246'
CMU-25	25.09.04	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19°49.368', W 100°39.246'
CMU-34	08.09.05	Parque Nacional "José Ma. Morelos". Charo	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19° 39'44", W 101°00'27"
CMU-43	08.09.04	Cuto de La esperanza	Pastizal	Basidiocarpo	N 19°17.00', W 101°22.00'
CMU-44	25.09.04	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19°49.368', W 100°39.246'
CMU-51	25.09.04	Pátzcuaro	Bosque pino	Basidiocarpo	N 19°31.00', W 101°36.00'
CMU-66	25.09.04	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19°49.368', W 100°39.246'
CMU-90	24.09.05	Puerto Madroño (Atecuaro)	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19°34'26.7", W 101°13'36"
CMU-181	24.09.05	Puerto Madroño (Atecuaro)	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19°34'26.7", W 101°13'36"
CMU-183	24.09.05	Puerto Madroño (Atecuaro)	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19°34'26.7", W 101°13'36"
CMU-218	24.09.05	Puerto Madroño (Atecuaro)	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19°34'26.7", W 101°13'36"
CMU-221	24.09.05	Puerto Madroño (Atecuaro)	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19°34'26.7", W 101°13'36"
CMU-222	24.09.05	Puerto Madroño (Atecuaro)	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19°34'26.7", W 101°13'36"
CMU-231	24.09.05	Puerto Madroño (Atecuaro)	Bosque Pino-Encino	Basidiocarpo	N 19°34'26.7", W 101°13'36"

La fecha aparece por día/mes/año; **CG**, Coordenadas Geográficas; **Cd.**, Ciudad.

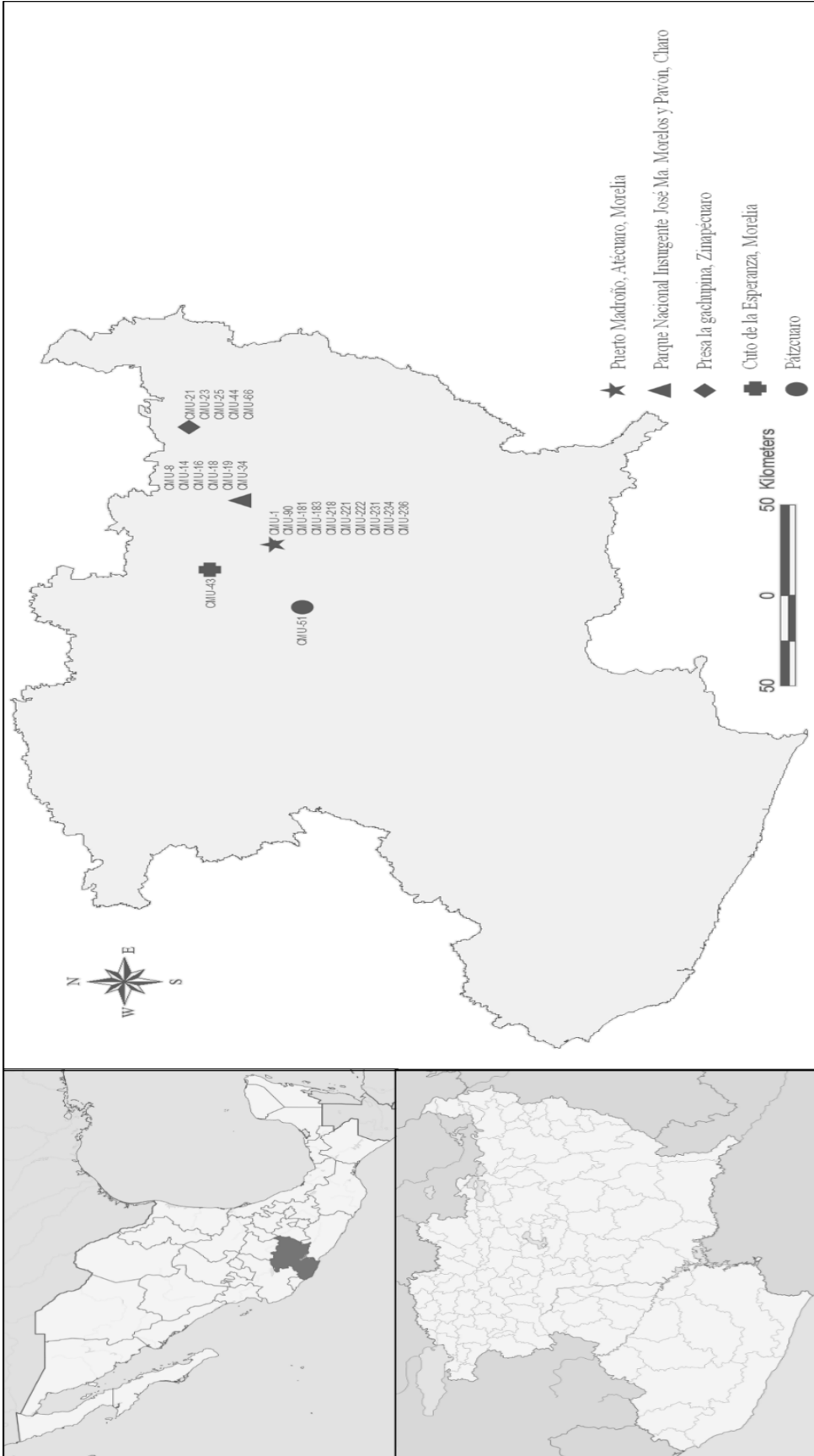


Figura 1. Mapa que indica la localización de las áreas de colecta de las muestras de donde se obtuvieron los aislados de *Trichoderma* spp.

Medios de cultivo

Se empleó el medio mínimo Vogel (MM) para el cultivo y mantenimiento del micelio vegetativo de los aislados de *Trichoderma* spp., así como para la generación de inóculos y para los ensayos de decoloración y oxidación en placa. La solución stock (50X) de MM está compuesta por (g/L): $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 150; KH_2PO_4 , 250; NH_4NO_3 , 100; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5; biotina (5 mg/100 mL etanol al 50%), 5 mL; solución de oligoelementos, 5 mL. La solución de oligoelementos contiene (g/0.1 L): ácido cítrico $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.072; H_3BO_3 , 0.05; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05. Para la siembra de las cepas, el stock se diluyó en agua destilada hasta obtener una concentración final 1X y se adicionó 1.5% de glucosa y Agar bacteriológico (15 g/L). El Caldo Extracto de Malta (CEM) se utilizó para la determinación cuantitativa de la actividad de lacasa extracelular. El CEM consta de 1.0% de glucosa y 2% de extracto de malta. Los medios se esterilizaron a 121 °C (15 lb/in²) por 15 minutos.

Viabilidad celular

Inicialmente se confirmó la viabilidad de los aislados silvestres de *Trichoderma* spp., para ello, se recuperaron las cepas del CMU y se inocularon en MM sólido. Los cultivos se incubaron a 28 °C y se evaluó diariamente el desarrollo del micelio. A partir de estos cultivos se realizó una segunda resiembra y se incubaron a 28 °C hasta que alcanzaron la fase de crecimiento logarítmica. Se obtuvieron porciones del micelio vegetativo de cada una de las cepas y se colocaron en tubos de 1.5 mL que contenían H₂O destilada estéril y se almacenaron a 4 °C. A partir de estas muestras se realizaron resiembras en MM sólido para la obtención de inóculos.

Extracción de ADN, ensayos de PCR y secuenciación

El ADN genómico se extrajo de cultivos con 5 días de incubación. Se recuperó el micelio y se congeló en N₂ líquido, se maceró y se adicionó buffer de lisis (SDS 0.5%, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, Tris-HCl 200mM, pH 8.5). Se agregó un volumen de fenol/cloroformo, se agitó en vortex por 1 min y se centrifugó para extraer la fase orgánica. Después del tratamiento con RNasa, se extrajo nuevamente con

fenol/cloroformo y el ADN se precipitó con isopropanol. La pastilla se lavó con etanol (70%) y se resuspendió en 30 µL de H₂O destilada desionizada estéril (Kurtzman y Robnet, 1998). La integridad del ADN se corroboró en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (BrEt) a una concentración final de 0.5 µg/mL (Sambrook y Russell, 2001). El ADN de cada uno de los aislados se usó como templado para la amplificación de la región ITS de la Unidad Ribosomal Nuclear utilizando el par de oligonucleótidos ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.* 1990). Para la amplificación del gen que codifica para el Factor de Elongación 1α (*tef1*) se usaron los primers EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') y EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3') (Ru y Di, 2012). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µL. Para todas las muestras la concentración de la mezcla de reacción fue la misma: 10 mM de Buffer Tris-HCl pH 8.0; 1.5 mM de MgCl₂; 0.2 mM de cada dNTP; 1 µM de cada oligonucleótido; 0.05 U de *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen, USA); 1–2 ng/µL de ADN; el volumen final se ajustó con H₂O destilada desionizada estéril a 25 µL. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Palm-Cycler™ Gradient thermal cycling (R Corbett Life Science, USA) mediante el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 2 min, con una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de amplificación obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con BrEt a una concentración final de 0.5 µg/mL (Sambrook y Russell, 2001). Los productos de PCR (ITS1-4, 650 pb; FE1α, 300 pb) fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc, USA.

Identificación y análisis filogenético

Las secuencias obtenidas de la amplificación de las regiones ITS y *tef1* de los 23 aislados silvestres de *Trichoderma*, fueron analizadas individualmente en *TrichoMARK* (<http://www.isth.info/tools/blast/preblast.php>) y *TrichoBLAST* V1.0 (<http://www.isth.info/tools/blast/preblast.php>). Posteriormente, cada una de las

secuencias se comparó con la base de datos de NCBI GenBank mediante el algoritmo BLASTn. Las secuencias que presentaron una similitud mayor al 95% con las secuencias de *Trichoderma* spp., fueron seleccionadas para crear una base de datos local, a partir de la cual se construyeron alineamientos múltiples con ClustalX V2.0.11 (<http://www.clustal.org/clustal2/>) utilizando los parámetros predeterminados. Los alineamientos obtenidos se ajustaron manualmente y se realizó un análisis de patrón de sustitución de nucleótidos en MEGA V5.05 (Tamura *et al.* 2011). El algoritmo seleccionado fue Kimura-2 con distribución gamma. Se construyó un árbol filogenético con MEGA mediante el método de Máxima Probabilidad. La topología del árbol se corroboró con Neighbor-Joining (Kimura-2-Gamma) y la significancia estadística se evaluó con un Bootstrap de 1000 réplicas.

Ensayos de decoloración y oxidación en placa

La determinación cualitativa de la producción de lacasa extracelular por parte de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp., se llevó a cabo en placas Petri (90 mm de diámetro) que contenían 25 mL de MM suplementado con diferentes indicadores. Se usaron los colorantes Naranja de Metilo (NM), Azul Directo 71 (AD-71), Azul Ácido 1 (AA-1), Chicago Sky Blue 6B (CSB-6B) del grupo de los colorantes azo, Índigo Carmín (IC, indigoide), Azul Remazol Brillante-R (RBBR, antraquinona) y Fucsina Ácida (FA, trifenilmetano), todos a una concentración de 250 mg/L (Nyanhongo *et al.* 2002). La solución stock de cada uno de los colorantes se esterilizó por filtración a través de membranas Millipore de 0.45 µm de poro y se adicionó al medio de cultivo después de que éste se esterilizó por autoclave. Los sustratos guayacol y ácido tánico se emplearon a una concentración de 0.01 y 0.04%, respectivamente (Kiiskinen *et al.* 2004). El guayacol se disolvió por separado en 20 mL de H₂O destilada y se adicionó al medio de cultivo al momento de la esterilización por autoclave. El ácido tánico se disolvió en 50 mL de H₂O destilada y se esterilizó por separado antes de su adición al medio de cultivo. Las placas fueron inoculadas con precultivos en fase logarítmica de crecimiento, los inóculos se obtuvieron del borde de la colonia con un sacabocados de 6 mm de diámetro. El inóculo se colocó en el centro de la placa y en todos los casos se incubó en oscuridad a 28° C. El

crecimiento micelial se determinó cada 12 horas, mediante la medición del diámetro colonial. El grado de decoloración se determinó visualmente mediante la formación de un halo de decoloración alrededor del micelio en crecimiento; la oxidación del guayacol se registró por la formación de un halo café-rojizo en el medio de cultivo; y la reacción positiva con ácido tánico se reveló con la aparición de una zona café oscuro (Kiiskinen *et al.* 2004; Nyanhongo *et al.* 2002). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Cultivo en medio líquido

Las cepas que presentaron los mayores niveles de decoloración y oxidación en placa fueron cultivadas en medio líquido para determinar el crecimiento y los niveles de actividad de lacasa extracelular en estado basal e inducido. Se utilizaron inóculos de micelio provenientes de cultivos sólidos en fase logarítmica de crecimiento. Los inóculos se obtuvieron de los bordes de la colonia con un sacabocados de 6 mm de diámetro. Las cinéticas de crecimiento y actividad en condiciones basales se iniciaron adicionando tres inóculos en matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 25 mL de CEM. Los estudios de inducción enzimática se llevaron a cabo mediante la adición de 0.5 g de rastrojo de sorgo (*Sorghum* sp.) por cada 25 mL de CEM. El rastrojo fue macerado y esterilizado dos veces antes de su adición al medio de cultivo. Los matraces inoculados de la manera previamente descrita se incubaron a 28 °C y 120 rpm de agitación. Se tomaron muestras cada 12 horas para determinar el peso seco y la actividad de lacasa extracelular. Todos los ensayos se realizaron por triplicado calculándose el promedio y la desviación estándar y realizando una prueba *t* de Student ($p < 0.05$) para evaluar la significancia estadística de las diferencias entre las cepas y las condiciones de cultivo.

Actividad de lacasa extracelular y proteína total

La actividad de lacasa extracelular se determinó espectrofotométricamente utilizando ABTS como sustrato (Nagai *et al.* 2002). La mezcla de reacción contenía 800 μ L de buffer Macllvaine pH 4.0 (0.1 M de ácido cítrico, 0.2 M de fosfato de sodio dibásico), 100 μ L de ABTS 10 mM y 100 μ L de la fase acuosa. La fase acuosa se obtuvo al

filtrar el medio de cultivo a través de papel Whatman No. 2 y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min, para eliminar restos de micelio. Las muestras se incubaron a 30° C por 20 min y la reacción se detuvo al adicionar 100 µL de ácido tricloroacético al 5% (v/v en agua). La formación del radical catiónico ABTS⁺ se midió por el incremento de la absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36\ 000\ M^{-1}\ cm^{-1}$). Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 µmol de ABTS a 30 °C en 1 min. La proteína total se determinó mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) utilizando albúmina bovina como estándar (Bradford, 1976). Todos los ensayos se realizaron por triplicado calculándose el promedio y la desviación estándar y realizando una prueba *t* de Student ($p < 0.05$) para evaluar la significancia estadística de las diferencias entre las cepas y las condiciones de cultivo.

Compuestos químicos

Los compuestos Naranja de Metilo, Azul Directo 71, Azul Ácido 1, Chicago Sky Blue 6B, Índigo Carmín, Azul Remazol Brillante R, Fucsina Ácida, guayacol, ácido tánico, ácido cítrico, ABTS y la albúmina bovina se obtuvieron de Sigma-Aldrich® (USA). El ácido tricloroacético de Fluka® (USA). El NaH₂PO₄·7H₂O y la glucosa de JT Baker® (USA). El reactivo de Bradford se adquirió de BioRad® (USA). El extracto de malta y el agar bacteriológico de Difco® (USA). Todos los compuestos y reactivos empleados fueron grado analítico y/o biología molecular.

RESULTADOS

Cepas de estudio y viabilidad celular

Los aislados silvestres analizados en éste trabajo forman parte del Cepario Michoacano Universitario que contiene más de 150 especies de hongos filamentosos incluidos basidiomicetos y ascomicetos. Las cepas de estudio se identificaron previamente como especies del género *Trichoderma* y en base a ello fueron seleccionadas para evaluar su capacidad para producir lacasas extracelulares. Se recuperaron 23 cepas silvestres del género *Trichoderma* que fueron cultivadas en MM sólido para corroborar la viabilidad celular, esto debido a que estuvieron

almacenadas por un periodo de 3 años en el CMU. Las 23 cepas mostraron crecimiento micelial a 28 °C, iniciando con el desarrollo de micelio sumergido que evolucionó a micelio aéreo de color blanco con un aspecto algodonoso o aterciopelado de borde regular e irregular, dependiendo de la cepa. La formación de conidias hialinas fue evidente a partir del tercer día de incubación. En el caso de los aislados CMU-14, CMU-16, CMU-18 y CMU-43 las conidias desarrollaron una pigmentación amarilla que con el tiempo fue cambiando a verde, indicando su maduración. No se observó coloración en el anverso de las colonias. En todas las cepas se detectó un ligero aroma a coco o alcanfor, siendo más intenso en la cepa CMU-8 y CMU-221. La mayoría de las cepas crecieron rápidamente, alcanzando el límite de la placa entre las 72 y 96 horas de incubación. Las cepas CMU-66, CMU-218, CMU-231, CMU-234 y CMU-236 presentaron un crecimiento más lento, que se extendió hasta las 192 horas de incubación (Fig. 2).

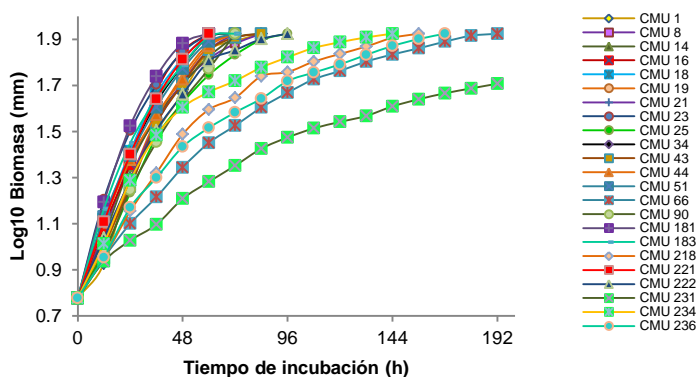


Figura 2. Cinética de crecimiento de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. en MM sólido. Las cepas se incubaron a 28 °C y se midió el diámetro colonial cada 24 h.

Identificación genético molecular de los aislados silvestres

Las cepas de estudio se identificaron de manera preliminar como especies del género *Trichoderma* con base en el análisis de la secuencia ITS. La identificación a nivel de especie de los aislados silvestres del género *Trichoderma* se llevó a cabo mediante la amplificación, secuenciación y análisis filogenético de la región ITS y del gen *tef1*. El análisis realizado en *Tricho*MARK y *Tricho*BLAST de las secuencias ITS y *tef1* de los 23 aislados silvestres, confirmó que pertenecen al género *Hypocrea*

Trichoderma. En cada una de las secuencias se detectaron los códigos de barras propuestos por Druzhinina *et al.* (2005) y que se utilizan para la discriminación de las especies de *Trichoderma*. Con base en éste análisis los aislados CMU-1, CMU-14, CMU-16, CMU-18, CMU-19, CMU-23, CMU-25, CMU-34, CMU-43, CMU-44, CMU-51, CMU-90, CMU-181 y CMU-183 pertenecen a la especie *H. lixii/ T. harzianum*. El aislado CMU-8 a *H. atroviridis/ T. atroviride*; CMU-21 a *T. gamsii*; CMU-66, CMU-231 y CMU-236 a *H. viridescens/ T. viridescens*; CMU-218 a *H. rufal T. viride*; CMU-221 y CMU-222 a *T. tomentosum*; y CMU-234 a *H. koningii/ T. koningii*. Estos resultados se confirmaron mediante el análisis filogenético (Fig. 3) realizado con la secuencia parcial del gen *tef1*, en el cual se puede observar que los aislados CMU-1, CMU-14, CMU-16, CMU-18, CMU-19, CMU-23, CMU-25, CMU-34, CMU-43, CMU-44, CMU-51, CMU-90, CMU-181 y CMU-183 se agrupan con especies previamente reportadas de *H. lixii/ T. harzianum*. Los aislados CMU-221 y CMU-222 se agrupan con especies de *T. tomentosum*. Los aislados CMU-8, CMU-21, CMU-218 y CMU-234 se agrupan con especies de *H. atroviridis/ T. atroviride*, *T. gamsii*, *H. rufal T. viride* y *H. koningii/ T. koningii*, respectivamente. Los aislados CMU-66, CMU-231 y CMU-236 se agrupan con distintas cepas de *H. viridescens/ T. viridescens* (Fig. 3-A).

El árbol filogenético generado muestra la separación de las especies en dos grandes clados. El primero de ellos está formado por especies de la sección *Pachybasium* B, que incluye a *H. lixii/ T. harzianum* y *T. tomentosum*. El segundo clado incluye a las especies de *H. atroviridis/ T. atroviride*, *T. gamsii*, *H. rufal T. viride*, *H. koningii/ T. koningii* y *H. viridescens/ T. viridescens* que pertenecen a la sección *Trichoderma*. Con las secuencias de la región ITS se construyeron diversos árboles filogenéticos, sin embargo, en todos ellos se obtuvo una baja resolución (datos no mostrados). El patrón de agrupamiento de los aislados silvestres de *Trichoderma* spp., la separación de los clados por secciones y un valor Bootstrap del 99%, respaldan fuertemente la identidad de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. aquí estudiadas.

Debido a que 14 de los 23 aislados silvestres de *Trichoderma* spp., pertenecen a la especie *H. lixii/ T. harzianum*, la resolución del árbol en el clado de la sección *Pachybasium* es baja y por lo tanto, es difícil definir si se trata de cepas

distintas de *H. lixii*/ *T. harzianum*. Para determinar la relación filogenética entre estos aislados, se vincularon las secuencias de la región ITS y *tef1* de los 23 aislados silvestres de *Trichoderma* spp., y se construyó un árbol filogenético. La concatenación de las secuencias produjo mayor resolución entre los aislados de *H. lixii*/ *T. harzianum*, confirmando la presencia de cepas genéticamente diferenciadas (Fig. 3-B). Además, el árbol generado es consistente con el agrupamiento del árbol del gen *tef1* (Fig. 2-A), excepto que hay un cambio en el agrupamiento de los aislados CMU-19 y CMU-23, los cuales forman un solo clado con las cepas CMU-14, CMU-18, CMU-16 y CMU-25. Este cambio de posición al concatenar las secuencias ITS y *tef1*, sugiere que puede haber diversidad genética adicional en el genoma de estas cepas, lo que las hace aislados potencialmente prometedores para análisis genómico.

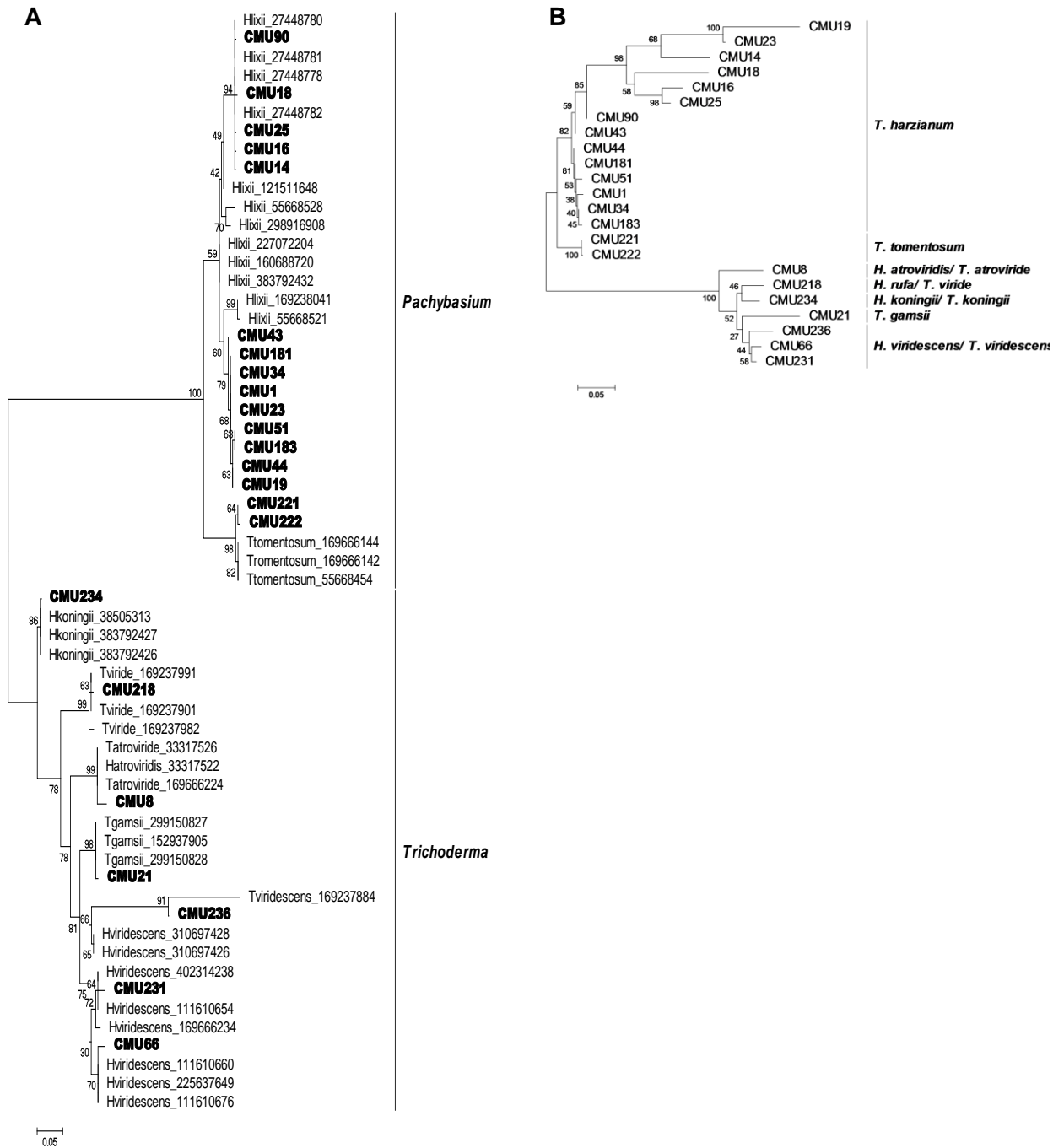


Figura 3. Relaciones filogenéticas de los aislados de *Trichoderma* estudiados. **A.** Árbol filogenético de las secuencias de nucleótidos del gen *tef1*. Las secuencias de los aislados silvestres de *Trichoderma* spp., están indicadas con la clave CMU. Las secuencias seleccionadas de NCBI aparecen con el número de acceso al GenBank El árbol se construyó mediante el método de Máxima Probabilidad utilizando el modelo Kimura-2-Gamma en Mega V5.05, a partir de alineamientos obtenidos en ClustalX. Los números sobre las ramas representan el valor bootstrap y son el resultado de 1000 réplicas. La escala indica una distancia equivalente a 0.05 sustituciones de nucleótido por sitio. **B.** Dendrograma de las regiones genéticas ITS-*tef1* concatenadas de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp.

Ensayos de decoloración/oxidación de las cepas de estudio

La capacidad de los aislados silvestres del género *Trichoderma* para degradar compuestos fenólicos se evaluó mediante ensayos de decoloración y oxidación en placa. Todas las cepas de *Trichoderma* decoloraron más de un colorante con diferente nivel de eficiencia, pero ninguna fue capaz de decolorarlos todos (Tabla 2). El Naranja de Metilo fue degradado por las 23 cepas evaluadas. Aunque el colorante Fucsina Ácida fue decolorado con mayor eficiencia que el Naranja de Metilo, los aislados CMU-23, CMU-231 y CMU-236 no fueron capaces de actuar sobre éste. En relación a los colorantes Azul Ácido 1, Índigo Carmín y RBBR, la decoloración inició con la formación de zonas claras en el centro de la colonia, las cuales se extendieron conforme incrementó el diámetro micelial. Ninguna de las cepas fue capaz de decolorar los medios con los colorantes Azul Directo 71 y CSB6B (Tabla 2). El tiempo de decoloración varió de acuerdo a la cepa y al tipo de colorante empleado. No obstante, la decoloración se observó después de 5 a 10 días de que el micelio alcanzó el límite de la placa.

Los ensayos con ácido tánico resultaron en la aparición temprana de una coloración café oscuro en el medio de cultivo. En algunos casos, particularmente en las cepas CMU-1, CMU-8 y CMU-218, esta coloración apareció incluso desde las 12 horas de incubación y se extendió con el avance micelial. La mayoría de los aislados silvestres de *Trichoderma* spp., fueron capaces de oxidar el ácido tánico con diferente eficiencia; sin embargo, en las cepas CMU-18, CMU-25, CMU-34, CMU-43 y CMU-90 no se observó oxidación aun cuando el micelio cubrió la placa. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* no fueron capaces de oxidar el guayacol. No obstante, en algunos cultivos se observó una tenue coloración café rojizo luego de que el micelio llenó la placa. En el caso de la cepa CMU-218 la oxidación del guayacol se presentó desde el segundo día y a medida que incrementó el tiempo de incubación la coloración café rojizo fue más intensa (Tabla 2).

Tabla 2. Ensayos cualitativos para evaluar la capacidad de decoloración/oxidación de aislados silvestres de *Trichoderma* spp.

CLAVE CMU	ESPECIE	COLORANTES										SUSTRATOS			Taza de crecimiento (cm/día)		Categoría de crecimiento ^c
		NM	AA1	FA	IC	RBBR	AD71	CSB6B	AT	GU	MM (control) ^a	Indicador ^b					
CMU-1	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	+	+	++	-	++	-	+++	+	-	-	-	+++	+	2.22	2.47	Rápido
CMU-14	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	+	+	++	+++	++	-	+++	+	-	-	-	+	+	2.22	2.15	Rápido
CMU-16	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	+	+	+++	+++	-	-	+++	+	-	-	-	+	+	3.12	3.03	Rápido
CMU-18	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.12	3.03	Rápido
CMU-19	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	+	-	++	-	-	-	-	+	-	-	-	+	++	2.60	2.35	Rápido
CMU-23	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	+	+	-	-	++	-	-	+++	-	-	-	+++	-	3.12	2.41	Rápido
CMU-25	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	+	++	+	+++	++	-	++	-	-	-	-	-	+	1.95	1.87	Medio
CMU-34	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	++	-	++	++	-	-	++	-	-	-	-	-	+	2.60	2.62	Rápido
CMU-43	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	2.22	2.47	Rápido
CMU-44	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	+	+	+	++	+	-	++	-	-	-	-	++	-	2.60	2.35	Rápido
CMU-51	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	+	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	+++	-	2.60	2.47	Rápido
CMU-90	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	+	-	+++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2.60	1.74	Rápido
CMU-181	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	++	+	+	+	++	-	++	-	-	-	-	+++	-	3.12	2.35	Rápido
CMU-183	<i>H. lixii/ T. harzianum</i>	+	+	+++	-	++	-	-	-	-	-	-	+++	-	2.60	1.80	Rápido
CMU-66	<i>H. viridescens/ T. viridescens</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	0.97	1.17	Lento
CMU-231	<i>H. viridescens/ T. viridescens</i>	+	-	-	+	++	-	++	-	-	-	-	+++	-	0.50	0.77	Lento
CMU-236	<i>H. viridescens/ T. viridescens</i>	+	++	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	1.11	0.86	Medio
CMU-221	<i>T. tomentosum</i>	++	++	+	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	3.12	2.62	Rápido
CMU-222	<i>T. tomentosum</i>	++	-	+++	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	1.95	1.38	Medio
CMU-8	<i>H. atroviridis/ T. atroviride</i>	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	2.22	2.13	Rápido
CMU-218	<i>H. rufa/ T. viride</i>	+	++	+	-	-	-	++	-	-	-	-	+++	+++	1.20	0.71	Medio
CMU-234	<i>H. koningii/ T. koningii</i>	++	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	0.42	1.19	Lento
CMU-21	<i>T. gamsii</i>	+	+	+++	-	+	-	+	-	-	-	-	+++	+	2.60	2.24	Rápido

Clave: ++++, decoloración/oxidación intensa; ++, decoloración/oxidación moderada; +, decoloración/oxidación baja; -, no presentó decoloración/oxidación. **NM**, Naranja de Metilo; **AA1**, Azul Ácido 1; **FA**, Fucsina Ácida; **IC**, Indigo Carmin; **RBBR**, Azul Remazol Brillante R; **AD71**, Azul Directo 71; **CSB6B**, Chicago Sky Blue 6B; **AT**, Ácido Tánico; **GU**, Guayacol. ^a Diámetro colonial de las cepas de *Trichoderma* en MM (control) y ^b promedio del diámetro colonial en cultivos suplementados con 6 diferentes indicadores (No se consideraron los cultivos en AD71, CSB6B y AT debido a que se observó inhibición del crecimiento micelial a la concentración evaluada). ^c En base a la tasa de crecimiento las cepas se clasificaron como de: rápido crecimiento (2.0-3.0 cm/día), mediano crecimiento (1.0 – 1.99 cm/día) y lento crecimiento (0.5 – 0.99 cm/día).

Al adicionar los diferentes compuestos al medio de cultivo, la mayoría de los aislados presentaron un crecimiento micelial similar al control en MM (Tabla 2). En condiciones control, la tasa de crecimiento osciló entre 0.42 y 3.12 cm/día, mientras que el promedio del diámetro micelial en cultivos suplementados con los indicadores Naranja de Metilo, Azul Ácido 1, Fucsina Ácida, Índigo Carmín, RBBR y Guayacol se encontró entre 0.71 y 3.03 cm/día (Tabla 2). La presencia de Azul Directo 71, CSB6B y ácido tánico, inhibió el crecimiento de las cepas. Éste efecto fue más pronunciado con CSB6B. En el caso de los aislados CMU-23, CMU-90, CMU-181, CMU-183, CMU-218, CMU-221, CMU-222 y CMU-236 la adición de los compuestos fenólicos inhibió el crecimiento micelial, en tanto que en las cepas CMU-66, CMU-231 y CMU-236 lo incrementó. En todos los cultivos se observó abundante formación de conidias.

Cinéticas de crecimiento en medio líquido y actividad de lacasa extracelular

Con base en los resultados de decoloración y oxidación, así como en la capacidad de crecimiento en presencia de los colorantes y sustratos empleados se seleccionaron las cepas CMU-1, CMU-8, CMU-218 y CMU-221 para evaluar la actividad de lacasa extracelular en medio líquido. En las cinéticas de crecimiento de las cepas analizadas se observó una fase lag de duración variable, seguida de un crecimiento exponencial que se mantuvo hasta el noveno día de incubación. La cepa CMU-218 mostró una fase lag de ocho días, luego de la cual presentó una fase exponencial de 12 h (Fig. 4). La producción de biomasa fue similar en todas las cepas analizadas, siendo *T. atroviride* (CMU-8) la que presentó los niveles más bajos (Tabla 3). La adición de rastrojo de sorgo al medio de cultivo estimuló el crecimiento de todas las cepas. Este efecto fue más pronunciado en la cepa CMU-8, seguido de la cepa CMU-221 y CMU-1. En la cepa CMU-218, la producción de biomasa entre el cultivo con rastrojo y el cultivo en estado basal no mostró diferencias significativas, contrario a lo que se observó en el resto de las cepas (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad extracelular de lacasa y producción de biomasa en cepas silvestres de *Trichoderma* spp.

Especie (Clave CMU)	Biomasa (Basal) Mg	Biomasa (RS) Mg	Relación de biomasa (RS/ Basal)	Actividad máxima (Basal) mU/mL	Actividad máxima (RS) mU/mL	Relación de actividad (RS/ Basal)
<i>T. harzianum</i> (CMU-1)	55.33 (± 0.001) ^a	104.00 (± 0.01) ^a	1.87	1313.88 (± 0.04) ^a	875.42 (± 0.08) ^a	0.66
<i>T. atroviride</i> (CMU-8)	43.36 (± 0.002) ^b	151.60 (± 0.04) ^b	3.49	nd	1321.52 (± 0.03) ^b	~1321.52
<i>T. viride</i> (CMU-218)	65.96 (± 0.002) ^c	79.20 (± 0.003) ^c	1.20	763.88 (± 0.08) ^b	2115.97 (± 0.1) ^c	2.77
<i>T. tomentosum</i> (CMU-221)	63.63 (± 0.001) ^d	106.90 (± 0.003) ^d	1.68	799.53 (± 0.06) ^c	1502.31 (± 0.08) ^d	1.87

RS, incubación en presencia de rastrojo de sorgo; nd, no detectada

En cada columna los valores que tienen diferente letra de superíndice presentan diferencias significativas ($p < 0.05$). Para todas las cepas, excepto para el crecimiento de CMU-218, las diferencias en los valores de crecimiento y actividad enzimática entre los cultivos basales y con RS son significativas.

En condiciones basales, la cepa CMU-1 mostró la máxima actividad de lacasa en el sexto día de incubación, en tanto que en el cultivo con rastrojo de sorgo la máxima actividad se presentó en el tercer día de incubación (Fig. 4). De manera interesante, mientras que en condiciones basales la actividad de lacasa se presentó en fase estacionaria, en el cultivo inducido ésta se mostró hacia la etapa final de la fase exponencial y en el inicio de la estacionaria (Fig. 4).

Para la cepa CMU-8 no se detectó actividad de lacasa extracelular en el medio no inducido, mientras que en el cultivo con rastrojo dicha actividad se extendió desde el primero hasta el sexto día de incubación, con un máximo hacia el quinto día (Fig. 4), momento en el que inicia una segunda fase logarítmica de crecimiento, después de un estado estacionario transitorio.

En la cepa CMU-218 la actividad máxima de lacasa extracelular del cultivo basal se presentó en el cuarto día de incubación, manteniéndose en niveles detectables hasta el sexto día. En el cultivo con rastrojo de ésta cepa, la máxima actividad de lacasa se detectó en el quinto día de incubación (Fig. 4). Mientras que la actividad en el cultivo con rastrojo se presentó durante la fase estacionaria, en el cultivo basal ésta apareció durante la prolongada fase lag de la cepa y se detectó todavía en el inicio de una fase logarítmica tardía.

Para el caso de la cepa CMU-221, en estado basal la máxima actividad de lacasa se detectó en el noveno día de incubación, en tanto que en rastrojo de sorgo fue en el cuarto día de incubación. Mientras que en el cultivo con rastrojo la actividad de lacasa aparece desde el primero hasta el noveno día de incubación, en cultivo

basal únicamente se detectó en el noveno día, en ambas condiciones dentro de la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 4).

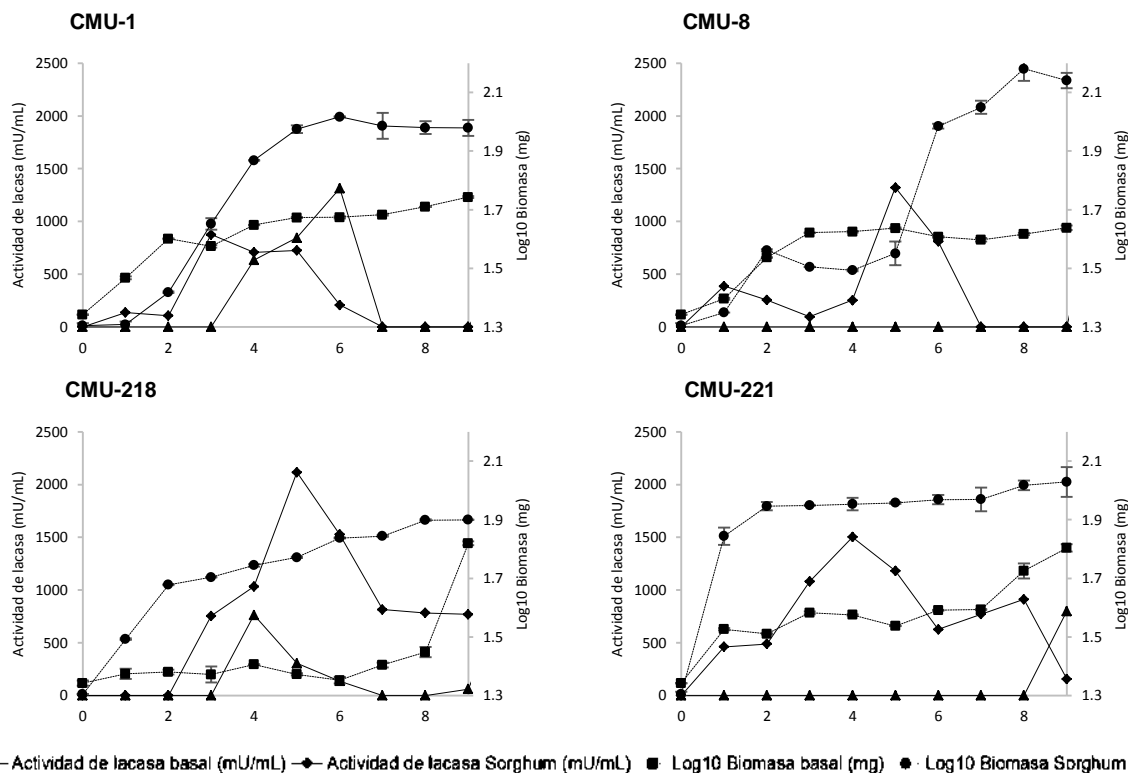


Figura 4. Cinéticas de crecimiento y actividad de lacasa extracelular de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. Los cultivos se incubaron a 28 °C y 120 rpm. Se muestran las cinéticas de *T. harzianum* (CMU-1), *T. atroviride* (CMU-8), *T. viride* (CMU-218) y *T. tomentosum* (CMU-221).

DISCUSIÓN

Crecimiento de las cepas de estudio

En el presente trabajo se realizó un escrutinio del potencial ligninolítico en 23 cepas silvestres de *Trichoderma* spp., con base en ensayos de decoloración/oxidación en medio sólido. A las cepas seleccionadas se les realizó una evaluación para determinar la capacidad de producción de lacasas extracelulares. Adicionalmente, debido a que las cepas analizadas provenían de distintos ecosistemas de bosque templado del Estado de Michoacán, pero no se había corroborado plenamente su identidad taxonómica, se realizó un análisis filogenético molecular con tal objetivo.

En México, los estudios enfocados a la caracterización de cepas de hongos silvestres con potencial ligninolítico son escasos y están enfocados principalmente a la selección de basidiomicetos (Hernández-Luna *et al.* 2008; Tapia-Tussell *et al.*

2011; Cruz *et al.* 2012), aunque también se han evaluado especies de ascomicetos (Vázquez-Garcidueñas *et al.* 2012). Este estudio es el primero en analizar de manera sistemática una colección de aislados del género *Trichoderma* provenientes de México, con la finalidad de evaluar su capacidad para oxidar/decolorar distintos compuestos fenólicos y producir lacasas extracelulares.

El aislamiento, preservación y estudio de cepas fúngicas nativas es de gran importancia tanto para la protección del germoplasma como para ampliar los conocimientos acerca de la biodiversidad en una región determinada (Ryan y Smith, 2004); además, los ceparios fúngicos ayudan a promover el desarrollo de procesos y productos biotecnológicos en diversas áreas de la industria (Ryan y Smith, 2004; Cameotra, 2007). En particular, debido a la diversidad de aplicaciones potenciales, el aislamiento de hongos silvestres con actividad ligninolítica ha sido de interés para distintos grupos en diferentes regiones geográficas (Levin *et al.* 2004; Dhouib *et al.* 2005). Las cepas analizadas en el presente trabajo se recuperaron de stocks conservados en agua destilada por más de tres años, por lo que la evaluación de la capacidad de crecimiento de dichas cepas era importante. Aunque las cepas presentaron diferencias significativas en velocidad de crecimiento en medio sólido, los resultados obtenidos mostraron que todas las cepas analizadas conservaron una capacidad fisiológica adecuada para el crecimiento *in vitro*, ya que aún las cepas de crecimiento más lento fueron capaces de llenar la caja de cultivo en un máximo de 8 días de incubación.

Se ha documentado que *T. viride* (McGinnis *et al.* 1974), *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii* y *Trichoderma* sp. (Bueno y Gallardo, 1998) pueden sobrevivir almacenados en agua destilada hasta 24 meses. Aquí se reporta la posibilidad de conservar cepas de distintas especies del género *Trichoderma* hasta 3 años en agua. La preservación en agua puede ocasionar modificaciones fisiológicas y genéticas de las cepas; no obstante, dicho método sigue siendo ampliamente utilizado debido a su bajo costo y sencillez (Ryan y Smith, 2004). Los resultados aquí obtenidos confirman que la preservación en agua es un método adecuado para conservar a mediano plazo cepas del género *Trichoderma*, aunque no se evaluó la presencia de modificaciones genéticas durante el proceso de guardado, algo que

sería interesante analizar a futuro. Adicionalmente, aunque previamente se ha documentado la aplicación de marcadores genético moleculares para la identificación de cepas de *Trichoderma* depositadas en ceparios (Kuhls *et al.* 1995), en este trabajo se utilizan por primera vez la región ITS de la Unidad Ribosomal Nuclear y el gen del factor de alargamiento de la traducción (*tef1*), para validar la identidad de cepas de *Trichoderma* spp. depositadas en un cepario y reactivadas para su estudio.

Análisis filogenético de las cepas de *Trichoderma* spp.

La correcta identificación de las especies del género *Hypocrea/Trichoderma* es de suma importancia para establecer patrones de diversidad, ecología y filogenia. Además, una identificación adecuada posibilita un buen uso de especies de interés biotecnológico e industrial. El enfoque clásico para la identificación de las especies del género *Trichoderma* se ha basado en las diferencias morfológicas y en los patrones de crecimiento. Sin embargo, debido a la homoplasia de los caracteres morfológicos dentro del género, la identificación de las especies es complicada y propensa a errores (Kubicek *et al.* 2008).

El desarrollo de técnicas moleculares ha facilitado en gran medida la taxonomía y filogenia de las especies del género *Trichoderma* (Lu *et al.* 2004). A la fecha, se ha reportado la identificación de cientos de cepas de *Hypocrea/Trichoderma* mediante el uso de diversos marcadores filogenéticos. La región interespaciadora (ITS) de la Unidad Ribosomal Nuclear es uno de los marcadores más usados, debido a que es específica de especie y está presente en más de 90 copias por genoma, por lo que puede ser fácilmente amplificada. Por lo anterior, los primeros análisis filogenéticos se realizaron empleando dicha región genética. Así, Hermosa *et al.* (2000) reportaron la identificación y caracterización molecular de 16 aislados de *Trichoderma* spp., a partir del análisis de la región ITS1-5.8S-ITS2 (identificada también solo como ITS). No obstante, un inconveniente en el uso de la región ITS es que en algunos clados proporciona baja resolución filogenética, particularmente en aquellas que están formadas por especies estrechamente relacionadas (Samuels, 2006). Esta puede ser una de las razones que contribuye a explicar la baja resolución filogenética obtenida en los distintos árboles construidos

en base a la región ITS de los aislados silvestres de *Trichoderma* spp., analizados en éste trabajo (datos no mostrados).

Los estándares actuales indican el empleo de dos o más marcadores moleculares para la correcta identificación de las especies dentro de *Trichoderma* y que la relación filogenética debe de ser congruente entre árboles construidos a partir de diferentes genes (Chaverri *et al.* 2003). Además de la región ITS, otros 10 *loci* o fragmentos de genes han sido evaluados con el objetivo de incrementar la certeza en la identificación de las especies de *Hypocrea/ Trichoderma*, siendo los más prometedores el factor de elongación 1-alfa (*tef1* y *EF-1 α*) y la endoquitinasa 42 (*ech42*) (Kullnig-Gradinger *et al.* 2002; Druzhinina *et al.* 2005). El gen *tef1* es más variable que la región ITS, por lo que proporciona una excelente resolución y altos valores bootstrap en cladas conformadas por taxones estrechamente relacionados como *H. lixii/ T. harzianum*, o especies de *H. rufa* (*H. atroviridis/ T. atroviride*, *H. koningii/ T. koningii* y *H. rufa/ T. viride*) (Druzhinina *et al.* 2005). Empleando la combinación de genes ITS y *tef1*, Roberts *et al.* (2010) pudieron identificar 33 aislados de *Trichoderma* spp.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se realizó el análisis filogenético de las cepas de estudio empleando la región ITS y del gen *tef1*, lo cual permitió definir de manera robusta la identidad taxonómica de los aislados silvestres de *Trichoderma*. Con base en dicho análisis, se logró determinar que 14 de las 23 cepas pertenecen a la especie *T. harzianum* (CMU-1, CMU-14, CMU-16, CMU-18, CMU-19, CMU-23, CMU-25, CMU-34, CMU-43, CMU-44, CMU-51, CMU-90, CMU-181 y CMU-183) y el resto a *H. atroviridis/ T. atroviride* (CMU-8), *T. gamsii* (CMU-21), *H. viridescens/ T. viridescens* (CMU-66, CMU-231 y CMU-236), *H. rufa/ T. viride* (CMU-218), *T. tomentosum* (CMU-221 y CMU-222) y *H. koningii/ T. koningii* (CMU-234). La identificación de las especies de *Hypocrea/ Trichoderma* se ha realizado alrededor del mundo (Kubicek *et al.* 2003), siendo *T. harzianum* la especie más comúnmente encontrada y la única realmente considerada como cosmopolita (Samuels, 2006). Esto puede explicar por qué el 60% de los aislados silvestres de *Trichoderma* reportados en éste trabajo pertenecen a la especie de *T. harzianum*. No obstante, es importante tener en cuenta que *T. harzianum* es considerado un complejo, el cual

esta constituido de subgrupos cuya jerarquía taxonómica aun no ha sido bien definida (Druzhinina *et al.* 2010). Por lo que algunos de los aislados aquí estudiados, pueden pertenecer a distintos subgrupos dentro de dicho complejo, algo que tiene que ser evaluado con mayor profundidad a futuro.

Ensayos de decoloración/oxidación de *Trichoderma* spp.

Los ensayos de decoloración/oxidación en medio sólido han sido ampliamente utilizados para la selección de cepas fúngicas productoras de enzimas ligninolíticas extracelulares. Sustratos fenólicos como el guayacol (Arora y Sandhu, 1985; Morisaki *et al.* 2001; Kiiskinen *et al.* 2004; Erden *et al.* 2009) y el ácido tánico (Kiiskinen *et al.* 2004; Lin *et al.*, 2011); así como colorantes entre los que se incluye al RBBR (Kiiskinen *et al.* 2004; Yamaguchi *et al.* 2007; Casieri *et al.* 2010) y otros utilizados en el presente trabajo, han mostrado su eficiencia para la selección de cepas con potencial biotecnológico. Este tipo de ensayos ha permitido aislar cepas de *Trichoderma* spp. con capacidad de decoloración (Kiiskinen *et al.* 2004; Dhouib *et al.* 2005; Gochev y Krastanov, 2007), algunas de las cuales presentan actividad de lacasa extracelular en medio líquido (Dhouib *et al.* 2005; Gochev y Krastanov, 2007).

Hay pocos reportes sobre la capacidad de decoloración de colorantes industriales por parte de cepas de *Trichoderma*. En la mayoría de los casos se ha analizado específicamente la capacidad del micelio para absorber colorantes, sin evaluar alguna posible actividad enzimática involucrada (Abd El-Rahim *et al.* 2003, Sadhasivam *et al.* 2007 a, Sivasamy y Sundarabal 2011). Se ha documentado la capacidad de una cepa marina de *Trichoderma* sp. para decolorar medio líquido con RBBR, aunque no está claro si es mediante absorción o proceso enzimático (Da Silva *et al.* 2008). Solo un estudio documenta la actividad de lacasa de *T. harzianum* en extracto crudo y fue purificada para degradar colorantes (Sadhasivam *et al.* 2009), pero como se discute más adelante es poco probable que dicha enzima sea una lacasa *sensu stricto*, ya que esta especie no posee genes de lacasa extracelular. Aunque en este estudio no se evaluó la capacidad de decoloración en medio líquido en relación a la actividad de lacasa extracelular, el escrutinio en medio sólido

permitió identificar cepas con actividad de lacasa extracelular, lo cual fue corroborado con ensayos en medio líquido.

Las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. aquí estudiadas presentaron diferente capacidad para decolorar/oxidar los compuestos utilizados. En la búsqueda de hongos ligninolíticos previamente se han documentado distintos patrones de decoloración/oxidación entre cepas; aunque la mayoría de dichos análisis se han realizado en distintos grupos taxonómicos o ecológicos de hongos basidiomicetes (Jaros-Wilkolazka *et al.* 2002, Barrasa *et al.* 2009, Anastasi *et al.* 2010, Casieri *et al.* 2010). En basidiomicetes de especies del mismo género se han documentado diferencias interespecíficas e intraespecíficas para decolorar el colorante RBBR y otros colorantes probados en el presente estudio, por ejemplo, en especies de los géneros *Agaricus*, *Heterobasidion* y *Suillus*, entre otros (Casieri *et al.* 2010). No obstante, en ascomicetes o sus estados anamorfos no existen estudios similares en los que se documenten diferencias interespecíficas o intraespecíficas en un grupo de especies del mismo género. En el presente trabajo, las diferencias tanto interespecíficas como intraespecíficas son evidentes ya que aún en *T. tomentosum*, del cual únicamente se contrastaron dos cepas, se pudieron observar variaciones en la capacidad de oxidación/decoloración. Este resultado enfatiza la importancia de seguir realizando estudios de selección de cepas en hongos en general y dentro del género *Trichoderma* en particular; ya que siempre es factible encontrar nuevas variantes fisiológicas/genéticas de una especie previamente estudiada y descartada por su aparente falta de potencial biotecnológico.

Kiiskinen *et al.* (2004) reportaron una mejor correlación entre los ensayos de decoloración y la oxidación de guayacol, que con el empleo de ácido tánico, algo no observado en las cepas de *Trichoderma* aquí estudiadas. En general, la mayoría de las cepas pudieron oxidar más eficientemente el ácido tánico que el guayacol. El guayacol es un monofenol sustituido que es oxidado por las lacasas a aldehídos y mediante una reacción de polimerización forman zonas café-rojizo en el medio de cultivo (Buddolla *et al.* 2008). El ácido tánico es un compuesto polifenólico, con una estructura similar a la lignina, que al ser oxidado por las lacasas forma estructuras cromóforas fácilmente detectables. Cuando es oxidado por una lacasa, el sustrato

pierde un solo electrón y usualmente forma un radical libre (Bento *et al.* 2010). En el caso de los cultivos de *Trichoderma* spp. adicionados con ácido tánico, los radicales libres pueden estar actuando como mediadores redox para facilitar la oxidación de la molécula.

La eficiencia de la oxidación depende de la estructura química de cada colorante, ya que pequeñas diferencias estructurales pueden afectar marcadamente su oxidación. Estas diferencias son debidas, al menos en parte, a la distribución electrónica y a la densidad de carga (Lucas *et al.* 2008). Se ha reportado que los colorantes tipo azo son más recalcitrantes a la transformación fúngica que colorantes con otras estructuras químicas (Jaros-Wilkolazka *et al.* 2002), debido a que los grupos azo y sulfo unidos a anillos aromáticos no se presentan naturalmente. Esto coincide, de manera general, con el esquema de decoloración de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp., puesto que no fueron capaces de degradar los colorantes azo Azul Directo 71 y CSB6B. No obstante, el Naranja de Metilo, otro colorante azo, fue el único colorante degradado por todas las cepas de *Trichoderma* spp. En éste sentido, se ha reportado que la biodegradabilidad del colorante está relacionada a la naturaleza, al número y a la posición de los sustituyentes en el anillo fenólico. La posición para- en relación al grupo azo, así como la presencia de grupos metil o metoxi, parecen ser más favorables para la donación de los electrones (Pasti-Grigsby *et al.* 1992). Estas dos características están presentes en la estructura química del Naranja de Metilo, lo que podría explicar por qué fue el único azo-colorante atacado por todas las especies y cepas de *Trichoderma*.

El hecho de que la mayoría de los aislados de *Trichoderma* spp. decoloraron la Fucsina Ácida y el Azul Ácido 1 es interesante, ya que previamente se ha documentado que la lacasa de hongos basidiomicetos (*Trametes versicolor*) y ascomicetos (*Aspergillus oryzae* y *Paraconiothyrium variabile*) atacan lentamente a los colorantes del tipo trifenilmetano, requiriendo de tiempos de incubación más largos para su degradación (Forootanfar *et al.* 2012). Por lo anterior, este resultado sugiere que las capacidades catalíticas de la lacasa producida por algunas cepas de *Trichoderma* le permiten degradar colorantes recalcitrantes.

Se ha reportado que la capacidad fúngica para oxidar colorantes es un proceso del metabolismo secundario que ocurre únicamente cuando disminuyen los niveles de nutrientes (Levin *et al.* 2004). Es muy factible que dicho proceso fisiológico se esté presentando en las cepas de *Trichoderma* evaluadas, ya que la decoloración de algunos de los colorantes se evidenció después de 15 días de incubación, cuando los cultivos se encuentran en fase estacionaria de crecimiento.

Además del presente trabajo, existen reportes previos sobre la capacidad de hongos ascomicetos y sus estados anamorfos para decolorar colorantes con distintas estructuras químicas. Por ejemplo, se ha reportado la capacidad de los hongos filamentosos *Pestalotia* sp. y *Tolyposcladium* sp. y la levadura *Geotrichum* sp. para decolorar colorantes tipo azo y antraquinona (Jarosz-Wilkolazka *et al.* 2002). En algunos casos dicha actividad ha sido directamente relacionada con la actividad de lacasa extracelular. Así, se ha documentado la capacidad de la lacasa del ascomicete *Myceliophthora thermophila* para decolorar colorantes del tipo de las antraquinonas y azo (Naranja de Metilo), en ausencia y en presencia de un mediador redox (Kunamneni *et al.*, 2008); aunque dicha enzima no atacó al colorante RBBR. Las lacasas de los hongos ascomicetos *Aspergillus oryzae* y *Paraconiothyrium variabile* degradaron eficientemente el colorante RBBR (Forootanfar *et al.* 2012).

Tanto los resultados aquí mostrados como los antecedentes de la literatura, muestran que la búsqueda de ascomicetos con capacidades de decoloración/oxidación *in vitro* permite la identificación de cepas con potencial biotecnológico y, particularmente, de aquellas que producen lacasas extracelulares con características catalíticas particulares. No obstante, después del escrutinio en medio sólido, siempre es necesario realizar ensayos que demuestren la actividad de lacasa en las cepas seleccionadas, ya que se ha comprobado que la oxidación/decoloración puede ser mediada por otras actividades enzimáticas (Yang *et al.* 2003) o por procesos no enzimáticos, como la oxidación por metales (Podgornik *et al.* 2001a) y la bioabsorción (Anastasi *et al.* 2009).

Actividad de lacasa basal e inducida de las cepas seleccionadas

Con base en los ensayos de decoloración/oxidación, las cepas seleccionadas para los ensayos de actividad de lacasa en medio líquido fueron de las especies *T. harzianum* (CMU-1), *T. atroviride* (CMU-8), *T. viride* (CMU-218) y *T. tomentosum* (CMU-221). El cultivo en medio líquido de estas cuatro especies bajo condiciones basales e inducidas con rastrojo de sorgo, permitió determinar cuantitativamente la actividad de lacasa extracelular. En general, los picos de máxima actividad tanto basal como inducida, se observaron en las fases estacionaras de crecimiento. No se detectaron actividades de lacasa basales de *T. atroviride* y *T. tomentosum* y, de manera interesante, en el caso de la cepa CMU-1 de *T. harzianum*, la actividad basal de lacasa detectada es superior a aquella producida por la adición de sorgo.

La detección de actividad enzimática de lacasa extracelular en la cepa de *T. harzianum* resulta sorprendente, ya que en el genoma de la cepa CBS 433.97 de dicha especie, no se detectaron genes que codifiquen lacasas extracelulares (Cázares-García *et al.* 2013). No obstante, otros estudios ha reportado la actividad de lacasa extracelular en cepas de *T. harzianum* (Savoie *et al.*, 2001; Holker y Hofer, 2002; Sadhasivam *et al.* 2008; Gao *et al.* 2013), y se ha vinculado dicha actividad en la decoloración de distintos colorantes azo (Sadhasivam *et al.* 2009) y al tratamiento de residuos de papel con impresiones térmicas (Divya *et al.* 2013a). También se ha reportado la actividad de lacasa asociada a conidias (Pokorný *et al.* 2005; Griffith *et al.* 2007) y extractos de micelio (Griffith *et al.* 2007) de *T. harzianum*, pero dicha localización intracelular si es congruente con con el análisis bioinformático.

Diversas explicaciones pueden responder a la contradicción entre el análisis genómico y la evidencia experimental reportada. Asumiendo que los resultados del análisis genómico bioinformático se aplican a todas las cepas de *T. harzianum*, una posibilidad es que las cepas de dicha especie en las que se ha detectado actividad de lacasa extracelular no se hayan identificado correctamente y pertenezcan a otra especie del género *Trichoderma*. En algunos casos la identificación de las cepas reportadas ha sido únicamente morfológica (Sadhasivam *et al.* 2007 b), lo que, como se comentó anteriormente, puede llevar a errores de clasificación (ver apartado de análisis filogenético en ésta discusión). Esto ha ocurrido en el caso de la cepa NFCCI-2745, la cual fue inicialmente reportada como *T. harzianum* (Divya *et al.*

2013a) y posteriormente ha sido documentada como *T. viride* (Divya *et al.* 2013b), clasificación que aún puede ser errónea debido a la falta de análisis filogenético en dicha cepa. En el caso del presente trabajo, la posibilidad de una identificación errónea de la cepa CMU-1 es significativamente baja, ya que el análisis filogenético realizado es robusto y se han contemplado los criterios estándar para la identificación y el *barcoding* de las especies dentro del género *Trichoderma* (ver apartado de análisis filogenético de esta discusión).

Una segunda posibilidad para explicar la actividad de lacasa extracelular en cepas de *T. harzianum* es que el resultado del análisis genómico bioinformático de la cepa CBS 433.97 no sea representativo de todas las cepas de esta especie y exista variación intraespecífica en ese sentido. Variaciones intraespecíficas en el número de genes de lacasa han sido sugeridas para el basidiomicete fitopatógeno *Heterobasidion annosum*, en donde es posible que una cepa homocariótica haya perdido uno de los genes para dicha función enzimática (Asiegbu *et al.* 2004). En el caso del género *Morchella* de hongos ascomicetes se han encontrado diferencias en los patrones de amplificación mediante PCR y clonación de genes laccasa-*like* entre cepas de *M. crassipes* y *M. elata*, lo que puede sugerir diferencias intraespecíficas en el número de genes de lacasa en dichos taxa, lo cual no es explorado por los autores (Kellner *et al.* 2007).

La tercera posibilidad es que las actividades extracelulares detectadas en las cepas de *T. harzianum* no correspondan a las de lacasas *sensu stricto*. Aunque el ABTS ha sido utilizado de manera universal para la medición de la actividad de lacasa en hongos, dicho compuesto puede ser oxidado por otras oxidasas y peroxidasas extracelulares (Camarero *et al.* 1999, Larrondo *et al.* 2003). Por otra parte, nuestro grupo de trabajo ha detectado la presencia de genes que codifican para enzimas laccasa-*like* en *T. harzianum* (Cázares-García *et al.* en preparación), por lo que este puede ser un factor que contribuya a detectar actividad extracelular de lacasa en dicha cepa, aunque no se trate de una lacasa *sensu stricto*. Por último, se ha documentado que factores no enzimáticos como el Mn(II) pueden producir la oxidación del ABTS, ocasionando falsos positivos en la detección de actividad de

lacasa extracelular (Podgornik *et al.* 2001b), algo que también debe tomarse en cuenta en relación a la detección de actividad de dicha enzima en *T. harzianum*.

En el caso de *T. atroviride* se obtuvo una actividad máxima de 1321.52 mU/mL hacia el quinto día de incubación, en presencia de rastrojo. Previamente se ha reportado la inducción en presencia de cobre de lacasa extracelular en la cepa CTM 10476 de *T. atroviride*, alcanzando un máximo de actividad de 661 mU/mL hacia el séptimo día de incubación (Chakroun *et al.* 2010). En esta especie también se ha reportado la actividad de lacasa en conidias (Pokorný *et al.* 2005). De manera similar a lo encontrado en el presente estudio, en la cepa CTM 10476 no se observó actividad de lacasa extracelular basal, por lo que es necesaria la adición de cobre para su medición (Chakroun *et al.* 2010). Así, aunque el inductor empleado y el medio de cultivo fueron diferentes, los resultados encontrados para dos cepas distintas de *T. atroviride* son congruentes, y muestran que sustancias orgánicas e inorgánicas pueden inducir significativamente la actividad de lacasa extracelular en esta especie. Se ha comprobado que la adición de cobre induce la transcripción en los genes de lacasa en hongos (Piscitelli *et al.* 2011). En el caso particular de ascomicetes la regulación transcripcional por cobre se ha documentado en *Gaeumannomyces graminis* (Litvintseva y Henson 2002) y *Podospora anserina* (Fernández-Larrea y Stahl 1996). Aunque en otras especies de ascomicetes no se presenta la regulación transcripcional de lacasa con cobre (Cordoba-Cañero y Roncero 2008).

La cepa CMU-218 de *T. viride* presentó la máxima actividad de lacasa extracelular tanto basal como inducida. En *T. viride* se ha documentado la actividad de lacasa extracelular con valores máximos de 3 U/mL (Krastanov *et al.* 2007). También se ha reportado la actividad de lacasa asociada a conidias de *T. viride* (Pokorný *et al.* 2005). De manera interesante, la máxima actividad de lacasa extracelular inducida con cobre en *T. viride* en el estudio de Krastanov *et al.* (2007) se presenta hacia el cuarto día de incubación, mientras que en este estudio se observa en el quinto día de incubación, lo cual muestra congruencia entre los estudios, no obstante las diferencias en los medios de cultivo empleados.

En distintas especies de hongos ascomicetes que incluyen a *Podospora anserina* (Fernández-Larrea y Stahl 1996), *Botryosphaeria* sp. (Dekker y Barbosa 2001) *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* (Litvintseva y Henson 2002), *Fusarium oxysporum* (Cordoba y Roncero 2007) y *A. niger* (Tamayo-Ramos *et al.* 2011) se ha reportado la presencia de isoenzimas de lacasa. En el caso de basidiomicetos, también se han reportado isoformas que provienen del mismo gen y que difieren entre sí debido a procesos de *splicing* alternativo (Giardina *et al.* 2007) o diferentes modificaciones postraduccionales (Rühl *et al.* 2013). Por lo anterior, aunque el análisis genómico bioinformático sugiere que, en general, las especies del género *Trichoderma* tienen uno o máximo dos genes que codifican para la actividad de lacasa extracelular (Cázares-García *et al.* 2013), no se puede excluir la posibilidad de que procesos de *splicing* alternativo o modificación postraduccional generen variantes de lacasa adicionales.

En este trabajo se reporta por primera vez la actividad de lacasa extracelular en *T. tomentosum* (CMU-221). Otras especies del género no evaluadas en este trabajo en las que se ha reportado la actividad de lacasa extracelular son *T. longibrachiatum* (Krastanov *et al.* 2007), y *Trichoderma reesei* (Levasseur *et al.*, 2010). No obstante, en este último caso es factible que no se trate de una lacasa *sensu stricto*, ya que el análisis genómico bioinformático no detectó genes codificantes para la actividad de lacasa extracelular *sensu stricto* en dicha especie (Cázares-García *et al.* 2013).

Aunque la mayor parte de los estudios de deliginificación de rastrojo y de actividad de lacasa extracelular en presencia de dicho sustrato se han llevado a cabo en hongos basidiomicetos (Vyas *et al.* 1994, Arora y Gill 2000, Patel *et al.* 2009), se ha sugerido que los hongos ascomicetes pueden participar en el reciclaje de lignina en ecosistemas acuáticos (Simonis *et al.* 2008) y se han encontrado cepas de éste último grupo de hongos capaces de actuar sobre lignina de rastrojo (Chang *et al.* 2012, Wulandari *et al.* 2013). Ya sea con fines ecológicos o biotecnológicos, la participación de cepas de *Trichoderma* en la degradación de rastrojo utilizado como alimento para rumiantes de granja se ha evaluado por cerca de 30 años (Meevootisom *et al.* 1984, Bowen 1990, Bowen y Harper 1990, Peiji *et al.* 1997,

Thygesen *et al.* 2003, Llewellyn *et al.* 2010, van Gool *et al.* 2012). Aunque en la mayoría de dichos estudios se ha evaluado principalmente el papel de *Trichoderma* spp. en la degradación de celulosa y hemicelulosa, también se ha considerado el posible papel de fenol oxidasas en el ataque a la pared celular vegetal (Meevootisom *et al.* 1984, Druzhinina *et al.* 2012).

El rastrojo mostró una inhibición de 0.66 veces en la actividad enzimática extracelular detectada en *T. harzianum* (CMU-1) con respecto a la actividad basal. Como se mencionó anteriormente, muy probablemente la actividad que detectada en este caso sea de una ferroxidasa-lacasa, y no de una lacasa *sensu stricto*. Aunque en algunos de los estudios reportados en la literatura muy posiblemente la actividad de ferroxidasa-lacasa sea la que se este midiendo, no se ha realizado a la fecha un análisis de inducción específico para evaluar esta actividad enzimática en hongos. A futuro sería interesante en estudios de inducción diseñar experimentos que puedan distinguir entre las dos actividades enzimáticas para evaluar la redundancia funcional o la expresión diferencial en un miso proceso fisiológico.

El rastrojo produjo una inducción de la actividad enzimática extracelular de 1.87 veces en *T. tomentosum* (CMU-221). No obstante, en esta cepa no se obtuvo un producto de amplificación de lacasa *sensu stricto* con los iniciadores diseñados, por lo que es factible que también en esta cepa se esté determinado la actividad de ferroxidasa-lacasa; aunque, como se comentó anteriormente, no se puede excluir en esta cepa la presencia de otra lacasa extracelular adquirida por transferencia horizontal.

En las cepas CMU-8 de *T. atroviride* y CMU-218 de *T. viride*, el rastrojo provocó una inducción de aproximadamente de 2.77 y 1321.52 veces, respectivamente, en relación a la actividad basal. En éste último caso se considera la actividad detectada en medio con rastrojo con el número de veces que se indujo con respecto a la basal que no fue detectada. La inhibición de la actividad observada en *T. harzianum*, apoya la hipótesis de que la actividad detectada no es de una lacasa *sensu stricto*, puesto que el comportamiento enzimático difiere del resto de cepas analizadas. Recientemente se estudió el transcriptoma de *T. reesei* inducido con rastrojo de trigo (Bischof *et al.* 2013) y el secretoma de la misma especie inducido

con rastrojo de maíz (Adav *et al.* 2012); mientras que en el primer caso no se reportan transcritos relacionados con la actividad de lacasa, en el segundo caso se reporta la inducción de una proteína lacasa. El análisis bioinformático (Cázares-García *et al.* 2013) es congruente con los resultados del transcriptoma, ya que no se detectaron genes de lacasa *sensu stricto* en ésta especie, por lo que es muy posible que el análisis proteómico esté detectando una lacasa-ferroxidasa, cuyos genes sí hemos detectado en *T. reesei* (Cázares-García *et al.* en preparación).

Como se mencionó con anterioridad, debido a que no existen reportes de inducción de actividad de lacasa con rastrojo en ascomicetes, las únicas comparaciones posibles de los resultados del presente trabajo son con hongos basidiomicetes. Así, la adición de rastrojo de trigo incrementó 59 veces la actividad de lacasa en *Pleurotus floridensis*, mientras que el rastrojo proveniente de arroz mostró una inducción de 22 veces dicha actividad en esta especie (Arora y Gill 2000). Otros sustratos agrícolas relacionados con la nutrición animal también incrementan la actividad de lacasa extracelular. En la cepa RC3 de *Coriolus versicolor* la presencia de salvado de arroz indujo entre 2.4 y 22 veces la actividad de lacasa extracelular (Chawachart *et al.* 2004) y la adición de aserrín de uva incrementó significativamente la actividad de lacasa extracelular en *P. pulmonaris* (Stajić *et al.* 2007). Sousa *et al.* (2002) reportaron que una cepa brasileña de *P. pulmonaris* presenta la mejor producción de lacasa cuando es cultivada con salvado de trigo. Como se ve, la inducción de actividad de lacasa con distintos materiales agrícolas en hongos basidiomicetes es significativamente mayor que la observada en *Trichoderma* spp. No obstante, en el presente trabajo no se realizó un análisis detallado de las condiciones de cultivo óptimas para la producción de lacasa extracelular en las cepas de estudio, algo que tendrá que ser evaluado a futuro.

Diferentes isoformas de lacasa reportadas en otras especies fúngicas, se han presentado tanto en la fase lag de crecimiento como en la fase exponencial y están relacionadas al desarrollo micelial y a la degradación del sustrato; en otras especies se han detectado lacasas en la fase estacionaria y se han implicado en procesos de detoxificación (Piscitelli *et al.* 2011). En la mayoría de los aislados silvestres de *Trichoderma* spp., la adición de rastrojo de sorgo al medio de cultivo indujo tanto la

actividad de lacasa extracelular como el crecimiento micelial. El pico de mayor actividad enzimática se detectó entre el segundo y el séptimo día de incubación, lo que sugiere que las lacasas de *Trichoderma* spp., participan en el establecimiento del hongo sobre el sustrato ligninolítico. En función de la forma de ataque sobre el material lignocelulósico, las especies del género *Trichoderma* están clasificadas como hongos de la pudrición blanda (Martínez *et al.* 2005). Varios estudios bioquímicos han demostrado que la degradación blanda da lugar principalmente a la disminución de los grupos *metoxi* del biopolímero de lignina, lo que conduce a la formación de cavidades microscópicas o a la erosión completa de las capas secundarias de la pared celular vegetal (Arora y Sharma 2010). A futuro es necesario evaluar si las cepas seleccionadas de *Trichoderma* spp. cumplen con las características de pudrición blanda antes mencionadas.

Dado que el tratamiento con hongos basidiomicetes puede incrementar la digestibilidad del rastrojo en estudios *in vitro* (Akin *et al.* 1995, Arora y Sharma 2009), es importante considerar a futuro la evaluación de las cepas de aquí estudiadas u otras del género *Trichoderma* en ese sentido. El hecho de que algunas especies del género *Trichoderma* sean buenas productoras de celulasas y hemicelulasas que ya son utilizadas en tratamiento de fibra para alimento animal (Morgavi *et al.* 2000), puede hacer de dichas cepas una buena herramienta para incrementar la digestibilidad de rastrojo destinado a alimentación de rumiantes de granja de manera significativa, si se añade la producción de lacasa a su arsenal enzimático. La utilización de residuos agrícolas para inducir la actividad de lacasa extracelular representa una alternativa para reducir los costos de producción de estas enzimas, permite ampliar sus aplicaciones, y representa un sistema eficiente para el uso de materiales agrícolas que en algunos casos ya nos son utilizados.

CONCLUSIONES

El presente trabajo contribuye a reforzar la utilidad de las colecciones de hongos como herramienta para la conservación de la diversidad genética y fisiológica, y como fuente de cepas para la prospección biotecnológica dentro del género *Trichoderma*. Las cepas de *Trichoderma* pueden preservarse hasta por 3

años en agua conservando su viabilidad y mostrando capacidad para producir lacasas extracelulares. Los ensayos de decoloración/oxidación constituyen una estrategia adecuada para selección de cepas con actividad de lacasa extracelular en el género *Trichoderma*. La detección de la actividad de lacasa extracelular en los cultivos líquidos de las cepas silvestres de *Trichoderma* seleccionadas sugiere que el efecto observado en los ensayos de decoloración y oxidación se debe a la secreción de lacasas al medio de cultivo. El hecho de que la adición de rastrojo de sorgo al cultivo líquido incrementó tanto la masa micelial como la actividad de lacasa extracelular indica que dichas especies utilizan el material lignocelulósico como fuente de nutrientes. La capacidad oxidativa de las lacasas extracelulares puede incrementar significativamente las aplicaciones biotecnológicas de las especies del género *Trichoderma*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abd El-Rahim, W.M., Moawad, H., Khalafallah, M. 2003. Microflora involved in textile dye waste removal. *Journal of Basic Microbiology*. 43(3): 167-174.
- [2] Aday, S. S., Chao, L. T., Sze, S. K. 2012. Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. *Molecular & Cellular Proteomics*. 11: 1–15. doi: 10.1074/mcp.M111.012419.
- [3] Akin, D. E., Rigsby, L. L., Sethuraman, A., Morrison, I. I. I., Gamble, G. R., Eriksson, K. E. L. 1995 Alterations in structure, chemistry, and biodegradability of grass lignocellulose treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(4): 1591–1598.
- [4] Anastasi, A., Prigione, V., Casieri, L., Varese, G. C. 2009. Decolourisation of model and industrial dyes by mitosporic fungi in different culture conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25:1363–1374.
- [5] Arora, D. S., Gill, P. K. 2000. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technology* 73: 283-285.
- [6] Arora, D. S., Sandhu, D. K. 1985. Survey of some Indian soils for laccase producing fungi and their lignin degrading ability. *Proceedings of the Indian Academy of Science* 94(4-6): 567–574.
- [7] Arora, D. S., Sharma, R. K. 2009. Comparative ligninolytic potential of *Phlebia* species and their role in improvement of in vitro digestibility of wheat straw. *Journal of Animal and Feed Sciences* 18: 151–161.

- [8] Arora, D. S., Sharma, R. K. 2010. Ligninolytic Fungal fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 1760–88.
- [9] Arredondo-Santoyo, M. 2009. Establecimiento de un cepario de hongos micromicetos silvestres del Estado de Michoacán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 119 pp.
- [10] Asiegbu, F. O., Abu, S., Stenlid, J., Johansson, M. 2004. Sequence polymorphism and molecular characterization of laccase genes of the conifer pathogen *Heterobasidion annosum*. *Mycological Research* 108(2): 136–148.
- [11] Assavanig, A., Amornkitticharoen, B., Ekpaisal, N., Meevootisom, V., Flegel, T. W. 1992. Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 198 – 202.
- [12] Bento, I., Silva, C. S., Chen, Z., Martins, L. O., Lindley, P. F., Soares, C. M. 2010. Mechanisms underlying dioxygen reduction in laccases. Structural and modelling studies focusing on proton transfer. *BMC Structural Biology* 10:28.
- [13] Bischof, R., Fourtis, L., Limbeck, A., Gamauf, C., Seiboth, B., Kubicek, C. P. 2013. Comparative analysis of the *Trichoderma reesei* transcriptome during growth on the cellulose inducing substrates wheat straw and lactose. *Biotechnology for Biofuels* 6:127. doi:10.1186/1754-6834-6-127
- [14] Bowen, R. M. 1990. Decomposition of wheat straw by mixed cultures of fungi isolated from arable soils. *Soil Biology and Biochemistry* 22(3): 401–406.
- [15] Bowen, R. M., Harper, S. H. T. 1990. Decomposition of wheat straw and related compounds by fungi isolated from straw in arable soils. *Soil Biology and Biochemistry* 22 (3): 393–399.
- [16] Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- [17] Buddolla, V., Chandra, M. S., Pallavi, H., Rajasekhar R. B. 2008. Screening and assessment of laccase producing fungi isolated from different environmental samples. *African Journal of Biotechnology* 7(8): 1129 – 33.
- [18] Bueno, L., Gallardo, R. 1998. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 166-168.
- [19] Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., Martínez, A. T. 1999. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 10324–330.
- [20] Cameotra, S. S. 2007. Preservation of microorganisms as deposits for patent application. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353: 849–850.

- [21] Cañero, D. C., Roncero, M. I. G. 2008. Influence of the chloride channel of *Fusarium oxysporum* on extracellular laccase activity and virulence on tomato plants. *Microbiology* 154: 1474–1481.
- [22] Casieri, L., Anastasi, A., Prigione, V., Varese, G. C. 2010. Survey of ectomycorrhizal, litter-degrading, and wood-degrading Basidiomycetes for dye decolorization and ligninolytic enzyme activity. *Antonie van Leeuwenhoek* 98:483–504.
- [23] Cázares-García SV, Vázquez-Garcidueñas MS, Vázquez-Marrufo G (2013) Structural and phylogenetic analysis of laccases from *Trichoderma*: a bioinformatics approach. *PLoS ONE* 8(1): E55295. Doi 10.1371/journal.pone.0055295.
- [24] Chakroun, H., Mechichi, T., Martinez, M. J., Dhouib, A., Sayadi, S. 2010. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry* 45: 507–513.
- [25] Chang, A. J., Fan, J., Wen, X. 2012. Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 72: 26–30.
- [26] Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J., Geiser, D. M. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 302– 313.
- [27] Chawachart, N., Khanongnuch, C., Watanabe, T., Lumyong, S. 2004. Rice bran as an efficient substrate for laccase production from thermotolerant basidiomycete *Coriolus versicolor* strain RC3. *Fungal Diversity* 15: 23–32.
- [28] Cordoba, C. D., Roncero, M. I. G. 2008. Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 98 (5): 509 – 519.
- [29] Cruz, R. M. G., Rivera-Ríos, J. M., Téllez-Jurado, A., Maqueda, G. A. P., Mercado-Flores, Y., Arana-Cuenca, A. 2012. Screening for thermotolerant ligninolytic fungi with laccase, lipase, and protease activity isolated in Mexico. *Journal of Environmental Management* 95: S256 – S259.
- [30] Da Silva, M., Passarini, M.R., Bonugli, R.C., Sette, L.D. 2008. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. *Environmental Technology*. 29(12):1331-1339.
- [31] Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W. 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. *International Journal of Biological Sciences*. 5(5): 578–595.
- [32] Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. A., Qin. W. 2009. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 1(1): 36–50.

- [33] Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M. 2001. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 81–88.
- [34] Desai, S. S., Tennali, G. B., Channur, N., Anup, A. C., Deshpande, G., Murtuza, B. P. A. 2011. Isolation of laccase producing fungi and partial characterization of laccase. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering* 1(4): 543–549.
- [35] Dhouib, A., Hamza, M., Zouari, H., Mechichi, T., Hmidi, R., Labat, M., Martínez, M. J., Sayadi, S. 2005. Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 1415–23.
- [36] Divya, L. M., Prasanth, G. K., Sadasivan, C. 2013a. Elimination of estrogenic activity of thermal paper using laccase from *Trichoderma* sp NFCCI-2745. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169 (4): 1126-1133.
- [37] Divya, L. M., Prasanth, G. K., Sadasivan, C. 2013b. Potential of the salt-tolerant laccase-producing strain *Trichoderma viride* Pers. NFCCI-2745 from an estuary in the bioremediation of phenol-polluted environments. *Journal of Basic Microbiology* doi 10.1002/jobm.201200394.
- [38] Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komon, M., Bissett, J., Szakacs, G., Kubicek, C. P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 813–828.
- [39] Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Komón-Zelazowska, M., Belayneh M. T., Bissett, J. 2010. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evolutionary Biology* 10: 94.
- [40] Druzhinina, I. S., Shelest, E., Kubicek, C. P. 2012. Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiology Letters* 337: 1–9.
- [41] Erden, E., Ucar, M. C., Gezer, T., Pazarlioglu, N. K. 2009. Screening for ligninolytic enzymes from autochthonous fungi and applications for decolorization of remazole marine blue. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40:346–353.
- [42] Eun Seon Shin, Sung Kyum Kim, Yong Ho Kim, Yu Seok Jeong, Hyunhae Jung, Seur Kee Park, Jungho Kim, Hoon Kim. 2010. Induction of laccase production and analysis of laccase isozymes in *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry* 53(2): 158–163.
- [43] Fernández-Larrea, J., Stahl, U. 1996. Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospira anserine*. *Molecular Genetics and Genomics* 252: 539–551.

- [44] Ferraroni, M., Myasoedova, N. M., Schmatchenko, V., Leontievsky, A. A., Golovleva, L. A., Scozzafava, A., Briganti, E. 2007. Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. *BMC Structural Biology* 7:60.
- [45] Forootanfar, H., Moezzi, A., Aghaie-Khozani, M., Mahmoudjanlou, Y., Ameri, A., Niknejad, F., Faramarzi, M. A. 2012. Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. *Iranian Journal of Environmental Health Sciences and Engineering* 9:27.
- [46] Gao, H., Chu, X., Wang, Y., Zhou, F., Zhao, K., Mu, Z., Liu Q (2013). Media optimization for laccase production by *Trichoderma harzianum* ZF-2 using response surface methodology. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(12): 1757–1764.
- [47] Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 369–385.
- [48] Giardina, P., Autore, F., Faraco, V., Festa, G., Palmieri, G., Piscitelli, A., Sannia, G. 2007. Structural characterization of heterodimeric laccases from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 1293–1300.
- [49] Gochev, V. K., Krastanov, A. I. 2007. Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 13: 171–176.
- [50] Griffith, G. W., Easton, G. L., Detheridge, A., Roderick, K., Edwards, A., Worgan, H. J., Nicholson, J., Perkins, W. T. 2007. Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS Microbiology Letters* 276: 165–171.
- [51] Guzman, G. 1998. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation* 7: 369–384.
- [52] Halaburgi, V. M., Sharmab, S., Sinhab, M., Singhb, T. P., Karegoudara, T. B. 2011. Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochemistry* 46: 1146–52.
- [53] Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Díaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E., García-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5): 1090–98.
- [54] Hernández-Luna, C. E., Gutiérrez-Soto, G., Salcedo-Martínez, S. M. 2008. Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico Screening and selection of ligninolytic basidiomycetes with decolorizing ability in Northeast Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 465–473.

- [55] Jarosz-Wilkolkazka, A., Kochmanska-Rdest, J., Malarczyk, E., Wardas, W., Leonowicz, A. 2002. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 566–572.
- [56] Kellner, H., Luis, P., Buscot, F. 2007. Diversity of laccase-like multicopper oxidase genes in *Morchellaceae*: identification of genes potentially involved in extracellular activities related to plant litter decay. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 153–163.
- [57] Kiiskinen, L. L., Rättö, M., Kruus, K. 2004. Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology* 97: 640–646.
- [58] Krastanov, A. I., Gochev, V. K., Girova, T. D. 2007. Nutritive medium dependent biosynthesis of extracellular laccase from *Trichoderma* spp. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 13: 349–355.
- [59] Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., Szakacs, G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology* 38: 310–319.
- [60] Kubicek, C. P., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I. S. 2008. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 9(10): 753–763.
- [61] Kudanga, T., Nyanhongo, G. S., Guebitz, G. M., Burton S 2011. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 48: 195–208.
- [62] Kuhls K, Lieckfeldt E, Bomer T 1995. PCR-fingerprinting used for comparison of *ex type* strains of *Trichoderma* species deposited in different culture collections. *Microbiological Research* 150: 363–371.
- [63] Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G., Kubicek, C. P. 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research* 106(7): 757–767.
- [64] Kumar, V. V., Kirupha, S. D., Periyaraman, P., Sivanesan, S. 2011. Screening and induction of laccase activity in fungal species and its application in dye decolorization. *African Journal of Microbiology Research* 5(11): 1261– 67.
- [65] Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331–371.
- [66] Larrondo, L. F., Salas, L., Melo, F., Vicuña, R., Cullen, D. 2003. A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. *Applied and Environmental Microbiology* 69(10): 6257–63.
- [67] Leonowich, A., Cho, N. S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M. *et al.* 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology* 41(3 – 4): 185–227.

- [68] Levin, L., Papinutti, L., Forchiassin, F. 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology* 94: 169–176.
- [69] Lin, L. C., Lee, M. J., Chen, J. L. 2011. Decomposition of organic matter by the ericoid mycorrhizal endophytes of Formosan rhododendron (*Rhododendron formosanum* Hemsl). *Mycorrhiza*. 21: 331–339.
- [70] Litvintseva, A. P., Henson, J. M. 2002. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. tritici, the take-all fungus. *Applied and Environmental Microbiology* 68(3): 1305–1311.
- [71] Llewellyn, D. A., Marston, T. T., Teutemacher, K. L., Higgins, J. J., Melgarejo, T. 2010. Evaluation of low molecular weight fractions and crude enzyme preparation from a *Trichoderma* cellulase complex as a treatment for fibrous feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 160: 39–48.
- [72] Lu, B., Druzhinina, I. S., Dallah, P., Chaverri, P., Gradinger, C., Kubicek, C. P., Samuels, G. J. 2004. *Hypocrea/Trichoderma* species with pachybasium-like conidiophores: teleomorphs for *T. minutisporum* and *T. poysporum* and their newly discovered relatives. *Mycologia* 96(2): 310–342.
- [73] Lucas, M., Mertens, V., Corbisier, A. M., Vanhulle, S. 2008. Synthetic dyes decolourisation by white-rot fungi: development of original microtitre plate method and screening. *Enzyme and Microbial Technology* 42: 96–106.
- [74] Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A., del Río, J. C. 2005. Biodegradation of lignocellulosic: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8: 195–204.
- [75] McGinnis, M. R., Padhye, A. A., Ajello, L. 1974. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Applied Microbiology* 28(2): 218–222.
- [76] Meevootisom, V., Flegel, T. W., Glinsukon, T., Sobhon, N., Kiatpapan, S. 1984. Screening for and isolation of lignocellulolytic fungi from Thailand for animal feed production. *Journal of The Science Society of Thailand* 10: 147–178.
- [77] Mikolasch, A., Schauer, F. 2009. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 605–624.
- [78] Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A., Nsereko, V. L., Rode, L. M., Iwaasa, A. D., Yang, W. Z., McAllister, T. A., Wang, Y. 2000. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Dairy Science* 83: 1310–1321.

- [79] Morisaki, K., Fushimi, T., Kaneko, S., Kusakabe, I., Kobayashi, H. 2001. Screening for phenoloxidases from edible mushrooms. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 65(10): 2334–36.
- [80] Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., Yaropolov, A. I. 2007. “Blue” Laccases. Review. *Biochemistry (Moscow)* 72(10): 1136–1150.
- [81] Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., Enei, H. 2002. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes* and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 327–335.
- [82] Nyanhongo, G. S., Gomes, J., Gübitz, G. M., Zvauya, R., Read, J., Steiner, W. 2002. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research* 36: 1449–56.
- [83] Okano, K., Kitagawa, M., Sasaki, Y., Watanabe, T. 2005. Conversion of Japanese red cedar (*Cryptomeria japonica*) into feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. *Animal Feed Science and Technology* 120: 235–243.
- [84] Palmieri, G., Giardina, P., Sannia, G. 2005. Laccase-mediated Remazol Brilliant Blue R decolorization in a fixed-bed bioreactor. *Biotechnology Progress* 21(5): 1436–41.
- [85] Pasti-Grigsby, M. B., Paszczynski, A., Goszczynski, S., Crawford, D. L., Crawford, R. L. 1992. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces spp.* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3605–13.
- [86] Patel, H., Gupte, A., Gupte, S. 2009. Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioResources* 4(1): 268–284.
- [87] Peiji, G., Yinbo, Q., Xin, Z., Mingtian, Z., Yongcheng, D. 1997. Screening microbial strain for improving the nutritional value of wheat and corn straws as animal feed. *Enzyme and Microbial Technology*. 20: 581–584.
- [88] Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., Faraco, V. 2011. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics* 12: 104–112.
- [89] Podgornik, H., Stegu, M., Podgornik, A., Perdih, A. 2001. Isolation and characterization of Mn(III) tartrate from *Phanerochaete chrysosporium* culture broth. *FEMS Microbiology Letters* 201: 265–269.
- [90] Podgornik, H., Stegu, M., Zibert, E., Perdih, A. 2001. Laccase production by *Phanerochaete chrysosporium* an artefact caused by Mn(III)? *Letters in Applied Microbiology* 32: 407–411.
- [91] Pointing, S. B., Bucher, V. V. C., Vrijmoed, L. L. P. 2000. Dye decolorization by sub-tropical basidiomycetous fungi and the effect of metals on decolorizing ability. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 199–205.

- [92] Pokorný, R., Vargovič, P., Hölker, U., Janssen, M., Bend, J., Hudecová, D., Varečka, L. 2005. Developmental changes in *Trichoderma viride* enzymes abundant in conidia and the light-induced conidiation signalling pathway. *Journal of Basic Microbiology* 45(3): 219–229.
- [93] Polak, J., Jarosz-Wilkolazka, A. 2012. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. *Process Biochemistry* 47: 1295–07.
- [94] Roberts, D. P., Maul, J. E., McKenna, L. F., Emche, S. E., Meyer, S. L. F., Collins, R. T., Bowers, J. H. 2010. Selection of genetically diverse *Trichoderma* spp. isolates for suppression of *Phytophthora capsici* on bell pepper. *Canadian Journal of Microbiology* 56: 864–873.
- [95] Ru, Z., Di, W. 2012. *Trichoderma* spp. from rhizosphere soil and their antagonism against *Fusarium sambucinum*. *African Journal of Biotechnology* 11(18): 4180–86.
- [96] Rühl, M., Majcherczyk, A., Kües, U. 2013. Lcc1 and Lcc5 are the main laccases secreted in liquid cultures of *Coprinopsis cinerea* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 103: 1029–39.
- [97] Ryan, M. J., Smith, D. 2004. Fungal genetic resource centres and the genomic challenge. *Mycological Research* 108(12): 1351–62.
- [98] Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. 2007 a. Exploitation of *Trichoderma harzianum* mycelial waste for the removal of rhodamine 6G from aqueous solution. *Journal of Environmental Management*. 85(1): 155-161.
- [99] Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. 2007 b. Feasibility of using *Trichoderma harzianum* biomass for the removal of erioglaucine from aqueous solution. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1075–1081.
- [100] Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K., Feng-Huei, Lin. 2008. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry* 43: 736–742.
- [101] Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. 2009. Redox-mediated decolorization of recalcitrant textile dyes by *Trichoderma harzianum* WL1 laccase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 1733–1741.
- [102] Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- [103] Samuels, G. J. 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96(2): 195–206.
- [104] Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27: 185–194.
- [105] Savoie, J. M., Iapicco, R., Largeteau-Mamoun, M. L. 2001. Factors influencing the competitive saprophytic ability of *Trichoderma harzianum* Th2 in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost. *Mycological Research* 105(11): 1348–1356.

- [106] Selvam, K., Priya, M. S., Sivaraj, C., Arungandhi, K. 2012. Identification and screening of wood rot fungi from Western Ghats area of South India. *International Journal of Chemical Engineering Research* 4(1): 379–388.
- [107] Selvam, K., Shanmuga, P.M., Sivaraj, C., Arungandhi, K. 2012. Identification and screening of wood rot fungi from Western Ghats area of South India. *International Journal of ChemTech Research* 4(1): 379–388.
- [108] Simonis, J. L., Raja, H. A. Shearer, C. A. 2008. Extracellular enzymes and soft rot decay: Are ascomycetes important degraders in freshwater? *Fungal Diversity* 31: 135–3146.
- [109] Sivasamy, A., Sundabara, N. 2011. Biosorption of an azo dye by *Aspergillus niger* and *Trichoderma* sp. fungal biomasses. *Current Microbiology*. 62(2):351-357.
- [110] Souza, C. G. M., Zilly, A., Peralta, R. M. 2002. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *The Journal of Basic Microbiology* 42: 83–90.
- [111] Stajčič, M., Vukojevič, J., Duletič-Laušević, S. 2007. Influence of the cultivation conditions on ligninolytic enzyme production in *Pleurotus pulmonarius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: 303–312.
- [112] Tamayo-Ramos, J. A., Barends, S., Verhaert, R. M. D., de Graaff, L. H. 2011. The *Aspergillus niger* multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccase-like encoding genes. *Microbial Cell Factories* 10(1): 78.
- [113] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- [114] Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D., Rojas-Herrera, R., Cortes-Velazquez, A., Rivera-Muñoz, G., Solis-Pereira, S. 2011. New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. *African Journal of Biotechnology* 10(50): 10134–142.
- [115] Theuerl, S., Buscot, F. 2010. Laccases: toward disentangling their diversity and functions in relation to soil organic matter cycling. *Biology and Fertile Soils* 46: 215–225.
- [116] Thygesen, A., Thomsen, A. B., Schmidt, A. S., Jørgensen, H., Ahring, B. K., Olsson, L. 2003. Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidised wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology* 32: 606–615.
- [117] van Gool, M. P., Toth, K., Schols, H. A., Szakacs, G., Gruppen, H. 2012. Performance of hemicellulolytic enzymes in culture supernatants from a wide range of fungi on insoluble wheat straw and corn fiber fractions. *Bioresource Technology* 114: 523–528.

- [118] Vázquez-Garcidueñas, M. S., Morales-Guzmán, I., Vázquez-Marrufo, G. 2012. Molecular genetic identification and extracellular laccase activity of two wild fungal isolates from Mexico. *African Journal of Biotechnology* 11(4): 829–837.
- [119] Vyas BRM, Volc J, Šašek V 1994. Ligninolytic enzymes of selected white rot fungi cultivated on wheat straw. *Folia Microbiologica* 39(3): 235–240.
- [120] White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications. Edited by Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press, San Diego California, USA. pp. 315–322.
- [121] Yamaguchi, M., Kamei, I., Nakamura, M., Takano, M., Sekiya, A. 2007. Selection of *Pleurotus pulmonarius* from domestic basidiomycetous fungi for biodegradation of chlorinated dioxins as environmentally persistent organopollutants. *Bulletin of FFPRI* 6(4-405) 231–237.
- [122] Yang, Q., Yang, M., Pritsch, K., Yediler, A., Hagn, A., Schlöter, M., Kettrup, A. 2003. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. *Biotechnology Letters* 25(9): 709–713.

4.3 CAPÍTULO III

Artículo III

En el presente artículo en preparación se reporta el diseño de iniciadores para la amplificación específica de genes de lacasa extracelular de *Trichoderma* spp., la caracterización estructural de la lacasa extracelular de cepas silvestres de *Trichoderma atroviride*, *T. gamsii*, *T. viridescens*, *T. viride* y *T. koningii*, así como de las cepas de referencia *T. asperellum* (CBS 433.97), *T. atroviride* (IMI 206040) y *T. virens* (Gv29-8), para someter en la revista internacional indizada *Journal of Molecular Modeling*.

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA LACASA EXTRACELULAR EN CEPAS SILVESTRES DE *Trichoderma* spp.

Saila Viridiana Cázares-García^a, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas^b, Gerardo Vázquez-Marrufo^a

^aCentro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

^bDivisión de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. E-mail: gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx

RESUMEN

Mediante el análisis de los genomas de las cepas de referencia de *Trichoderma asperellum* (CBS 433.97), *Tichoderma atroviride* (IMI 206040) y *Trichoderma virens* (Gv29-8) se diseñaron iniciadores para la amplificación específica por PCR de genes de lacasa extracelular *sensu stricto* de especies del género *Trichoderma*, con los cuales se estudiaron 23 aislados silvestres. Con los iniciadores diseñados se obtuvo amplificación en cepas de *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. viridescens*, *T. viride* y *T. koningii*, y con al ADN de especies de otros géneros fúngicos los resultados fueron negativos. El tamaño de los fragmentos de amplificación obtenidos varió entre 1674 kb y 1683 kb, y todos los genes presentaron un intrón central de 59 a 68 pb. Se generaron modelos tridimensionales de las lacasas a partir de las secuencias de aminoácidos deducidas, los cuales fueron validados empleando las estructuras moleculares de lacasas cristalizadas de los ascomicetes *Botrytis aclada*, *Melanocarpus albomyces* y *Thielavia arenaria*. Los porcentajes de identidad de las secuencias de aminoácidos deducidas de las lacasas de *Trichoderma* spp. variaron entre 83.6 y 100%. Las proteínas con las que las lacasas de *Trichoderma* spp. presentaron una mayor identidad fueron las de *Fusarium oxysporum* (62.4 – 63.6%), *Cryphonectria parasitica* (51.5 – 52.0%) y *Aspergillus niger* (51.3 – 54.06%). Las lacasas de *Trichoderma* spp. contienen tres dominios cupredoxina, cada uno de los

cuales posee una topología de barriles- β que es fuertemente soportada por el análisis tridimensional. En las lacasas de *Trichoderma* spp. están presentes los motivos estructurales que distinguen a las lacasas *sensu stricto* de otros miembros de la familia de las Multicobre Oxidasas. El sitio activo mostró un patrón conformacional diferencial en el residuo de aminoácido que ocupa la posición axial del átomo de cobre T1 de las lacasas de *Trichoderma* spp. El análisis filogenético de las proteínas deducidas es congruente con el análisis estructural. Los resultados obtenidos muestran el valor funcional y evolutivo del estudio bioinformático de variantes de lacasa extracelular en cepas silvestres de hongos.

Palabras clave: *Trichoderma*, lacasa extracelular, oligonucleótidos, estructura tridimensional.

INTRODUCCIÓN

Las lacasas (benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) son metaloenzimas que pertenecen a la familia de las Multicobre Oxidasas (MCO) (Dwivedi *et al.* 2011), las cuales están ampliamente distribuidas en la naturaleza encontrándose en plantas (McCaig *et al.* 2005), insectos (Hattori *et al.* 2005), hongos (Junghanns *et al.* 2009), bacterias (Silva *et al.* 2012) y arqueas (Kant y Chander 2009). Las funciones biológicas que llevan a cabo las lacasas dependen de su origen, de las condiciones fisiológicas del organismo, de las características bioquímicas y estructurales que posee la proteína y de su localización celular. En los hongos se ha detectado tanto la actividad intracelular (Lettera *et al.* 2010) como la actividad extracelular (Rodríguez-Rincón *et al.* 2010). Mientras que las lacasas intracelulares están involucradas en la síntesis de pigmentos y en fenómenos de esporulación y morfogénesis, las lacasas extracelulares participan en la depolimerización de la lignina, en la defensa contra agentes patógenos y la detoxificación de compuestos tóxicos para la célula, así como en procesos de parasitismo (Mot y Silaghi-Dumitrescu 2012).

Para realizar su función catalítica las lacasas emplean la capacidad redox de iones de cobre y acoplan la oxidación del sustrato a la reducción del oxígeno molecular a agua. Los iones de cobre que forman el centro catalítico de éstas

enzimas son cuatro y están clasificados como T1 (Tipo 1), T2 (Tipo 1) y T3 (Tipo 1) con base en sus propiedades magnéticas y espectroscópicas (Dwivedi *et al.* 2011). El cobre T1 forma un centro mononuclear (CMN) y es el sitio de oxidación del sustrato, en tanto que un átomo de cobre T2 y dos átomos de cobre T3 (T3 y T3') forman un centro trinuclear (CTN), responsable de la reducción del oxígeno molecular a agua (Quintanar *et al.* 2007). Los estudios de cristalografía y difracción de rayos-X han demostrado que las lacasas de distintos organismos poseen una arquitectura molecular común compuesta por tres dominios cupredoxina (I – III), cada uno de los cuales exhibe una topología de barriles- β (Matera *et al.* 2008). El átomo de cobre T1 está localizado en el dominio III, el CTN T2/T3 se encuentra entre los dominios I y III, y el sitio de unión a sustrato se localiza en la interface entre de los dominios II y III. También están presentes dos canales de solventes que permiten el acceso del oxígeno molecular al CTN y la liberación de las moléculas de agua (Piontek *et al.* 2002). Aunado a lo anterior, se han reportado caracteres estructurales específicos de grupos taxonómicos que proporcionan a las lacasas propiedades catalíticas distintivas (Hakulinen *et al.* 2008, Silva *et al.* 2012).

Hasta el momento, las lacasas fúngicas extracelulares son el grupo más importante con respecto al número de enzimas estudiadas, esto se debe a que son secretadas en altas concentraciones por hongos basidiomicetos y ascomicetos, facilitando así su purificación y caracterización (Zhukova *et al.* 2007, Kallio *et al.* 2011). Los estudios cinéticos y electroquímicos han revelado que las lacasas fúngicas poseen un amplio rango de potenciales redox y baja especificidad por sustrato, por lo que son capaces de romper una gran cantidad de diferentes enlaces, lo que les permite reaccionar con polifenoles y otros compuestos aromáticos, los cuales pueden ser polimerizados o depolimerizados, o incluso actuar como mediadores redox de bajo peso molecular (Mikolasch y Schauer 2009). Debido a esta característica, las lacasas extracelulares de hongos han adquirido importancia industrial y biotecnológica, empleándose en biorremediación, en la remoción de lignina de material lignocelulósico, en la construcción de celdas de biocombustible y biosensores y en la síntesis de pigmentos y compuestos antimicrobianos, entre otros (Mot y Silaghi-Dumitrescu 2012, Mikolasch y Schauer 2009). Dada su amplia

variedad de aplicaciones, el estudio comparativo de los genes, proteínas y estructuras tridimensionales de lacasas provenientes de diferentes especies fúngicas es de gran interés. Este tipo de análisis es de utilidad tanto para incrementar el conocimiento acerca de las relaciones filogenéticas y evolutivas de las lacasas, como para identificar los motivos estructurales involucrados en la catálisis de estas enzimas, información vital para optimizar sus aplicaciones biotecnológicas.

Uno de los géneros fúngicos que resulta particularmente interesante para el estudio de las lacasas extracelulares es *Trichoderma*, ya que algunas de sus especies han tenido un alto impacto biotecnológico en diversos procesos agroindustriales. Distintas cepas de *T. reesei* se han utilizado en la producción de celulasas y hemicelulasas con usos en la industria papelera y textil (Saloheimo y Pakula 2012). Especies como *T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. asperellum*, son usadas como agentes de control biológico debido a su capacidad para secretar compuestos antifúngicos y enzimas hidrolíticas de pared celular de hongos fitopatógenos (Benítez *et al.* 2004). Por otro lado, *T. atroviride* y *T. virens* se han empleado en la producción de antibióticos y aromas con usos en la industria alimenticia (Schuster y Schmoll 2010). Esta multiplicidad de aplicaciones ha contribuido a la exploración constante de las capacidades metabólicas de las especies del género *Trichoderma*, observándose un interés creciente por el estudio de las lacasas extracelulares. Se ha evaluado la habilidad de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. para secretar lacasas bajo diferentes condiciones de cultivo (Krastanov *et al.*, 2007; Gao *et al.* 2013) y se ha reportado la purificación y caracterización de una proteína lacasa en *T. atroviride* (Chakroun *et al.* 2010), *T. harzianum* (Sadhasivam *et al.* 2008) y *T. reesei* (Levasseur *et al.* 2010). En términos funcionales, se ha sugerido la participación de la lacasa extracelular de *T. virens* en micoparasitismo de esclerocios de hongos fitopatógenos (Catalano *et al.* 2011) y el papel de una lacasa asociada a membrana en la maduración de conidias (Pokorný *et al.* 2005). En términos biotecnológicos, se ha explorado la aplicación de las lacasas extracelulares de *Trichoderma* spp. en la decoloración de colorantes textiles recalcitrantes (Sadhasivam *et al.* 2009), en el blanqueo de la pulpa y el tratamiento de efluentes en la industria papelera

(Sadhasivam *et al.* 2010) y en la biorremediación de compuestos fenólicos (Chakroun *et al.* 2010).

Recientemente nuestro grupo de investigación caracterizó el sistema de lacasas *sensu stricto* del género *Trichoderma* empleando herramientas bioinformáticas (Cázares-García *et al.* 2013). Los resultados de dicho trabajo son contradictorios con los reportes en los que se documenta actividad de lacasa extracelular en *T. harzianum* (Sadhasivam *et al.* 2008, Gao *et al.* 2013) y *T. reesei* (Levasseur *et al.* 2010), ya que no se detectó la presencia de genes de lacasa extracelular en los genomas de referencia de éstas especies. En el Capítulo II del presente trabajo de tesis se han enunciado algunas posibles razones para explicar dicha contradicción. La medición de la actividad enzimática extracelular con la identificación simultánea de genes sería una estrategia muy útil para distinguir cepas del género *Trichoderma* que realmente secretan lacasas *sensu stricto* de aquellas que secretan otros miembros de la familia de MCOs, como las ferroxidasas-lacasas. En ese sentido, el análisis de los genomas disponibles de cepas de referencia de *Trichoderma* spp. es una herramienta útil para generar información genético molecular de cepas silvestres con potencial biotecnológico. Además, contar con las secuencias de genes de lacasa de cepas silvestres permite emplear el análisis bioinformático como herramienta para diseñar estrategias de estudio experimental para una selección eficiente de cepas y proteínas con características deseadas, y aplicar modelos de ingeniería de proteínas. Una ventaja adicional es la posibilidad de realizar inferencias sobre el posible papel fisiológico y ecológico de las lacasas dentro del género *Trichoderma*. En el presente trabajo se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación y secuenciación de los genes que codifican para la actividad de lacasa extracelular de aislados silvestres de *Trichoderma*, con base en las secuencias de los genes de lacasa de cepas de referencia (Cázares-García *et al.* 2013). Se reporta también el análisis estructural y filogenético de las proteínas deducidas a partir de los genes de lacasa de los aislados silvestres de *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. viridescens*, *T. viride* y *T. koningii*. Los datos obtenidos se comparan con las estructuras moleculares de las lacasas de *T. asperellum* (CBS 433.97), *T.*

atroviride (IMI 206040) y *T. virens* (Gv29-8) y de lacasas cristalizadas de hongos ascomicetos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de estudio y condiciones de cultivo

Se analizaron 23 aislados silvestres del género *Trichoderma* que pertenecen a las especies de *H. lixii*/ *T. harzianum*, *H. atroviridis*/ *T. atroviride*, *H. viridescens*/ *T. viridescens*, *H. rufa*/ *T. viride*, *H. koningii*/ *T. koningii*, *T. tomentosum* y *T. gamsii*. Los hongos fueron aislados de distintos ecosistemas del Estado de Michoacán y forman parte del Cepario Michoacano Universitario (CMU), perteneciente al Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Michoacán, México). Cada uno de los aislados posee una clave que lo identifica dentro del cepario (Tabla 1). Para el cultivo y mantenimiento del micelio vegetativo de las cepas de estudio se utilizó medio mínimo Vogel (MM). La solución stock (50X) de MM está compuesta por (g/L): $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 150; KH_2PO_4 , 250; NH_4NO_3 , 100; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5; biotina (5 mg/100 mL etanol al 50%), 5 mL; solución de oligoelementos, 5 mL. La solución de oligoelementos contiene (g/0.1 L): ácido cítrico $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.072; H_3BO_3 , 0.05; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05. Para la siembra de las cepas, el stock se diluyó en agua destilada para obtener una concentración de uso y se adicionó 1.5% de glucosa y Agar bacteriológico (15 g/L). El medio se esterilizó a 121 °C (15 lb/in²) por 15 minutos. Las cepas se inocularon en el centro de la placa de Petri con un inóculo de 6 mm proveniente de un cultivo en crecimiento exponencial y se incubaron a 28 °C. Para la extracción del material genético, el MM se recubrió con una membrana de celofán previamente lavada y esterilizada. Las cepas se inocularon sobre la membrana y los cultivos se incubaron en oscuridad a 28 °C.

Tabla 1. Identidad y genes de lacasa de los aislados silvestres de *Trichoderma* spp.

CLAVE CMU	ESPECIE	NOMBRE DEL GEN DE LACASA
CMU-1	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-14	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-16	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-18	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-19	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-23	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-25	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-34	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-43	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-44	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-51	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-90	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-181	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-183	<i>T. harzianum</i>	---
CMU-221	<i>T. tomentosum</i>	---
CMU-222	<i>T. tomentosum</i>	---
CMU-8	<i>H. atroviridis/ T. atroviride</i>	<i>Talac1</i>
CMU-21	<i>T. gamsii</i>	<i>Tglac1</i>
CMU-66	<i>H. viridescens/ T. viridescens</i>	<i>Tvlac1</i>
CMU-231	<i>H. viridescens/ T. viridescens</i>	<i>Tvlac1A</i>
CMU-236	<i>H. viridescens/ T. viridescens</i>	<i>Tvlac1B</i>
CMU-218	<i>H. rufa/ T. viride</i>	<i>Tvilac1</i>
CMU-234	<i>H. koningii/ T. koningii</i>	<i>Tklac1</i>

--- No se obtuvo producto de amplificación.

Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo de cultivos con 5 días de incubación. Se recuperó el micelio y se congeló en N₂ líquido, se maceró y se adicionó buffer de lisis (SDS 0.5%, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, Tris-HCl 200mM, pH 8.5). Se agregó un volumen de fenol/cloroformo/isoamílico, se dio vortex y se centrifugó para extraer la fase orgánica. Después del tratamiento con RNAsa, se extrajo nuevamente con fenol/cloroformo/isoamílico y el ADN se precipitó con isopropanol. La pastilla se lavó con etanol (70%) y se resuspendió en 30 µL de H₂O destilada desionizada estéril (Kurtzman y Robnet, 1998). La integridad del ADN se corroboró en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (BrEt) a una concentración final de 0.5 µg/mL (Sambrook y Russell 2001).

Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de genes de lacasa *sensu stricto* en especies del género *Trichoderma*

De la base de datos de los genomas de *T. asperellum* CBS 433.97 (<http://genome.jgi-psf.org/Trias1/Trias1.home.html>), *T. atroviride* IMI 206040 (<http://genome.jgi-psf.org/Triat2/Triat2.home.html>) y *T. virens* Gv29-8 (http://genome.jgi-psf.org/TriviGv29_8_2/TriviGv29_8_2.home.html), se obtuvieron las secuencias de los genes que codifican para lacasas *sensu stricto* extracelulares (Cázares-García *et al.* 2013). Los números de acceso de cada gen en el JGI GenBank son 154312, 54145 y 48916 para *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. virens*, respectivamente. Con las secuencias obtenidas se realizó un alineamiento múltiple en Clustal X V2.0.11 (<http://www.clustal.org/clustal2/>) utilizando los parámetros predeterminados. A partir del alineamiento se seleccionaron diversas regiones semiconservadas para el diseño de oligonucleótidos específicos del género *Trichoderma*. La idoneidad de las regiones se evaluó utilizando el programa en línea OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>). Con base en éste análisis se obtuvieron los oligonucleótidos degenerados LacT-F (5'-GATKTGGCYKCCTCTBYTTG) y LacT-R (5'-AYKCCTGAATCRTCCTCRTR), con los cuales se amplifica una región de aproximadamente 1750 pb (Fig. 1). Las bases ambiguas están definidas como sigue: K = G/T; Y = C/T; R = A/G. Los oligonucleótidos se sintetizaron por Invitrogen Life Technologies (USA).

Condiciones de PCR y amplificación

El ADN genómico de los 23 aislados silvestres de *Trichoderma* spp., se utilizó como templado para la amplificación de los genes de lacasa *sensu stricto* extracelulares. Como control positivo de amplificación se utilizó el ADN de *T. atroviride* IMI 206040, *T. asperellum* CBS 433.97 y *T. virens* Gv29-8, con las cuales se optimizaron tanto las concentraciones de reactivos como el programa de amplificación. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 25 μ L. Para todas las muestras la concentración de la mezcla de reacción fue la misma: 10 mM de buffer Tris-HCl pH 8.0; 1.5 mM de $MgCl_2$; 0.2 mM de cada dNTP; 1

μ M de cada oligonucleótido; 0.05 U de *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen, USA); 1–2 ng/ μ L de ADN; el volumen final se ajustó con H₂O destilada desionizada estéril a 25 μ L. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Palm-Cycler™ Gradient thermal cycling (R Corbett Life Science, USA) mediante el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, alineamiento a 64 °C por 15 segundos y extensión a 72 °C por 1.30 minutos, con una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de amplificación obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 2 % teñidos con BrEt a una concentración final de 0.5 μ g/mL (Sambrook y Russell 2001). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en sentido directo y reverso. Para cada gen se secuenciaron tres productos de amplificación independientes en MacroGen Inc. (USA) y Elim Biopharma (USA).

Especificidad de los oligonucleótidos diseñados

Para confirmar la especificidad de los primers LacT-F y LacT-R se realizaron ensayos de PCR utilizando como templado ADN de distintas especies de hongos no pertenecientes al género *Trichoderma*. Los hongos evaluados fueron los ascomicetos *Neurospora crassa*, *Paraconiothyrium brasiliensis*, *Fusarium oxysporum*, *Pestalotiopsis maculiformans*, *Penicillium janthinellum* y *Sclerotium rolfsii*, el zigomyceto *Mucor circinelloides*, y los basidiomicetos *Rhizoctonia solani*, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes villosa* y *Amanita* sp. La obtención del ADN de éstas especies y las condiciones de amplificación fueron las mismas a las descritas anteriormente. Como control positivo de amplificación se empleó la región interespaciadora (ITS) de la Unidad Ribosomal Nuclear, utilizando el par de oligonucleótidos ITS-1 (5'–TCCGTAGGTGAACCTGCGG–3') e ITS-4 (5'–TCCTCCGCTTATTGATATGC–3') (White *et al.* 1990).

Análisis de las secuencias de nucleótidos

Las secuencias obtenidas de la amplificación fueron sometidas a un análisis BLASTn en la base de datos de NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),

determinándose el porcentaje de identidad con respecto a los genes de lacasa depositados en ésta. La identificación de los intrones y exones de cada una de las secuencias de los aislados silvestres de *Trichoderma* spp., se realizó por comparación estructural con los genes y CDSs putativos de las lacasa *sensu stricto* extracelulares de *T. asperellum* (Tas_154312), *T. atroviride* (Ta_54145) y *T. virens* (Tv_48916), a partir de alineamientos múltiples construidos con Clustal X V2.0.11.

Caracterización de las secuencias de aminoácidos deducidos

Se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos de los genes de lacasa extracelulares de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. mediante el programa en línea ExPASy (Expert Protein Analysis System) Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>), considerando tres marcos de lectura. Las secuencias de aminoácidos que no presentaron puntos intermedios de terminación fueron analizadas en InterProScan V4.8 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) para la identificación de los dominios distintivos de la familia de las MCOs. Se construyeron alineamientos múltiples en Clustal X V2.0.11 para la identificación de los motivos característicos de las lacasas *sensu stricto* descritos por Eggert *et al.* (1998), Hakulinen *et al.* (2002), Kumar *et al.* (2003) y Kallio *et al.* (2011). El sitio de corte del péptido señal de secreción se determinó mediante el alineamiento múltiple con las lacasas putativas extracelulares de *T. asperellum* CBS 433.97 (Tas_154312), *T. atroviride* IMI 206040 (Ta_54145) y *T. virens* Gv29-8 (Tv_48916). Los pesos moleculares y los puntos isoeléctricos (pI) se calcularon en ExPASy Compute pI/Mw Tool (http://web.expasy.org/compute_pi/). Los sitios putativos de *N*-glicosilación (Asn-Xxx-Ser/Thr) se establecieron con el servidor NetNGlyc V1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Predicción de las estructuras tridimensionales

La predicción de la estructura tridimensional (3D) de las lacasas extracelulares de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. y de las cepas de referencia *T. asperellum* CBS 433.97, *T. atroviride* IMI 206040 y *T. virens* Gv29-8, se llevó a cabo utilizando los programas en línea CPHmodels-3.2 Server – CBS (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>), PHYRE2 Protein Fold Recognition

Server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) y ESyPred3D Web Server 1.0 (<http://www.unamur.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>). La identificación del templado se realizó en Template Identification (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_targetidentification1) de SWISS-MODEL. La calidad estereoquímica de los modelos 3D obtenidos se evaluó en QMEAN (<http://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi>) y en PROCHECK de PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>). El visor DeepView Swiss-Pdb Viewer V4.1 (<http://spdbv.vital-it.ch/>) se empleó para la evaluación de la conformación de los aminoácidos en los modelos 3D, la determinación de las distancias interatómicas y de los potenciales electrostáticos de superficie, así como para la creación de las imágenes presentadas en éste trabajo. El sitio de unión a sustrato se estableció mediante por comparación estructural con la lacasa cristalizadas de *Thielavia arenaria* (Kallio *et al.* 2011) y *Melanocarpus albomyces* (Hakulinen *et al.* 2008) y a través de un análisis de cavidades realizado en CASp (<http://sts.bioengr.uic.edu/castp/calculation.php>). La hidrofobicidad del sitio de unión a sustrato se determinó en HydroMCalc (<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html>).

Análisis filogenético

Para el análisis filogenético de las secuencias putativas de lacasa de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. se realizó alineamiento múltiple con Clustal X V2.0.11 utilizando los parámetros predeterminados. Las secuencias utilizadas para el análisis filogenético con su respectivo número de acceso a GenBank y JGI genome portal se presentan a continuación (entre paréntesis aparece la clave utilizada en este artículo para cada especie). Ascomycetes: *Ajellomyces dermatitidis* (Ade) 327349048; *Arthroderma gypseum* (Agy) 315039999; *Aspergillus niger* (Ani) fge1_e_gw1_12.409, e_gw1_4.1637, gw1_10.607; *Botriotynia fuckeliana* (Bfu) 15022487, 15022489; *Botrytis aclada* (Bac) 378942783; *Chaetomium globosum* (Cgl) CHGG03552.1, CHGG02290.1, CHGG10025.1, 06172.1; *Colletotrichum lagenarium* (Cla) 12862766; *Cryphonectria parasitica* (Cpa) 167469, 69047730; *Fusarium oxysporum* (Fox)

152013644; *Hortaea acidophila* (Hac) 63146072, 67773582; *Magnaporthe oryzae* (Mor) 389627974; *Melanocarpus albomyces* (Mal) 40788173; *Monilinia fructigena* (Mfr) 120431232; *Myceliophthora thermophila* (Mth) 367028915; *Myrioconium* sp. (Msp) 160332827; *Neurospora crassa* (Ncr) NCU9279.5, NCU05604.5, NCU05113, NCU04528, NCU02201.5, NCU07920.5, NCU09023.5, NCU00526.5; *Phoma* sp. (Psp) 166812033; *Podospora anserina* (Pan) Pa_7_4200, Pa_5_4660, Pa_5_1200, Pa_5_9860, Pa_6_7880, Pa_7_3560, Pa_1_15470; Pa_1729781, Pa_5_4140; *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* (Ggg) 19309738, 19309740; *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) 19171197, 19171195, 19171193; *Pyrenophora tritici-repentis* (Ptr) 189192570; *Sclerotinia minor* (Smi) 120431228; *Sordaria macrospora* (Sma) SMAC09326, SMAC06098, SMAC03641, SMAC03042, SMAC09228, SMAC09572, SMAC01222; *Sporotrichum thermophile* (Sth) 99853; *Thielavia arenaria* (Tar) 333361328; *Thielavia terrestris* (Tte) 2011187; *Trichoderma asperellum* (Tas) 154312, 71665, 68620; *Trichoderma atroviride* (Ta) 54145, 40409; *Trichoderma harzianum* (Th) 539081; *Trichoderma reesei* (Tr) 122948; *Trichoderma virens* (Tv) 48916, 194054; *Yarrowia lipolytica* (Yli) 340748006. Basidiomycetes: *Agaricus bisporus* (Abi) 2833227, 2833228; *Coprinopsis cinerea* (Cci) 42721544, 4838342, 4838344, 4838346; *Coriopsis gallica* (Cga) 12484399; *Coriolus hirsutus* (Chi) 167465; *Gelatoporia subvermispora* (Gsu) 31088842; *Lentinula edodes* (Led) 18146854, 18146856, 6466812; *Marasmius quercophilus* (Mqu) 6318611; *Pleurotus ostreatus* (Pos) 15594026, 2833235, 2833237, 3006039; *Polyporus ciliatus* (Pci) 9957143, 9957145, 9957147; *Pycnoporus cinnabarinus* (Pcn) 10179427, 3128389, 5732664; *Trametes pubescens* (Tpu) 20270770; *Trametes* sp. (Tsp) 21616730, 56785436; *Trametes trogii* (Ttr) 119416759; *Trametes versicolor* (Tve) 15778442, 2388517, 2598857; *Trametes villosa* (Tvi) 2842752, 2842753; *Volvarella volvacea* (Vvo) 42416980. Plantae: *Arabidopsis thaliana* (Ath) 332191557; *Rhus vernicifera* (Rve) 19912797. Los alineamientos obtenidos se ajustaron manualmente. A partir de los alineamientos generados se construyeron árboles filogenéticos con MEGA V5.2.2 (<http://megasoftware.net/>) por el método de Neighbour-Joining usando tres diferentes modelos de distancia evolutiva (p-distances, Dayhoff y Jones-Taylor-Tornton). La significancia estadística se evaluó con un bootstrap de 1000 réplicas. Los

alineamientos fueron editados diferencialmente para corroborar la topología de los árboles obtenidos.

RESULTADOS

Diseño de los iniciadores para la amplificación de los genes de lacasa *sensu stricto* de *Trichoderma* spp.

El alineamiento múltiple de los genes de lacasa extracelular *sensu stricto* de *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. virens* permitió encontrar una región altamente conservada entre los nucleótidos 3 a 22 y entre los nucleótidos 1744 a 1764, en las zonas que flanquean los segmentos L1 y L4 (Fig. 1). Estas regiones se seleccionaron con la finalidad de obtener oligonucleótidos específicos de *Trichoderma*, ya que están altamente conservadas en los genes de lacasa dentro del género, pero varían considerablemente con los genes de lacasa reportados para otras especies de ascomicetos y basidiomicetos. Aunque se encontraron otras regiones con altos valores de homología además de los segmentos L1 a L4, una de las razones al seleccionar ésta región para el diseño de los iniciadores es que permite amplificar prácticamente todo el gen, lo cual es útil tanto para el análisis filogenético como para el estudio bioinformático de las proteínas putativas. Las posiciones variables dentro de las regiones conservadas incluyeron 5 y 6 cambios de nucleótidos, por lo que los iniciadores diseñados fueron degenerados, abarcando un 25 y 28.5% de posiciones ambiguas. El contenido de G+C fue de 50% y el análisis en Oligo Calc no mostró complementariedad ni tendencia a formar *hairpins*. La *Tm* calculada fue de 54.3 a 64.6.

evaluados fuera del género *Trichoderma* se obtuvo amplificación bajo las condiciones de PCR descritas anteriormente (Fig. suplementaria S1).

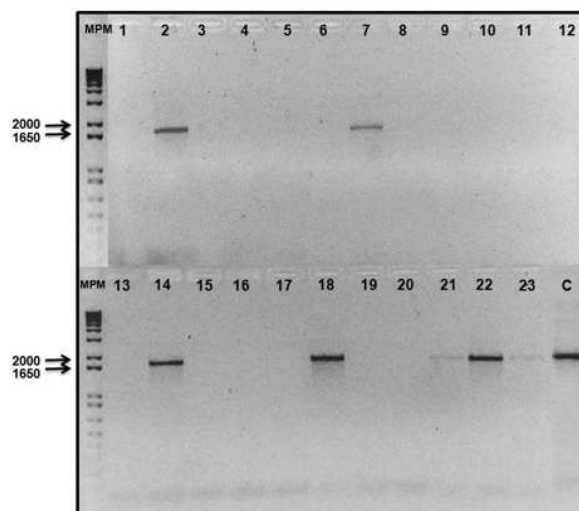


Figura 2. Electroforesis en geles de agarosa de la amplificación por PCR de los genes de lacasa *sensu stricto* de *Trichoderma* spp., utilizando los oligonucleótidos LacT-F/LacT-R. Carriles: MPM, marcador de peso molecular; 1, CMU-1; 2, CMU-8; 3, CMU-14; 4, CMU-16; 5, CMU-18; 6, CMU-19; 7, CMU-21; 8, CMU-23; 9, CMU-25; 10, CMU-34; 11, CMU-43; 12, CMU-44; 13, CMU-51; 14, CMU-66; 15, CMU-90; 16, CMU-181; 17, CMU-183; 18, CMU-218; 19, CMU-221; 20, CMU-222; 21, CMU-231; 22, CMU-234; 23, CMU-236; C (control), *T. atroviride* IMI 206040

Análisis de la secuencia de nucleótidos de los genes de lacasa extracelular en *Trichoderma* spp.

Los fragmentos de amplificación obtenidos poseen una longitud de entre 1674 y 1683 pb (Fig. 3), que corresponde al 95% de la secuencia completa de los genes de lacasa *sensu stricto* extracelulares de las especies del género *Trichoderma* (considerando el codón de inicio, intrones, exones y el codón de terminación) (Cázares-García *et al.* 2013). El porcentaje de identidad de estas secuencias con respecto a los genes de *T. asperellum* (Tas_154312), *T. atroviride* (Ta_54145) y *T. virens* (Tv_48916) se encuentra entre 79% (Tv_48916/CMU-231) y 100% (Ta_54145/CMU-8) (Tabla suplementaria T1). El contenido de GC es de 51% en los fragmentos de los genes de lacasa de las cepas de *T. gamsii* (CMU-21) y *H. koningii* *T. koningii* (CMU-234) y de 52% en los fragmentos de las cepas de *H. atroviridis*/ *T. atroviride* (CMU-8), *H. viridescens*/ *T. viridescens* (CMU-66, CMU-231 y CMU-236) e

H. rufal / *T. viride* (CMU-218). El análisis estructural evidenció la presencia de un intrón y dos exones en cada uno de los genes de lacasa de las cepas silvestres (Fig. 3). La longitud de los intrones osciló entre 59 y 68 pb (Fig. 3) y preservan los sitios de splicing que cumplen con la regla GT/AG (Shapiro y Senepathy, 1987). Entre los genes de lacasa de las cepas de *H. viridescens* / *T. viridescens* (CMU-66, CMU-231 y CMU-236), se presentan cambios en la secuencia de nucleótidos, lo que ocasiona que la identidad varíe entre 98.5% (CMU-66/CMU-231) y 99.0% (CMU-231/CMU-236) (Tabla suplementaria T1). Los fragmentos de los genes de lacasa de los aislados silvestres de *Trichoderma* spp., recibieron un nombre en base a su origen, función y al número de genes descritos (Tabla 1).

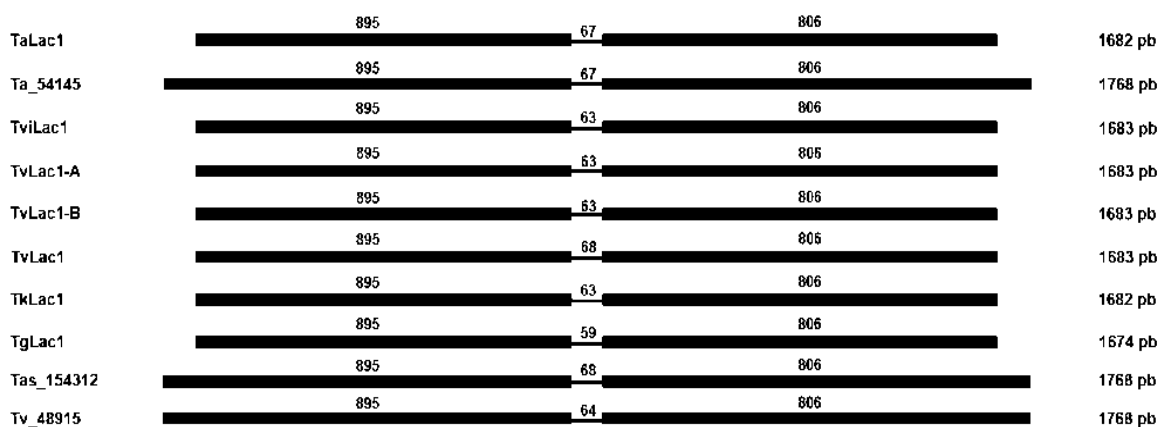


Figura 3. Posición de intrones y exones en los genes de lacasa *sensu stricto* extracelulares de especies del género *Trichoderma*. Las líneas delgadas indican la posición de los intrones y las líneas gruesas la posición de los exones. El número sobre cada línea indica la longitud en pb de los intrones y exones.

El análisis Blastn de las secuencias obtenidas mostró identidad con secuencias de genes de lacasa de diversas especies de ascomicetos. La identidad global más alta se obtuvo con el gen de lacasa de *T. terrestris*, siendo mayor al 60%. Una identidad de entre 55.3% y 59.7% se presentó con los genes de lacasa de los hongos *G. zeae*, *M. oryzae*, *P. terrestris*, *Verticillium albo-atum*, *Nectria haematococca* (teleomorfo= *F. solani*) y *Sclerotinia sclerotiorum*. (Tabla suplementaria T2). El porcentaje de identidad calculado en Clustal X entre los genes de lacasas de *Trichoderma* spp. y los genes de hongos ascomicetos incluidos en el análisis filogenético se encontró

entre 32.6 (*Tvlac1B/Sma_09572*) y 61.6 (*Talac1/Fox_152013643*). La mayor identidad se presentó con el gen *lcc4* de *F. oxysporum* (60.4 – 61.6 %), seguido por los genes *lac2* de las especies de *G. graminis* var. *graminis* y var. *tritici* (57.6 – 59.7%), los genes *mcoD* y *mcoF* de *A. niger* (53.4 – 55.8%) y el gen *lac3* de *C. parasitica* (53.7 – 55.5%) (Tabla suplementaria T2). La identidad con respecto a los genes de hongos basidiomicetos osciló entre 33.2 (*Talac1/Led_6466811*) y 38.9 (*Talac1/Cve_2388516*).

Caracterización de las secuencias de aminoácidos deducidas de lacasa en *Trichoderma* spp.

Las secuencias polipeptídicas de las lacasas de *T. atroviride* (*talac1*, CMU-8), *T. gamsii* (*tglac1*, CMU-21), *T. viridescens* (*tvlac1*, CMU-66; *tvlac1A*, CMU-231; *tvlac1B*, CMU-236), *T. viride* (*tvilac1*, CMU-218) y *T. koningii* (*tklac1*, CMU-234) presentaron 537 residuos de aminoácidos. Debido a que no se obtuvo la secuencia completa de los genes de lacasa en las cepas silvestres, las secuencias de aminoácidos obtenidas carecen de los primeros 14 residuos de aminoácidos en el extremo *N*-terminal y de los últimos 15 residuos en el extremo *C*-terminal (Fig. 4). El análisis realizado en InterProScan confirmó la presencia de los dominios cupredoxina distintivos de los miembros de la familia de las MCOs (IPR001117, IPR008972, IPR011706, IPIR011707). Se encontraron variaciones en los segmentos L1 – L4, especialmente en L2 en el fragmento YCDGL, en donde Tyr es reemplazada por Ala, Cys por Trp, Asp por Glu y Leu por Val (Fig. 4). El resto de los segmentos presentaron entre 1 y 3 cambios de aminoácidos, los cuales involucran residuos con propensión a una conformación tridimensional similar.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

 TaLac1 -----AVYAFPSLDKTAAPNLYPRSSCSGNTATTNEWCDFDISTDYYTEAPDTCVTREYWLELTDGTVAPDGFSSRYAQALNGSIFGPPTLI
 Ta_54145 MMWPPLLVASLFSGAVYAFPSLDKTAAPNLYPRSSCSGNTATTNEWCDFDISTDYYTEAPDTCVTREYWLELTDGTVAPDGFSSRYAQALNGSIFGPPTLI
 TviLac1 -----AVYAFPSLDRTAAPDLYPRSSCSGNTATTNEWCDFDISTDYYTEAPDTCVTREYWLELTDGTVAPDGFSSRYAQALNGSIFGPPTLI
 TvLac1A -----AVYAFPSLDRAAAPDLHPRSSCSGNTATTNEWCDFDISTDYYTEAPDTCVTREYWLELTDGTVAPDGFSSRYAQALNGSIFGPPTLI
 TvLac1B -----AVYAFPSLDRAAAPDLHPRSSCSGNTATTNEWCDFDISTDYYTEAPDTCVTREYWLELTDGTVAPDGFSSRYAQALNGSIFGPPTLI
 TvLac1 -----AVYAFPSLDRAAAPDLYPRSSCSGNTATTNEWCDFDISTDYYTEAPDTCVTREYWLELTDGTVAPDGFSSRYAQALNGSIFGPPTLI
 TkLac1 -----AVYAFPSLDRTAAPDLYPRSSCSGNTATTNEWCDFDISTDYYTEAPDTCVTREYWLELTDGTVAPDGFSSRYAQALNGSIFGPPTLI
 TgLac1 -----AVYAFPSLDRAAAPDLYPRSSCSGNTATTNEWCDFDISTDYYTEAPDTCVTREYWLELTDGTVAPDGFSSRYAQALNGSIFGPPTLI
 Tas_154312 MMWPPFLVASL IAGTVLAFPSFDRAVAPYLHPRSSCSGNTATTNEWCDFDISTDYYTEAPDTCVTREYWLELTDGTVAPDGFSSRYAQALNGSIFGPPTLI
 Tv_48916 MIWLPLLASLIFREVCAPISFDGTVIPVLHRSRSCSGNTATTNEWCDYDIDISTDYNEVPDTCVTREYWLELTDGTVAPDGFSSRYAQALNGSIFGPPTLI

S₁ S₂ S₃ S₄ S₅
 (1)
 TaLac1 ADWCDTVVVHVNNALSTSTNGTSLFEGIRQNYTNQNDGVVSIQCTPTPPGSSITYTWKATQYGTWYSHFGLQAWEGVFGGILLINGPATANYDEDLGV
 Ta_54145 ADWCDTVVVHVNNALSTSTNGTSLFEGIRQNYTNQNDGVVSIQCTPTPPGSSITYTWKATQYGTWYSHFGLQAWEGVFGGILLINGPATANYDEDLGV
 TviLac1 ADWCDTVVVHVSNALSSSTNGTSLFEGIRQNYTNQNDGVVSIQCTPTPPGSSITYTWKATQYGTWYSHFGLQAWEGVFGGILLINGPATANYDDDLGV
 TvLac1A ADWCDTVVVHVSNALSTSTNGTSLFEGIRQNYTNQNDGVVSIQCTPTPPGSSITYTWKATQYGTWYSHFGLQAWEGVFGGILLINGPATANYDEDLGV
 TvLac1B ADWCDTVVVHVSNALSTSTNGTSLFEGIRQNYTNQNDGVVSIQCTPTPPGSSITYTWKATQYGTWYSHFGLQAWEGVFGGILLINGPATANYDEDLGV
 TvLac1 ADWCDTVVVHVSNALSTSTNGTSLFEGIRQNYTNQNDGVVSIQCTPTPPGSSITYTWKATQYGTWYSHFGLQAWEGVFGGILLINGPATANYDEDLGV
 TkLac1 ADWCDTVVVHVSNALSTSTNGTSLFEGIRQNYTNQNDGVVSIQCTPTPPGSSITYTWKATQYGTWYSHFGLQAWEGVFGGILLINGPATANYDEDLGV
 TgLac1 ADWCDTVVVHVSNALSTSTNGTSLFEGIRQNYTNQNDGVVSIQCTPTPPGSSITYTWKATQYGTWYSHFGLQAWEGVFGGILLINGPATANYDEDLGV
 Tas_154312 ADWCDTVVVHVSNALSTSSNGTSLFEGIRQNYTNQNDGVVSIQCTPTPPGSSITYTWKATQYGTWYSHFGLQAWEGVFGGILLINGPATANYDEDLGV
 Tv_48916 ADWCDTVVVHVNTLSTSSNGTSLFEGIRQNYTNQNDGVVSIQCTPTPPGSSITYTWKATQYGTWYSHFGLQAWEGVFGGILLINGPSSANYDEDLGV

S₆ S₇ H₁ S₈ S₉ L₂ H₂ S₁₀ S₁₁
 L₁
 TaLac1 LFLNDWSHQTADELYASAE TNGPPTLTGLINGTNVFD DAGHRETSFTEGKTYRLRLVNGAIDTHFKFSIDNHTMQVSISSLVPIIPYTSVLDIAIGQ
 Ta_54145 LFLNDWSHQTADELYASAE TNGPPTLTGLINGTNVFD DAGHRETSFTEGKTYRLRLVNGAIDTHFKFSIDNHTMQVSISSLVPIIPYTSVLDIAIGQ
 TviLac1 LFLNDWSHQTADELYASAE TNGPPTLTGLINGTNVFD DAGHRETSFTEGKSYRLRLVNGAIDTHFKFSIDNHTMQVIANDLVPIITPYTSVLSIATIGQ
 TvLac1A LFLNDWSHQTVDELYESAE TNGPPTMTGLINGTNVFD DAGHRETSFTEGKSYRLRLVNGAIDTHFKFSIDNHTMQVSISSLVPIIPYTSVLDIAIGQ
 TvLac1B LFLNDWSHQTVDELYESAE TNGPPTMTGLINGTNVFD DAGHRETSFTEGKSYRLRLVNGAIDTHFKFSIDNHTMQVSISSLVPIIPYTSVLDIAIGQ
 TvLac1 LFLNDWSHQTVDELYESAE TNGPPTMTGLINGTNVFD DAGHRETSFTEGKSYRLRLVNGAIDTHFKFSIDNHTMQVSISSLVPIIPYTSVLDIAIGQ
 TkLac1 LFLNDWSHQTVDELYESAE TNGPPTMTGLINGTNVFD DAGHRETSFTEGKTYRLRLVNGAIDTHFKFSIDNHTMQVSISSLVPIITPYTSVLSIATIGQ
 TgLac1 LFLNDWSHQTADELYQSAE TNGPPTLTGLINGTNVFD DAGHRETSFTEGKTYRLRLVNGAIDTHFKFSIDNHTMQVSISSLVPIITPYTSVLDIAIGQ
 Tas_154312 LFLNDWSHQTADELYQSAE TSGPPTLTGLINGTNVFD DAGHRETSFTEGKTYRLRLVNGAIDSHFKFSIDNHTMQVIANDLVPIITPYTSVLSIATIGQ
 Tv_48916 MFLNDWSHQTVDELYESAE TSGPPTLTGLINGTNVYD TTGHRRETSFTEGKTYRLRLVNAIDSHFKFSIDNHTMQVIANDLVPIITPYTSVLSIATIGQ

H₃ S₁₂ S₁₃ S₁₄ S₁₅ S₁₆ S₁₇ S₁₈
 (2) (2)
 TaLac1 RYDVIITAQSSVADNFWMRAIPQSA CSSNNLDDIRGIVYVYSSAGTPTTTGYSYTDNCVDE DASNLPVYVSKTVS SQTITVGEAVTVSKNSNLFKWF
 Ta_54145 RYDVIITAQSSVADNFWMRAIPQSA CSSNNLDDIRGIVYVYSSAGTPTTTGYSYTDNCVDE DASNLPVYVSKTVS SQTITVGEAVTVSKNSNLFKWF
 TviLac1 RYDVIITAQSSVADNFWMPRAIPQSA CSSNDLDDIRGIVYVYSSAATPTTAYSYTDCDE DASNLPVFLSKTVS SQTITVGEAVTIGKNSNLFKWF
 TvLac1A RYDVIITAQSSVADNFWMRAIPQSA CSSNNLDDIRGIVYVYSSAGTPTTTGYSYTDSCADE DASNLPVYVSKTVS SETTNVGEVVTIGKNSNLFKWF
 TvLac1B RYDVIITAQSSVADNFWMRAIPQSA CSSNDLDDIRGIVYVYSSAGTPTTTGYSYTDSCADE DASNLPVYVSKTVS SETTNVGEVVTIGKNSNLFKWF
 TvLac1 RYDVIITAQSSVADNFWMRAIPQSA CSSNNLDDIRGIVYVYSSAGTPTTTGYSYTDSCADE DASNLPVYVSKTVS SETTNVGEVVTIGKNSNLFKWF
 TkLac1 RYDVIITAQSSVADNFWMRAIPQSA CSSNDLDDIRGIVYVYSSAGTPTTTGYSYTDSCADE DASNLPVYVSKTVS SQTITVGEAVTIGKNSNLFKWF
 TgLac1 RYDVIITAQSSVADNFWMRAIPQSA CSSNDLDDIRGIVYVYSSAGTPTTTGYSYTDSCDE DASNLPVYVSKTVS SQTITVGEVVTIGKNSNLFKWF
 Tas_154312 RYDVIITAQSSVADNFWMRAIPQSA CSSNNSDDIRGIVYVYSSAGTPTTTGYSYTDSCDE DASNLPVYVSKTVS SQTITVGEAVTIGKNSNLFKWF
 Tv_48916 RYDVIITAQSSVADNFWMRAIPQSA CSSNDLDDIRGIVYVYSSAGTPTTTGYSYTDSCADE DASNLPVYVSKTVS SQTITVGEAVTIGKNSNLFKWF

S₁₉ S₂₀ H₄ S₂₁ H₅ S₂₂ S₂₃ S₂₄
 L₃
 TaLac1 LNSTTMVVDWEDPTLLOVYNGATTFTSNNAVISLPNANEWYVYVISTAI SVPEPVHLHGFDFFVYLAQGTGYSDSVTLTNDNPPRRDVAML PASGYLVLA
 Ta_54145 LNSTTMVVDWEDPTLLOVYNGATTFTSNNAVISLPNANEWYVYVISTAI SVPEPVHLHGFDFFVYLAQGTGYSDSVTLTNDNPPRRDVAML PASGYLVLA
 TviLac1 LNSTTMVVDWEDPTLLOVYNGATTFTSNNAVISLPNANEWYVYVISTAI SVPEPVHLHGFDFFVYLAQGTGYSDSVTLTNDNPPRRDVAML PASGYLVLA
 TvLac1A LNSTTMVVDWEDPTLLOVYNGATTFTSNNAVISLPNANEWYVYVISTAI SVPEPVHLHGFDFFVYLAQGTGYSDSVTLTNDNPPRRDVAML PASGYLVLA
 TvLac1B LNSTTMVVDWEDPTLLOVYNGATTFTSNNAVISLPNANEWYVYVISTAI SVPEPVHLHGFDFFVYLAQGTGYSDSVTLTNDNPPRRDVAML PASGYLVLA
 TvLac1 LNSTTMVVDWEDPTLLOVYNGATTFTSNNAVISLPNANEWYVYVISTAI SVPEPVHLHGFDFFVYLAQGTGYSDSVTLTNDNPPRRDVAML PASGYLVLA
 TkLac1 LNSTTMVVDWEDPTLLOVYNGATTFTSNNAVISLPNANEWYVYVISTAI SVPEPVHLHGFDFFVYLAQGTGYSDSVTLTNDNPPRRDVAML PASGYLVLA
 TgLac1 LNSTTMVVDWEDPTLLOVYNGATTFTSNNAVISLPNANEWYVYVISTAI SVPEPVHLHGFDFFVYLAQGTGYSDSVTLTNDNPPRRDVAML PASGYLVLA
 Tas_154312 LNSTTMVVDWEDPTLLOVYNGATTFTSNNAVISLPNANEWYVYVISTAI SVPEPVHLHGFDFFVYLAQGTGYSDSVTLTNDNPPRRDVAML PASGYLVLA
 Tv_48916 LNSTTMVVDWEDPTLLOVYNGATTFTSNNAVISLPDAGQWYVYVISTAI SVPEPVHLHGFDFFVYLAQGTGYSDSVTLTNDNPPRRDVAML PASGYLVLA

H₆ H₇ S₂₅ S₂₆ S₂₇ S₂₈ S₂₉ S₃₀ S₃₁
 (1)
 TaLac1 FETDNP GAWLMCH I GWTSEEGE GLOWVRESEIADLLDXDALSTCAAWK-----
 Ta_54145 FETDNP GAWLMCH I GWTSEEGE GLOWVRESEIADLLDXDALSTCAAWKSYTSNSNSVIED SGI
 TviLac1 FETDNP GAWLMCH I GWTSEEGE GLOWVROSEIADLLDXDSLSTCAAWT-----
 TvLac1A FETDNP GAWLMCH I GWTSEEGE ALQWVRESEMADLLDXDSLSTCAWT-----
 TvLac1B FETDNP GAWLMCH I GWTSEEGE ALQWVRESEMADLLDXDSLSTCAWT-----
 TvLac1 FETDNP GAWLMCH I GWTSEEGE ALQWVRESEMADLLDXDSLSTCAWT-----
 TkLac1 FETDNP GAWLMCH I GWTSEEGE ALQWVRESEIADLLDXDELSTCAWK-----
 TgLac1 FETDNP GAWLMCH I GWTSEEGE ALQWVRESEIADLLDXDELSTCAWK-----
 Tas_154312 FETDNP GAWLMCH I GWTSEEGE ALQWVRESEIADLLDXDELSTCAWKSYASDNSVIED SGI
 Tv_48916 FETDNP GAWLMCH I GWTSEEGE GLOWVRESEIADLLDXDELSTCAWKSYASDNSVIED SGI

S₃₂ H₈ S₃₃ H₉ H₁₀
 L₄

Figura 4. Alineamiento múltiple de las lacasas *sensu stricto* extracelulares de *Trichoderma* spp. El alineamiento múltiple se construyó con el programa Clustal X V2.0.11. A la izquierda del alineamiento se indica el código asignado a cada una de las secuencias de lacasa: TaLac1 (*T. atroviride*), TgLac1 (*T. gamsii*), TvLac1, TvLac1A, TvLac1B (*T. viridescens*), TviLac1 (*T. viride*), TkLac1 (*T. koningii*), Tas_154312 (*T. asperellum* CBS 433.97), Ta_54145 (*T. atroviride* IMI 206040) y Tv_48916 (*T. virens* Gv29-8). La secuencia señal de secreción se encuentra en itálicas y con letras azules. Los segmentos L1–L4 están indicados con una doble línea bajo el alineamiento. Los residuos involucrados en la coordinación de los cuatro iones de cobre están indicados en rojo, en azul el aminoácido que ocupa la posición axial del cobre T1, en verde los aminoácidos que conforman la puerta SDS, en cian los sitios putativos de *N*-glicosilación y en amarillo las Cys que forman los puentes disulfuro (1) y (2). El motivo conservado DSGL en el extremo *C*-terminal se encuentra en letras azules. Los residuos en negrilla y subrayados con una línea continua forman láminas β (S_1 – S_{33}) y aquellos subrayados con una línea ondulada forman hélices α (H_1 – H_{10}).

En las lacasas de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. se identificaron 2 de los 3 residuos que constituyen la vía de transferencia de protones desde el sustrato hacia el CTN y corresponden a los aminoácidos Gly/Ala-173 y Ser-520 (para efectos de comparación con las secuencias de lacasa de las cepas de referencia *T. asperellum* (CBS 433.97), *T. atroviride* (IMI 206040) y *T. virens* (Gv29-8), se consideraron los residuos faltantes del extremo *N*- y *C*-terminal) (Fig. 4); sin embargo, no se identificó el motivo conservado Asp-Ser-Gly-(Leu/Ile/Val) (DSGL), debido a la ausencia del extremo *C*-terminal. Aun cuando las secuencias carecen de los primeros 14 residuos en el extremo *N*-terminal, fue posible establecer el sitio de corte del péptido señal de secreción entre los aminoácidos 18 y 19, y corresponde a la secuencia VYA–FP (Fig. 4). La escisión del péptido señal en cada una de las lacasas de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. generaría proteínas maduras con una longitud de 548 residuos, con pesos moleculares aproximados de entre 61 y 62 kDa y con *pI*s entre 4.3 y 4.5. La localización extracelular de las lacasas se refuerza con la predicción de 11 sitios putativos de *N*-glicosilación en TaLac1, TgLac1, TvLac1, TvLac1A, TvLac1B y TkLac1, y de 12 sitios de *N*-glicosilación en TviLac1 (Fig. 4). Los sitios de *N*-glicosilación son congruentes con los encontrados previamente en las lacasas putativas extracelulares de *T. asperellum* CBS 433.97 (Tas_154312), *T. atroviride* IMI 206040 (Ta_54145) y *T. virens* Gv29-8 (Tv_48916) (Cázares-García *et al.* 2013) (Fig. 4).

El porcentaje de identidad entre las secuencias polipeptídicas de las lacasas *sensu stricto* extracelulares de *Trichoderma* spp. se encuentra entre 83.6 (Tv_48915/TviLac1, *T. viride*, CMU-218) y 100% (Ta_54145/TaLac1, *T. atroviride* CMU-8) (Tabla 2). La mayor identidad se presentó entre la lacasa Ta_54145 de la cepa IMI 206040 con la lacasa TaLac1 de la cepa silvestre CMU-8, ambas pertenecientes a la especie de *T. atroviride*. Debido a las variaciones en las secuencias del gen, las lacasas de las cepas silvestres de *T. viridescens* (TvLac1, TvLac1A y TvLac1B) difieren en cinco residuos de aminoácidos (Tyr/His31, Asn/His260, Asn/Ser281, Gly/Val299 y Asn/Asp331) (Fig. 4), razón por la cual poseen una identidad de entre 99.2 (TvLac1/TvLac) y 99.6% (TvLac1/TvLac1B). Las lacasas de *Trichoderma* spp. exhiben altos porcentajes de identidad con lacasas reportadas de diversos hongos ascomicetos. La identidad más alta se obtuvo con las lacasas extracelulares de los hongos *F. oxysporum* (62.4 – 63.6%), *C. parasitica* (51.5 – 52.0%), *A. niger* (51.3 – 54.6%), *G. graminis* var. *tritici* (52.2 – 53.9%) y *G. graminis* var. *graminis* (52.5 – 53.2%). El porcentaje de identidad comparado con otras lacasas de ascomicetos oscila entre 25 y 50%, mientras que la identidad con respecto a lacasas de hongos basidiomicetos es menor al 23% (Tabla suplementaria T3).

Tabla 2. Identidad (%) entre las secuencias de lacasa de las especies de *Trichoderma* spp.

	TaLac1	Ta_54145	TviLac1	TvLac1A	TvLac1B	TvLac1	TkLac1	TgLac1	Tas_154312
TaLac1	---	100	92.7	93.2	93.2	93.6	93.2	93.6	88.8
Ta_54145	100	---	92.9	93.4	93.4	93.8	93.4	93.8	89.0
TviLac1	92.7	92.9	---	91.9	92.7	92.7	91.9	91.9	87.7
TvLac1A	93.2	93.4	91.9	---	99.2	99.2	95.5	94.5	87.8
TvLac1B	93.2	93.4	92.7	99.2	---	99.6	96.2	95.3	88.4
TvLac1	93.6	93.8	92.7	99.2	99.6	---	96.2	95.3	88.2
TkLac1	93.2	93.4	91.9	95.5	96.2	96.2	---	96.2	89.1
TgLac1	93.6	93.8	91.9	94.5	95.3	95.3	96.2	---	88.9
Tas_154312	88.8	89.0	87.7	87.8	88.4	88.2	89.1	89.9	---
Tv_48916	84.7	84.9	83.6	84.7	85.2	84.9	85.4	84.5	87.3

Clave: TaLac1, *T. atroviride* (CMU-8); Ta_54145, *T. atroviride* (IMI 206074); TviLac1, *T. viride* (CMU-218); TvLac1A, *T. viridescens* (CMU-231); TvLac1B, *T. viridescens* (CMU-236); TkLac1, *T. viridescens* (CMU-66); TgLac1, *T. koningii* (CMU-234); TgLac1, *T. gamsii* (CMU-21); Tas_154312, *T. asperellum* (CBS 433.97); Tv_48916, *T. virens* (Gv29-2).

Construcción tridimensional y análisis estereoquímico de las lacasas de *Trichoderma* spp.

Las estructuras tridimensionales de *T. atroviride* (TaLac1, CMU-8), *T. gamsii* (TgLac1, CMU-21), *T. viridescens* (TvLac1, CMU.66; TvLac1A, CMU-231; TvLac1B, CMU-236), *T. viride* (TviLac1, CMU-218), *T. koningii* (TkLac1, CMU-234), *T.*

asperellum CBS 433.97 (Tas_154312), *T. atroviride* IMI 206040 (Ta_54145) y *T. virens* Gv29-8 (Tv_48916) se construyeron mediante modelado por homología (Fig. 5). La búsqueda y selección del templado se realizó a través de un análisis BLASTp contra la base de datos de SWISS-MODEL, arrojando 3 hits significativos que corresponden a las lacasas cristalizadas de los hongos ascomicetos *B. aclada* a 1.67 Å (código PDB: 3SQR-A) (E-value: e^{-131}), *M. albomyces* a 1.67 Å (código PDB: 3FU7-B) (E-value: e^{-101}) y *T. arenaria* a 2.5 Å (código PDB: 3PPS-D) (E-value: $2e^{-99}$). La lacasa de *B. aclada* fue elegida como el mejor templado debido a que posee una similitud de secuencia mayor al 47% con las lacasas *sensu stricto* extracelulares de *Trichoderma* spp., mientras que la similitud con las lacasas de *M. albomyces* y *T. arenaria* se encuentra alrededor del 40%. Además, el análisis filogenético demuestra claramente que la proteína 3SQR está más relacionada a las lacasas extracelulares de *Trichoderma* spp. que 3FU7 y 3PPS (Fig. 8). Los modelos tridimensionales creados con los programas en línea CPHmodels, PHYRE2 y ESyPred3D fueron clasificados en el servidor QMEAN en base a sus características geométricas. Los modelos con mayor calidad estructural se obtuvieron con ESyPred3D y presentaron un QMEAN score de entre 0.7 (TvLac1) y 0.73 (TviLac1) (Tabla 3). El gráfico de Ramachandran generado a partir de la validación estereoquímica de éstos modelos en PROCHECK indicó que el mayor porcentaje de los residuos de aminoácidos no-Gly y no-Pro, se localizan en las regiones más favorables (85.3 – 87.4%) (Tabla 3). El resto de los aminoácidos están distribuidos tanto en regiones permitidas (9.0 – 12.4%) como en regiones generosamente permitidas (1.3 – 2.7%), y sólo un pequeño porcentaje se localiza en zonas no permitidas (0.4 – 1.5%) (Tabla 3). Estos últimos aminoácidos se encuentran en blucles que poseen estructuras secundarias irregulares y son estabilizados por puentes de hidrógeno formados entre aminoácidos contiguos o con regiones adyacentes de la proteína.

Tabla 3. Parámetros de calidad de los modelos 3D de las lacasas *sensu stricto* extracelulares de *Trichoderma* spp.

Proteína	QMEAN score	Regiones favorables		Regiones permitidas		Regiones generosamente permitidas		Regiones no permitidas		Gly	Pro	Total	RMDS	
		aa	%	aa	%	aa	%	aa	%				Å	Cα
TaLac1	0.706	392	86.7	46	10.2	12	2.7	2	0.4	39	23	516	0.345	500
TgLac1	0.709	393	87.1	46	10.2	9	2.0	3	0.7	40	23	516	0.367	500
TvLac1	0.700	392	86.3	47	10.4	11	2.4	4	0.9	39	23	516	0.411	497
TvLac1A	0.708	390	85.7	54	11.9	8	1.8	3	0.7	36	23	516	0.383	497
TvLac1B	0.700	395	86.8	48	10.5	7	1.5	5	1.1	37	23	516	0.395	500
TviLac1	0.730	392	86.5	44	9.7	10	2.2	7	1.5	37	23	516	0.358	502

TkLac1	0.700	393	87.1	45	9.9	8	1.8	4	0.9	37	23	516	0.373	499
Ta_54145	0.700	409	87.6	42	9.0	12	2.6	4	0.9	40	23	532	0.379	515
Tas_154312	0.700	405	86.5	53	11.3	6	1.3	4	0.9	39	23	532	0.395	516
Tv_48916	0.700	399	85.3	58	12.4	6	1.3	5	1.1	38	24	532	0.387	515

RMSD (Root Mean Square Deviations): Raíz de la desviación cuadrática media; C α : Número de átomos de carbono- α superpuestos; aa, aminoácidos; Gly, Glicina; Pro, Prolina. Las claves de las especies/proteínas son las mismas de la Tabla 1. El QMEAN score se determinó en SWISS-MODEL. El gráfico de Ramachandran se generó en PROCHECK.

Las raíces de las desviaciones cuadráticas medias (rmsd: root mean square deviations) calculadas en Swiss-Pdb Viewer de la superposición de las estructuras 3D de las lacasas de *Trichoderma* spp. sobre la estructura de la lacasa de *B. aclada* 3SQR, oscilan entre 0.358 Å (TviLac1) y 0.411 Å (TvLac1) (Tabla 3). Los datos derivados de los análisis estereoquímicos y conformacionales de los modelos 3D se encuentran dentro del rango de valores reportados para las estructuras de lacasas determinadas experimentalmente, por lo que son altamente confiables para la interpretación de las relaciones estructura-función.

Organización espacial de las lacasas *sensu stricto* extracelulares de *Trichoderma* spp.

Las estructuras de las lacasas de *Trichoderma* spp. poseen alta homología con las estructuras tridimensionales de lacasas fúngicas que han sido cristalizadas y caracterizadas. El plegado general comprende tres dominios cupredoxina que están ordenados de manera secuencial (I – III) y organizados en una estructura globular alrededor del sitio catalítico; cada dominio exhibe una topología de barriles- β (Fig. 5). En cada una de las lacasas de *Trichoderma* spp. el dominio I (residuos 1 – 196) está conformado por 10 láminas β y 2 hélices α , el dominio II (197 – 345) contiene el mismo número de estructuras secundarias que el dominio I (10 láminas β y 2 hélices α), mientras que el dominio III (346 – 566) posee 12 láminas β y 6 hélices α (Fig. 4).

Aun cuando las diez lacasas de *Trichoderma* spp. poseen el mismo número de estructuras secundarias, existen diferencias sutiles en la longitud de las láminas β que se forman en la región inicial del dominio III (aminoácidos 378 – 395) debido a variaciones en las secuencias de aminoácidos (Fig. 4). Estas modificaciones estructurales conducen a un arreglo tridimensional diferencial de algunos de los residuos de aminoácidos que forman parte del sitio putativo de unión a sustrato (ver más adelante) (Fig. 6). Las estructuras moleculares son estabilizadas por dos puentes disulfuro. El primero de ellos conecta la porción C-terminal al dominio I y

está formado por los residuos Cys146 – Cys547, en tanto que el segundo se da entre los residuos Cys327 – Cys360 y une a los dominios I y II (Fig. 4). Además, los residuos de aminoácidos del extremo *N*-terminal y *C*-terminal (éste último evaluado en las lacasas de las cepas de referencia) están involucrados en la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, lo que proporciona mayor estabilidad al monómero. La determinación de la distribución del potencial electrostático de superficie reveló una dominancia de cargas negativas, lo cual es congruente con los *pI*'s ácidos calculados para las lacasas de *Trichoderma* spp.

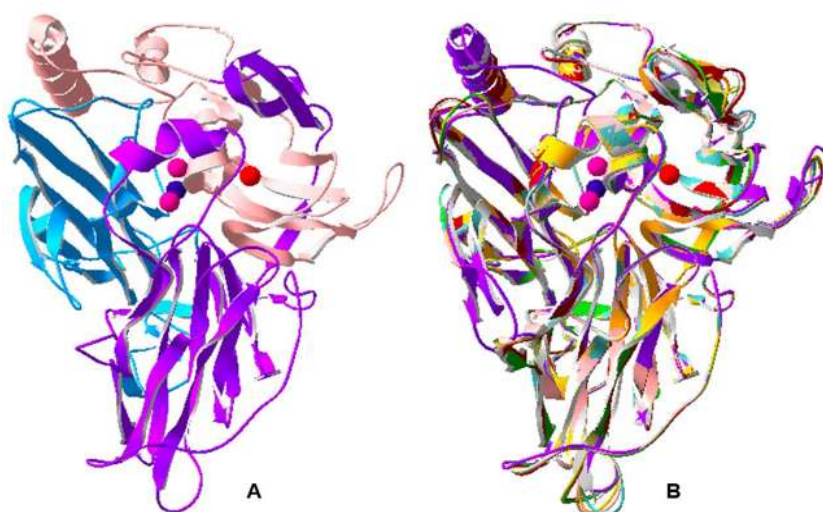


Figura 5. Estructuras tridimensionales de las lacasas extracelulares de *Trichoderma* spp. A) TaLac1, B) Superposición de la estructura globular de TaLac1 (Azul), TgLac1 (Verde olivo), TvLac1 (Guinda), TvLac1A (Naranja), TvLac1B (Verde), TviLac1 (Durazno), TkLac1 (Gris), Ta_54145 (Blanco), Tas_154312 (Cian), Tv_48916 (Amarillo) sobre la lacasa cristalizada de *B. aclada* 3SQR-A (Morado). En A) el Dominio I se encuentra en Azul, el Dominio II en Morado y el Dominio III en Rosa. En A) y B) el átomo de cobre T1 se encuentra en Rojo, el cobre T2 en Azul y el par de cobres T3 en Magenta.

El sitio activo de las lacasas de *Trichoderma* spp. consiste de un centro mononuclear (CMN) T1 y un centro trinuclear (CTN) T2/T3-T3' (Fig. 6). En el CMN, el cobre T1 está coordinado por los residuos His453, His518, Cys513 y en la posición axial Phe523 (His426, His494, Cys489 y Leu499 en 3SQR) (Fig. 6). La distancia promedio entre el cobre T1 y la Phe523 es de 4.391 Å. No obstante, esta distancia disminuye en las lacasas TvLac1 (3.988 Å) y TkLac1 (3.345 Å) debido a que la cadena lateral de la Phe523 presenta un ligero cambio conformacional con respecto

al resto de las lacasas de *Trichoderma* spp. (Fig. 6). La presencia de una Phe en la posición axial clasifica a las lacasas *sensu stricto* extracelulares de *Trichoderma* spp. como lacasas Tipo 3. En el CTN, el cobre T2 está coordinado por los residuos His125 e His456 (His87 e His429 en 3SQR). El cobre T3 se une a los aminoácidos His171, His458 e His512 (His133, His431 e His488 en 3SQR) y el cobre T3' está coordinado por His127, His169, e His514 (His89, His131 e His490 en 3SQR) (Fig. 6). El CMN interactúa con el CTN a través del tripéptido conservado His512-Cys513-His514 (His488-Cys489-His490 en 3SQR) (Fig. 6). La distancia calculada del cobre T1 al cobre T3 es de 12.356 Å y del cobre T1 al cobre T3' es de 12.934 Å.

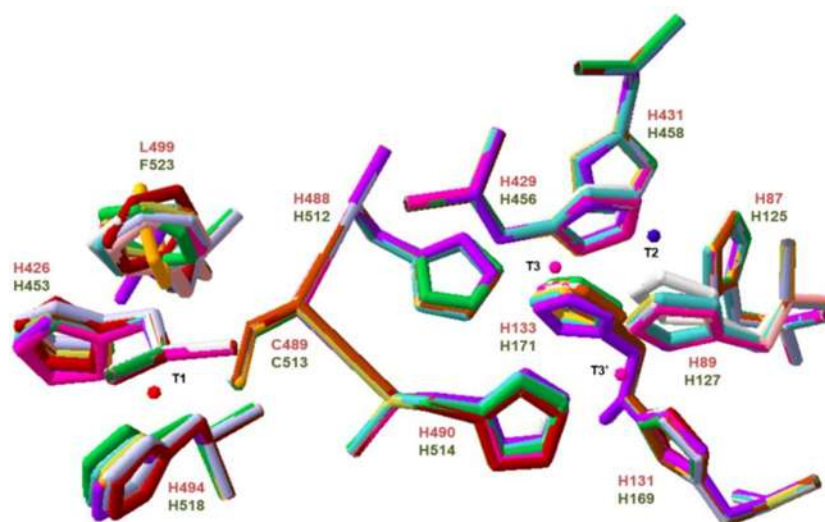


Figura 6. Sitio activo de las lacasas extracelulares de *Trichoderma* spp. Superposición del sitio activo de las lacasas TaLac1 (Azul), TgLac1 (Verde olivo), TvLac1 (Guinda), TvLac1A (Naranja), TvLac1B (Verde), TviLac1 (Durazno) y TkLac1 (Gris), Ta_54145 (Blanco), Tas_154312 (Cian), Tv_48916 (Amarillo) sobre la lacasa cristalizada de *B. aclada* 3SQR-A (Morado). El átomo de cobre T1 se encuentra en Rojo, el cobre T2 en Azul y el par de cobres T3 en Magenta. El código de aminoácidos está indicado como sigue: Rosa para *B. aclada* y Verde para *Trichoderma* spp.

En la superficie molecular de las lacasas de *Trichoderma* spp. se distinguen los canales de solventes T2 y T3 que constituyen la vía de acceso hacia el CTN (Fig. 5). El primer canal se localiza a un costado del cobre T2 entre los dominios I y III, y forma una cavidad estrecha que está revestida por los residuos Gly128, Arg130, Asp138, Gln162, Tyr163, Leu283, Pro285, Gly459, Phe460, Asp461 y Asp487. Por otro lado, el canal T3 es un canal amplio que se sitúa en dirección al cobre T3 y está conformado por los aminoácidos Ser130, His171, Phe172, Ala/Gly173, Gln175,

Ala176, His514, Gly516, Thr519 y Ser520. De manera interesante, el extremo C-terminal de las lacasas de *Trichoderma* spp. se encuentra dentro del canal putativo T3 (Fig. 5).

El análisis realizado en CASTp, así como la comparación estructural de las lacasas de *Trichoderma* spp. con lacasas que han sido co-cristalizadas, develó que el sitio de unión a sustrato se localiza cerca del CMN T1 y está formado principalmente por aminoácidos hidrofóbicos pertenecientes a los dominios II y III. Los residuos Gly222, Pro223, Asp264, Ala326, Cys327, Ser328, Lys391, Phe397, Trp399, Trp517, Val451, Ile515, Trp517 e His518, están conservados en el sitio de unión a sustrato de las diez lacasas extracelulares de *Trichoderma* spp. mientras que los aminoácidos localizados en las posiciones 389, 448 y 451 presentan las sustituciones Val/Leu, Val/Ala/Thr/Glu y Met/Ile, respectivamente (Fig. 4). La cadena lateral de la mayoría de estos aminoácidos posee una disposición espacial en dirección al sustrato. Sin embargo, en las lacasas de *T. gamsii* (TgLac1) y *T. viridescens* (TvLac1, TvLac1B y TkLac1) la cadena lateral de los residuos Leu389 y Lys391 está orientada hacia el exterior de la cavidad por lo que no interactúan con el sustrato. Tanto las sustituciones de aminoácidos como la formación diferencial de estructuras secundarias entre las láminas β S_{22} y S_{24} (Fig. 5) conducen a cambios conformacionales que resultan en variaciones en la forma y el volumen del sitio de unión a sustrato entre las lacasas de *Trichoderma* spp. (Fig. 7). En TvLac1, TvLac1A y TgLac1 la región que comprende los aminoácidos 388 – 395 (Fig. 5), forma una pequeña protuberancia que se extiende hacia la superficie de la proteína e incrementa el tamaño y la flexibilidad de la cavidad del sustrato, mientras que en el resto de las lacasas de *Trichoderma* spp. ésta región está orientada hacia el interior del sitio de unión a sustrato haciéndolo más definido y ligeramente más compacto (Fig. 7). La hidrofobicidad del sitio de unión a sustrato sigue el patrón TkLac1 = TgLac1 = TvLac1 = TvLac1A = TvLac1B > Ta_54145 = TaLac1 > TviLac1 > Tv_48916 = Tas_154312. En las diez lacasas de *Trichoderma* spp. los residuos conservados y catalíticamente importantes His518 y Asp264 se localizan en el fondo de la cavidad del sustrato, con sus grupos laterales expuestos hacia la superficie de la enzima.

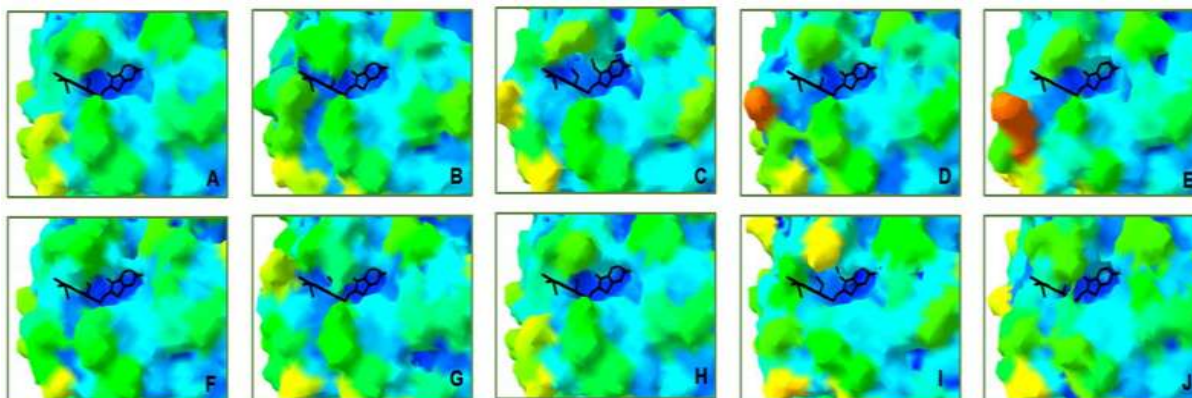


Figura 7. Representación esquemática de la superficie molecular y del sitio putativo de unión a sustrato de las lacasas extracelulares de *Trichoderma* spp. A) TaLac1, B) TgLac1, C) TvLac1, D) TvLac1A, E) TvLac1B, F) TviLac1, G) TkLac1, H) Ta_54145, I) Tas_154312, y J) Tv_48916. Las representaciones de superficie molecular se encuentran en la misma orientación con la finalidad de facilitar su comparación. Para el análisis de acoplamiento de sustrato se utilizó ABTS y en la figura está indicado en color negro al centro de la imagen.

Análisis filogenético

El análisis filogenético realizado mediante los criterios antes descritos y considerando un intervalo de 537 a 628 residuos de aminoácidos, agrupó a las lacasas en dos grandes clados con un valor bootstrap de 100%. En el primer clado se encuentran las lacasas de hongos ascomicetos y en el segundo las lacasas de hongos basidiomicetos. El clado de hongos ascomicetos presenta a su vez dos ramas soportadas por un valor bootstrap de 66%. La primera de estas ramas está conformada por lacasas que actúan a nivel intracelular a excepción de Tas_71665 de *T. asperellum*, y en el segundo clado se encuentran las lacasas que presentan actividad extracelular, incluidas las lacasas de los aislados silvestres de *Trichoderma* spp. y de las cepas de referencia de *T. atroviride* IMI 206040, *T. asperellum* CBS 433.97 y *T. virens* Gv29-8 (Fig. 8). Las lacasas extracelulares de *Trichoderma* spp. muestran estrechas relaciones con ortólogos de *F. oxysporum*, *G. graminis*, *A. niger*, *H. acidophila* y *C. parasitica* (Fig. 8).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se diseñaron iniciadores específicos que permitieron realizar la búsqueda y caracterización de los genes que codifican para la actividad de lacasa extracelular *sensu stricto* en 23 aislados silvestres de *Trichoderma* spp. Con los oligos LacT-F/LacT-R se amplificó el gen de lacasa extracelular en *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. viridescens*, *T. viride* y *T. koningii* pero no en las cepas de *T. tomentosum* y *T. harzianum*. El análisis bioinformático previo ha documentado la ausencia de genes de lacasa extracelular en *T. harzianum* (Cázares-García *et al.* 2013), lo cual es congruente con los resultados obtenidos en éste trabajo para las cepas de dicho especie. Nuestros resultados sugieren que *T. tomentosum* es otra especie del género que no posee genes de lacasa extracelular, aunque no se excluye la posibilidad de que ésta y otras especies del género *Trichoderma* que no presentan amplificación con los primers aquí diseñados posean lacasas adquiridas por transferencia horizontal, algo que se ha demostrado para *T. asperellum* (Cázares-García *et al.*, 2013) y que no puede ser demostrado con los iniciadores empleados, los cuales detectan genes ortólogos. Por otra parte, se ha propuesto que todas las especies de *Trichoderma* conservan un gen de lacasa intracelular como una característica ancestral (Cázares-García *et al.* 2013), por lo que los resultados aquí obtenidos muestran claramente que los iniciadores diseñados no amplifican lacasas intracelulares de *Trichoderma* spp. Adicionalmente, ninguna de las cepas de otros géneros de ascomicetes y basidiomicetes empleadas en éste estudio generó amplificación con los iniciadores diseñados, aun variando tanto las concentraciones de reactivos como el programa de amplificación. La amplificación negativa en los hongos no pertenecientes al género *Trichoderma* usados en este trabajo no fue una cuestión técnica, ya que en todos los casos se obtuvo amplificación con los iniciadores control ITS (datos no mostrados). Tomados en conjunto, los resultados indican que los iniciadores diseñados permiten la amplificación específica de genes de lacasa extracelular en cepas silvestres de las especies del género *Trichoderma*.

Los iniciadores diseñados permiten corroborar la presencia de actividad de lacasa extracelular *sensu stricto* en cepas y especies del género *Trichoderma*.

Adicionalmente, la posibilidad de contar con la secuencia de genes de lacasa extracelular en cepas silvestres de *Trichoderma* spp. constituye una buena herramienta para el análisis estructural y filogenético de dicha función enzimática. La información generada en ese sentido contribuye a establecer hipótesis y estrategias de estudio experimental para elucidar el papel fisiológico de las lacasas extracelulares dentro del género, al mismo tiempo que amplía las posibilidades de aplicación biotecnológica de las especies dentro de éste.

Los genes de lacasa de las especies de *T. atroviride* (*talac1*), *T. gamsii* (*tglac1*), *T. viridescens* (*tvlac1*, *tvlac1A*, *tvlac1B*), *T. viride* (*tvilac1*) y *T. koningii* (*tklac1*) presentaron un alto grado de identidad y similitud estructural con los genes de lacasa extracelular de las cepas de *T. asperellum* (CBS 433.97), *T. atroviride* (IMI 206040) y *T. virens* (Gv29-8) previamente identificados (Cázares-García *et al.* 2013). Se ha sugerido un escenario en el que el ancestro común del género *Trichoderma* poseía un gen de lacasa extracelular y otro intracelular, con posterior retención o pérdida de éste, o adquisición de un gen adicional mediante transferencia horizontal (Cázares-García *et al.* 2013). Si dicho escenario es correcto, entonces los resultados de éste trabajo indican que *T. tomentosum* pertenece al grupo de especies del género que ha perdido la lacasa extracelular y conserva únicamente la intracelular. En la misma línea de razonamiento, *T. gamsii*, *H. viridescens*/*T. viridescens*, *H. rufa*/*T. viride* y *H. koningii*/*T. koningii* parecen haber conservado el carácter ancestral al retener la actividad de lacasa extracelular. Queda por confirmar si estas últimas especies poseen alguna otra actividad extracelular de lacasa adquirida por transferencia horizontal (Cázares-García *et al.* 2013), u otro mecanismo no identificado hasta este momento para dicha función enzimática en *Trichoderma*, tal como duplicación. Duplicaciones del gen de lacasa extracelular se han documentado en otras especies de Sordariales (Pöggeler 2011) y nosotros encontramos la presencia de pseudogenes de lacasa en *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum* y *T. citrinoviride* (datos no publicados), por lo que no se puede excluir ésta posibilidad en algunas especies del género *Trichoderma*.

En general, se ha reportado un número bajo de intrones en genes de lacasa de ascomicetes. En distintas variedades de *G. graminis* las secuencias de los

genes *LAC1* y *LAC2* presentan dos intrones (Litvintseva *et al.* 2002), al igual que en el único gen de lacasa extracelular reportado para la especie acuática *Myrioconium* sp. (Martin *et al.* 2007). En el caso de *P. anserina* se ha reportado la presencia de tres intrones en el gen *lac2* (Fernández *et al.* 1996). Dentro de las MCOs el número de intrones ha sido de vital importancia para la clasificación de los genes en subfamilias, permitiendo así la identificación de genes homólogos y la asignación de funciones específicas en especies de diferentes taxones. En éste sentido, los genes de lacasa extracelular de las cepas de *Trichoderma* spp. aquí analizadas caen en la familia A descrita en Cázares-García *et al.* (2013).

A la fecha, un gran número de genes de lacasa de distintas especies de ascomicetos y basidiomicetos han sido aislados y secuenciados (Junghanns *et al.* 2009, Pezzella *et al.* 2009), observándose homologías más altas entre los genes de lacasa de hongos basidiomicetos, de entre 42 y 98% de identidad, que entre los de ascomicetos, la cual oscila entre 53 y 65% de identidad (Tetsch *et al.* 2005). Estos mismos intervalos de identidad se mantienen para los genes de lacasa de *Trichoderma* spp. ya que mostraron un porcentaje de identidad entre 32.6 y 61.6% con respecto a los genes de lacasa de diversas especies hongos ascomicetos. El menor porcentaje de identidad se presentó entre el gen de lacasa de *T. viridescens* y *S. macrospora* (Pöggeler, 2011), mientras que el máximo valor de identidad se presentó entre *T. atroviride* y *F. oxysporium* (Córdoba y Roncero 2008). Es factible que la menor homología entre genes de lacasa de ascomicetos se deba a una diversificación de las funciones de lacasa extracelular en dicho grupo taxonómico (Hoegger *et al.* 2006) en relación a la función más específica en basidiomicetos que es la degradación de lignina (Arora y Sharma 2010).

Los genes *tlac1*, *tlac1A* y *tlac1B* pertenecientes a distintas cepas de *T. viridescens* variaron en 19 posiciones de nucleótidos, lo que condujo a cinco cambios de residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica. Esta variabilidad intraespecífica ya ha sido descrita en el gen de lacasa 3 de dos cepas del hongo basidiomiceto *Vorvariella volvacea* (Ahlawat y Billette 2011), así como en dos cepas aisladas en diferentes países del hongo ligninolítico *Pycnoporus sanguineus* (Uzan *et al.* 2009). Sin embargo, hasta el momento no existen datos en relación a hongos

ascomicetos. El estudio de la variación intraespecífica del gen de lacasa extracelular puede contribuir a encontrar mecanismos de variación de dicha función o tendencias evolutivas dentro de un grupo taxonómico. La variación de nucleótidos del gen, en complementación con el análisis de los cambios en la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de la proteína resultante, pueden ser de utilidad para el establecimiento de relaciones estructura-función.

La traducción *in silico* de los genes de lacasa de *Trichoderma* spp. reveló que las secuencias polipeptídicas teóricas de *T. atroviride* (TaLac1, CMU-8), *T. gamsii* (TgLac1, CMU-21), *T. viridescens* (TvLac1, CMU.66; TvLac1A, CMU-231; TvLac1B, CMU-236), *T. viride* (TviLac1, CMU-218), *T. koningii* (TkLac1, CMU-234), *T. asperellum* CBS 433.97 (Tas_154312), *T. atroviride* IMI 206040 (Ta_54145) y *T. virens* Gv29-8 (Tv_48916) poseen las características estructurales típicas de las MCO fúngicas (Kumar *et al.* 2003) y los motivos distintivos de las lacasas *sensu stricto* de hongos ascomicetos (Hakulinen *et al.* 2008; Kallio *et al.* 2011). La mayoría de las lacasas fúngicas son glicoproteínas monoméricas con pesos moleculares que van de los 50 a 130 kDa, poseen pI's que oscilan entre pH 2.6 y 6.7, y presentan entre 3 y 10 sitios de *N*-glicosilación (Asn-X-Thr/Ser) (Morozova *et al.* 2007). En las lacasas de *Trichoderma* spp. los sitios de *N*-glicosilación Asn120, Asn232, Asn245, Asn273 y Asn402, coinciden con los sitios *N*-glicosilados de las lacasas cristalizadas de *M. albomyces* (Hakulinen *et al.* 2008) y *T. arenaria* (Kallio *et al.* 2011). El patrón de *N*-glicosilación de la mayoría de las lacasas consiste de cadenas ramificadas de manosa conectadas a residuos de Asn a través de moléculas de N-acetil-D-glucosamina. No obstante, también se han identificado unidades de arabinosa, xilosa, galactosa y glucosa (Vite-Vallejo *et al.* 2009). El contenido de carbohidratos representa entre el 10 y el 35% del peso molecular de la enzima y contribuye al plegado y secreción de la proteína, a la protección contra proteólisis, a la estabilidad de los centros de cobre y, además, potencia la termoestabilidad de las lacasas (Rodgers *et al.* 2009). A futuro sería interesante estudiar el nivel glicosilación de las lacasas de *Trichoderma* spp. y evaluar su posible relación con la estabilidad de la proteína y la actividad catalítica de la enzima.

El análisis de la estructura primaria de cientos de lacasas provenientes de diferentes organismos (insectos, plantas, hongos y bacterias) condujo a la identificación de cuatro regiones denominadas como segmentos L1 a L4. Estos segmentos poseen una longitud de entre 8 y 24 residuos de aminoácidos, están distribuidos a lo largo de la cadena proteínica y son la marca distintiva de los miembros de la familia de las MCO (Kumar *et al.* 2003). En las lacasas de *Trichoderma* spp. los segmentos L1 – L4 están altamente conservados e incluyen a los 12 residuos de aminoácidos que actúan como ligandos de los cuatro átomos de cobre, así como otros residuos que son indispensables para mantener el plegado conformacional de estas enzimas (Kumar *et al.* 2003).

A nivel tridimensional, las lacasas de *Trichoderma* spp. presentan una arquitectura globular compuesta por tres dominios cupredoxina, cada uno de los cuales posee una topología de barriles β . El plegado cupredoxina es común a todas las proteínas que contienen cobre, se observó por primera vez en las pequeñas proteínas azurinas y plastocianinas (Murphy *et al.* 1997), y posteriormente se detectó en enzimas multidominio como las ascorbato oxidasas y las ceruloplasminas (Nakamura *et al.* 2003). En las lacasas, los tres dominios son importantes para llevar a cabo la función catalítica. El CMN contiene un átomo de cobre T1 y se localiza en el dominio III, mientras que el CTN posee un átomo de cobre T2 y dos átomos de cobre T3 (T3 y T3') y se sitúa en una cavidad central de la enzima formada en la interface entre los dominios I y III. El dominio II no participa directamente en la formación del sitio activo, aunque contribuye al ensamblaje de la proteína como una unidad funcional (Mot y Silaghi-Dumitrescu 2012). En los modelos 3D de las lacasas de *Trichoderma* spp. el CMN contiene un átomo de cobre que está coordinado trigonalmente por dos residuos de His y uno de Cys, tal como se ha reportado para la mayoría de las lacasas de los diversos grupos taxonómicos (Matera *et al.* 2008). Los estudios de cristalografía de rayos X han puesto de manifiesto que la formación del puente de coordinación entre el cobre T1 y el átomo de azufre de la Cys (S_{cys}) es altamente covalente, lo que causa una fuerte absorción electrónica alrededor de los 600 nm y proporciona a las lacasas su color azul característico (Solomon *et al.* 1996). Comúnmente, las lacasas poseen un cuarto residuo de coordinación en la posición

axial del cobre T1. En las lacasas fúngicas, el ligando axial es usualmente una Leu o Phe (Piontek *et al.* 2002), mientras que en las lacasas bacterianas dicha posición está ocupada por una Met (Silva *et al.* 2012). En base a la sustitución de este residuo, las lacasas se han clasificado como Lac 1 (Met), Lac 2 (Leu) y Lac 3 (Phe), presentando bajos (~400 mV), intermedios (~500 mV) y altos (~800 mV) potenciales redox (E_0), respectivamente (Eggert *et al.* 1998). Las lacasas extracelulares de *Trichoderma* spp. presentan una Phe en la posición axial, por lo que están clasificadas como Lac 3. Hasta el momento dicha clasificación ha sido objeto de intensos debates, debido a que los estudios de mutagénesis dirigida son contradictorios. Algunos trabajos indican que la sustitución del residuo de Met por una Leu o Phe conduce a un incremento de 100 mV en el E_0 del cobre T1 de CotA (Melo *et al.* 2007). Sin embargo, el reemplazo de la Leu por una Phe en las lacasas de *M. thermophila* y *R. solani* no generó cambios significativos en el E_0 (Xu *et al.* 1998).

En un esfuerzo por definir las determinantes moleculares que modulan el amplio rango de E_0 de las lacasas, Piontek *et al.* (2002) correlacionaron el valor de E_0 con las distancias de coordinación alrededor del cobre T1, sugiriendo que a mayores distancias, mayores E_0 . No obstante, los espectros de Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) registrados para lacasas que difieren en más de 300 mV son muy similares, excluyendo así las diferencias estructurales en los alrededores del cobre T1 (Matera *et al.* 2008). En particular, en los modelos 3D de las lacasas de *Trichoderma* spp. se identificaron variaciones importantes en las distancias entre el cobre T1 y la Phe axial. En el gráfico de Ramachandran de cada una de las lacasas de *Trichoderma* spp. el ligando axial se localiza en la región central, lo que sugiere que la cadena lateral de la Phe posee una conformación estereoquímicamente favorecida. Más allá de la influencia de la esfera de coordinación del cobre T1, se ha descrito que factores como la accesibilidad del sustrato, el número de puentes de hidrógeno, la orientación de los dipolos y la distancia entre el CMN y el CTN, afectan el E_0 de las lacasas fúngicas (Mot y Silaghi-Dumitrescu 2012).

Al igual que en otras MCO, el CTN de las lacasas de *Trichoderma* spp. contiene un átomo de cobre T2 y dos átomos de cobre T3. En proteínas homólogas,

los átomos de cobre del CTN están coordinados por ocho residuos de His que aparecen en un patrón altamente conservado de cuatro motivos His-X-His. El cobre T2 está coordinado por dos de éstas His y por una molécula de oxígeno (OH^- o H_2O). Los cobres T3 están unidos a la proteína por las seis His restantes y una molécula de oxígeno (OH^- u O^{2-}) que mantiene el fuerte acoplamiento antiferromagnético distintivo de éste par de cobres (Bento *et al.* 2010). Gracias a los estudios de cristalografía de rayos-X se sabe que la vía de transferencia de electrones desde el CMN hacia el CTN corresponde al cuarto motivo conservado His-Cys-His, presente en las lacasas de *Trichoderma* spp. La Cys central, además de unir al átomo de cobre T1, lanza los electrones a cada una de las His adyacentes, y estas a su vez los transfieren al par de cobres T3 (His512 al cobre T3' e His514 al cobre T3, en las lacasas de *Trichoderma* spp.) en donde es reducido el oxígeno molecular a agua (Quintanar *et al.* 2007).

En los modelos 3D de las lacasas de *Trichoderma* spp. se identificaron los canales de solventes que constituyen la vía de acceso hacia el CTN. El canal denominado T3, permite la entrada y unión del oxígeno molecular al CTN, en tanto que el canal T2 está involucrado en la translocación de las moléculas de agua desde el CTN hacia la superficie de la enzima (Piontek *et al.* 2002). En las lacasas de *Trichoderma* spp. ambos canales están formados principalmente por aminoácidos polares y neutros, facilitando el paso de moléculas de agua y la formación de puentes de hidrógeno (Zhukova *et al.* 2007). En la entrada del canal T2 se encuentran los aminoácidos ácidos Asp138 y Asp487, correspondientes a Asp108 y Asp478 en la lacasa de *T. arenaia* (Kallio *et al.* 2011). Los estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que tales residuos asisten en la conversión del oxígeno molecular a agua, permitiendo la transferencia de protones (Quintanar *et al.* 2005). Una característica interesante es que, al igual que en las lacasas cristalizada de *M. albomyces* (Hakulinen *et al.* 2002) y *T. arenaia* (Kallio *et al.* 2011), los últimos cuatro residuos de aminoácidos (DSGLV/I) de las lacasas de *Trichoderma* spp. penetran en el canal de solvente T3. Aun cuando se desconoce el papel exacto, es posible que las lacasas de los hongos ascomicetos utilicen el grupo carboxilato del extremo C-terminal en la transferencia de protones para la reducción del oxígeno molecular

(Kallio *et al.* 2011). En la parte superior del canal T3 se identificaron también los residuos de aminoácidos que forman la puerta SDS. En las lacasas de *M. albomyces* (Hakulinen *et al.* 2008) y *T. arenaria* (Kallio *et al.* 2011) esta puerta está conformada por dos residuos de Ser y uno de Asp, que se cree participan en la transferencia de protones desde el CMN hacia el CTN.

En las lacasas de *Trichoderma* spp. el sitio de unión a sustrato se localiza en la vecindad del CMN y está formado principalmente por aminoácidos hidrofóbicos que previenen la cercanía de las moléculas de agua al ion metálico y facilitan la interacción de los sustratos con el sitio activo de la enzima (Cambria *et al.* 2010). Tal como se ha descrito para otras lacasas fúngicas, en la cavidad de sustrato de las lacasas de *Trichoderma* spp. el cobre T1 está relativamente expuesto al solvente e interactúa con las moléculas de sustrato a través del anillo imidazol de la His518 (His508 en la lacasa de *M. albomyces*) (Silva *et al.* 2012, Kallio *et al.* 2009). Se ha sugerido que ésta His es el aceptor primario de electrones ya que mantiene una posición privilegiada para interactuar con el sustrato, debido a su fácil acceso a la superficie de la molécula (Kallio *et al.* 2009).

Otro residuo importante para la actividad catalítica de las lacasas es el aminoácido Asp264. En la lacasa de *M. albomyces* el residuo equivalente corresponde a Glu235 y participa en la oxidación del sustrato mediante la aceptación de protones. Los estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que la sustitución de Glu por Asp disminuye ligeramente la afinidad de la lacasa por compuestos fenólicos, sin afectar las constantes catalíticas de la reacción (Kallio *et al.* 2009, Kallio *et al.* 2011). Todas las lacasas fúngicas conservan el residuo Asp/Glu aun cuando el resto de los aminoácidos que conforman la cavidad de sustrato varían considerablemente (Kallio *et al.* 2009, Ge *et al.* 2010). El análisis comparativo de los sitios de unión a sustrato entre las lacasas de *Trichoderma* spp. reveló una mayor área de interacción y accesibilidad al sustrato en las lacasas de las especies de *T. viridescens* y *T. gamsii*, por lo que son capaces de acoplar adecuadamente sustratos voluminosos como el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS). No obstante, las diez lacasas de *Trichoderma* spp. fueron capaces de unir al ABTS, aunque en TkLac1, Tas_154312 y Tv_48916 se presentó impedimento estérico. En

las lacasas de *Trichoderma* spp. el ABTS asume una estructura en forma de “U” con el centro de la molécula en proximidad a la His518. Este acomodo se ha reportado en la lacasa CotA de *Bacillus subtilis*, en donde parte de la molécula del ABTS está enterrada en la cavidad y la otra parte está expuesta hacia la superficie de la proteína, interactuando con el ambiente externo (Enguita *et al.* 2004). En éste modelo, el anillo tiazolina de la porción enterrada del ABTS se encuentra más o menos perpendicular al anillo aromático de la His497 de CotA, lo que favorece la transferencia de electrones desde el cobre T1 hacia el CTN (Enguita *et al.* 2004). El acoplamiento *in silico* del ABTS en la lacasa del hongo basidiomiceto *P. cinnabarinus* también es congruente con lo observado en las lacasas de *Trichoderma* spp. En éste caso, el ABTS es capaz de rotar para unirse en estrecha proximidad al cobre T1 y forma puentes de hidrógeno con el residuo de Asn229 (Prasad *et al.* 2011), que corresponde a la His266 en *Trichoderma* spp. Las propiedades de acoplamiento y la identificación de los residuos de aminoácidos que interactúan con el sustrato pueden ser de utilidad para posteriores experimentos de mutagénesis dirigida, con el fin de identificar su papel en la actividad catalítica y la especificidad por sustrato de las lacasas fúngicas.

Un resultado interesante del presente trabajo es la observación de variaciones intraespecíficas en las lacasas de las cepas de *T. viridescens*: TvLac1, TvLac1A y TvLac1B. Los cambios de aminoácidos observados están distribuidos a lo largo del dominio II. Los estudios sobre variación intraespecífica de la secuencia de aminoácidos de lacasas extracelulares de hongos son escasos. En la levadura basidiomicete *Cryptococcus neoformans* se han reportado variaciones entre serotipos en la secuencia de aminoácidos de la lacasa Lac1 que participa en la síntesis de melanina (Ito-Kuwa *et al.* 2008). En esta especie, las variaciones encontradas en la lacasa fueron de uno a dos aminoácidos en el serotipo A, hasta 21 aminoácidos en el serotipo B2, mientras que las cepas analizadas del serotipo C no presentaron variaciones en la secuencia de la proteína. Dichas variaciones generaron valores de identidad entre las proteínas de distintos serotipos que oscilaron entre el 80 y el 96% (Ito-Kuwa *et al.* 2008). Es importante considerar que la lacasa caracterizada de *C. neoformans*, e involucrada con patogenicidad, no es

secretada al medio de cultivo, sino que permanece asociada a la región externa de la pared celular (Zhu *et al.* 2001). Esta localización celular, si bien es extracitoplásmica, puede influir en los mecanismos de variación genética de la proteína cuando se le compara con proteínas extracelulares secretadas al medio, algo que no ha sido investigado a la fecha.

Por último, es importante comentar que el análisis filogenético de las lacasas putativas de *Trichoderma* spp. refuerza el análisis bioinformático estructural. Las proteínas de las cepas silvestres analizadas se agrupan con las proteínas extracelulares previamente caracterizadas en las cepas de referencia, distinguiéndolas de las lacasas intracelulares (Cázares-García *et al.* 2013). Las lacasas TaLac1 (*T. atroviride*), TgLac1 (*T. gamsii*), TvLac1, TvLac1A, TvLac1B (*T. viridescens*), TviLac1 (*T. viride*) y TkLac1 (*T. koningii*) presentaron una estrecha relación con las lacasas de los hongos *F. oxysporum*, *G. graminis*, *A. niger* y *C. parasitica*. Se ha reportado que las lacasas de dichas especies participan en procesos de parasitismo. Los ensayos de expresión en *F. oxysporum* indicaron que los genes de lacasa están regulados positivamente durante la colonización de las raíces de las plantas, actuando ya sea como factores de virulencia o como barrera de protección contra la defensa de la planta y estrés oxidativo (Cordoba y Ronsero 2008). En las variedades *tritici* y *graminis* de la especie *G. graminis*, aun cuando los genes de lacasa poseen un alto grado de homología, sus patrones de transcripción difieren considerablemente bajo distintas condiciones de cultivo. Algunos de estos genes son activos únicamente cuando el hongo se encuentra en la planta hospedera, constituyendo factores de virulencia (Litvintseva y Henson 2002). En las especies de *Trichoderma* se ha sugerido también la participación de la lacasa en proceso de parasitismo. Catalano *et al.* (2011) reportaron el uso de la cepa $\Delta tku70$ para determinar la participación de la lacasa LCC1 de *T. virens* en micoparasitismo de esclerocios de los patógenos de plantas *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*. En dicho estudio encontraron que el gen *lcc1* está fuertemente expresado en etapas tempranas de la colonización de esclerocios de *B. cinerea* e inducido constantemente durante la colonización de esclerocios de *S. sclerotiorum*. La eliminación del gen *lcc1* (mutante $\Delta tku70\Delta lcc1$) alteró la habilidad de *T. viride* para

degradar a los dos tipos de esclerocios. Mientras que la capacidad de degradación de esclerocios de *B. cinerea* se redujo significativamente, la degradación esclerocios de *S. sclerotiorum* fue mayor, sugiriendo la participación de diferentes mecanismos en el micoparasitismo de estos dos tipos de esclerocios por parte de la lacasa LCC1. En la medida en que el número de genes y proteínas de lacasa de cepas silvestres de *Trichoderma* se incrementa será posible establecer hipótesis más firmes sobre la evolución y el papel fisiológico y ecológico de las lacasas en éste género de gran importancia biotecnológica.

CONCLUSIONES

Los oligonucleótidos diseñados amplifican específicamente los genes que codifican para la actividad extracelular de lacasa *sensu stricto* de especies de *Trichoderma*. El análisis bioinformático de las lacasas extracelulares de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. provee de información estructural valiosa que puede ser utilizada para inferir especificidades por sustrato, estabilidad o funciones fisiológicas de ésta actividad enzimática en dicho género. Aunque todas las secuencias de aminoácidos mostraron los motivos comunes a las lacasas *sensu stricto* de hongos, las proteínas de las especies de *Trichoderma* spp. analizadas muestran diferencias significativas en el sitio de unión a sustrato, no en cuanto a la composición de aminoácidos participantes, sino en el volumen de la cavidad. Dicha variación está asociada a aminoácidos vecinos al sitio de unión a sustrato, lo cuales alteran la formación de estructuras secundarias. La filogenia obtenida para las lacasas de las cepas silvestres de *Trichoderma* es congruente con el análisis filogenético de las cepas de referencia. Los resultados obtenidos refuerzan la importancia de continuar utilizando herramientas bioinformáticas para el análisis de cepas silvestres no solo del género *Trichoderma*, sino de hongos ascomicetos y basidiomicetos en distintas regiones geográficas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ahlawat, O. P., Billette, C. 2011. Positioning of introns in different laccase genes, a relevant tool for solving phylogenetic position ambiguity of *Volvariella volvacea* laccase genes. Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom *Biology and Mushroom Products* (ICMBMP7).

- [2] Arora, D. S., Sharma, R. K. 2010. Ligninolytic Fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 1760–88.
- [3] Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., Codón, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249–260.
- [4] Bento, I., Silva, C. S., Chen, Z., Martins, L. O., Lindley, P. F., Soares, C. M. 2010. Mechanisms underlying dioxygen reduction in laccases. Structural and modelling studies focusing on proton transfer. *BMC Structural Biology* 10:28.
- [5] Cambria, M. T., Marino, D. D., Falconi, M., Garavaglia, S., Cambria, A. 2010. Docking simulation and competitive experiments validate the interaction between the 2,5-xylydine inhibitor and *Rigidoporus lignosus* laccase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 27(4): 501–510.
- [6] Catalano, V., Vergara, M., Hauzenberger, J. R., Seiboth, B., Sarrocco, S., et al. 2011. Use a non-homologous end-joining-deficient strain (Δ -ku70) of the biocontrol fungus *Trichoderma virens* to investigate the function of the laccase gene *lcc1* in sclerotia degradation. *Current Genetics* 57: 13–23.
- [7] Cázares-García, S. V., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Vázquez-Marrufo, G. 2013. Structural and phylogenetic analysis of laccases from *Trichoderma*: a bioinformatic approach. *PLoS ONE* 8(1): e55295. Doi: 10.1371/journal.pone.0055295.
- [8] Chakroun, H., Mechichi, T., Martinez, M. J., Dhouib, A., Sayadi, S. 2010. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry* 45: 507–513.
- [9] Cordoba, C. D., Roncero, M. I. G. 2008. Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 98 (5): 509–519.
- [10] Dwivedi, U. N., Singh, P., Pandey, V. P., Kumar, A. 2011. Structure – function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68: 117–128.
- [11] Eggert, C., LaFayette, P. R., Temp, U., Eriksson, K. E. L., Dean, J. F. D. 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1766–72.
- [12] Enguita, F. J., Marçal, D., Martins, L. O., Grenha, R., Henriques, A. O., Lindley, P. F., Carrondo, M. A. 2004. Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (22): 23472–76.
- [13] Fernández, L. J., Stahl, U. 1996. Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. *Molecular Genetics and Genomics* 252: 539–551.
- [14] Gao, H., Chu, X., Wang, Y., Zhou, F., Zhao, K., Mu, Z., Liu Q (2013). Media optimization for laccase production by *Trichoderma harzianum* ZF-2 using

- response surface methodology. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(12): 1757–1764.
- [15] Ge, H., Gao, Y., Hong, Y., Zhang, M., Xiao, Y., *et al.* 2010. Structure of native laccase B from *Trametes* sp. AH28-2. *Acta Crystallographica* F66: 254–258.
- [16] Hakulinen, N., Andberg, M., Kallio, J., Koivula, A., Kruus, K., Rouvinen, J. 2008. A near atomic resolution structure of a *Melanocarpus albomyces* laccase. *Journal of Structural Biology* 162: 29–39.
- [17] Hakulinen, N., Kiiskinen, L. L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., Rouvinen, J. 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural and Molecular Biology* 9 (8): 601–605.
- [18] Hattori, M., Konishi, H., Tamura, Y., Konno, K., Sogawa, K. 2005. Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the Green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *Journal of Insect Physiology* 51: 1359 – 1365.
- [19] Hoegger, P. J., Navarro-González, M., Kilaru, S., Hoffman, M., Westbrook, E. D., Kües, U. 2004. The laccase gene family in *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Current Genetics* 45: 9–18.
- [20] Ito-Kuwa, S., Nakamura, K., Valderrama, B., Aoki, S., Vidotto, V., Osafune, T. 2008. Diversity of laccase among *Cryptococcus neoformans* serotypes. *Microbiology Immunology*. 50: 492–498.
- [21] Junghanns, C., Pecyna, M. J., Böhm, D., Jehmlich, N., Martin, C., von Bergen, M., Schauer, F., Hofrichter, M., Schlosser, D. 2009. Biochemical and molecular genetic characterization of a novel laccase produced by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84: 1095–05.
- [22] Kallio, J. P., Auer, S., Janis, J., Andberg, M., Kruus, K., Koivula, A., Rouvinen, J., Koivula, A., Hakulinen, N. 2009. Structure-function studies of a *Melanocarpus albomyces* laccase suggest a pathway for oxidation of phenolic compounds. *Journal of Molecular Biology* 392: 895–909.
- [23] Kallio, J. P., Gasparetti, C., Andberg M., Boer, H., Koivula, A., Kruus, K., Rouvinen, J., Hakulinen, N. 2011. Crystal structure of an ascomycete fungal laccase from *Thielavia arenaria* – common structural features of asco-laccases. *FEBS Journal* 278(13): 2283–95.
- [24] Kant, S. K., Chander, K. R. 2009. An evidence of laccases in archaea. *Indian Journal of Microbiology* 49: 142–150.
- [25] Krastanov, A. I., Gochev, V. K., Girova, T. D. 2007. Nutritive medium dependent biosynthesis of extracellular laccase from *Trichoderma* spp. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 13: 349–355.

- [26] Kumar, S., Phale, P., Durani, S., Wangikar, P. P. 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering* 83(4): 386–394.
- [27] Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331–371.
- [28] Lettera, V., Piscitelli, A., Leo, G., Birolo, L., Pezzella, C., Sannia, G. 2010. Identification of a new member of Pleurotus ostreatus laccase family from mature fruiting body. *Fungal Biology* 114: 724–730.
- [29] Levasseur, A., Saloheimo, M., Navarro, D., Andberg, M., Pontarotti, P., Kruus, K., Record, E. 2010. Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete *Trichoderma reesei*: a functional, phylogenetic and evolutionary study. *BMC Biochemistry*. 11: 32.
- [30] Litvintseva, A. P., Henson, J. M. 2002. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Applied and Environmental Microbiology* 68(3): 1305–11.
- [31] Martin, C., Pecyna, M., Kellner, H., Jehmlich, N., Junghanns, C., Benndorf, D., von Bergen, M., Schlosser, D. 2007. Purification and biochemical characterization of a laccase from the aquatic fungus *Myriocoonium* sp. UHH 1-13-18-4 and molecular analysis of the laccase-encoding gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 613–624.
- [32] Matera, I., Gullotto, A., Tilli, S., Ferraroni, M., Scozzafava, A., Briganti, F. 2008. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with *p*-toluate. *Inorganica Chimica Acta* 361: 4129–37.
- [33] McCaig, B. C., Meagher, R. B., Dean, J. F. D. 2005. Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 221: 619–636.
- [34] Melo, E. P., Fernandes, A. T., Durao, P., Martins, L. O. 2007. Insight into stability of CotA laccase from the spore coat of *Bacillus subtilis*. *Biochemical Society Transactions* 35(6): 1579–82.
- [35] Mikolasch, A., Schauer, F. 2009. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and *biomaterials*. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 82: 605–624.
- [36] Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., Yaropolov, A. I. 2007. “Blue” Laccases. Review. *Biochemistry (Moscow)* 72(10): 1136–50.
- [37] Mot, A. C., Silaghi-Dumitrescu, R. 2012. Laccases: Complex architectures for one-electron oxidation. *Biochemistry (Moscow)* 77(12): 1395–07.

- [38] Murphy, M. E. P., Lindley, P. F., Adman, E. T. 1997. Structural comparison of cupredoxin domains: domain recycling to construct proteins with novel functions. *Protein Science* 6: 761–770.
- [39] Nakamura, K., Kawabata, T., Yura, K., Go, N. 2003. Novel types of two-domain multi-copper oxidases: possible missing links in the evolution. *FEBS Letters* 553: 239–244.
- [40] Pezzella, C., Autore, F., Giardina, P., Piscitelli, A., Sannia, G., Faraco, V. 2009. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Current Genetics* 55: 45–57.
- [41] Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (40): 37663–69.
- [42] Pöggeler, S. 2011. Evolution of multicopper oxidase genes in coprophilous and non-coprophilous members of the order sordariales. *Current Genomics* 12: 95–103.
- [43] Pokorný, R., Vargovič, P., Hölker, U., Janssen, M., Bend, J., Hudecová, D., Varečka, L. 2005. Developmental changes in *Trichoderma viride* enzymes abundant in conidia and the light-induced conidiation signalling pathway. *Journal of Basic Microbiology* 45(3): 219–229.
- [44] Prasad, N. K., Vindal, V., Narayana, S. L., Ramakrishna, V., Priyaranjan, K. S., Srinivas, M. 2011. *In silico* analysis of *Pycnoporus cinnabarinus* laccase active site with toxic industrial dyes. *Journal of Molecular Modeling* doi: 10.1007/s00894-011-1215-0.
- [45] Quintanar, L., Stoj, C., Taylor, AB., Hart, P. J., Kosman, D. J., Solomon, E. I. 2007. Shall we dance? How a multicopper oxidase chooses its electron transfer partner. *Accounts of Chemical Research* 40: 445–452.
- [46] Quintanar, L., Stoj, C., Wang, T. P., Kosman, D. J., Solomon, E. I. 2005. Role of aspartate 94 in the decay of the peroxide intermediate in the multicopper oxidase Fet3p. *Biochemistry* 44: 6081–6091.
- [47] Rodgers, C. J., Blanford, C. F., Giddens, S. R., Skamnioti, P., Armstrong, F. A., Gurr, S. J. 2009. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends in Biotechnology* 28(2): 63–72.
- [48] Rodríguez-Rincón, F., Suarez, A., Lucas, M., Larrondo, L. F., de la Rubia, T., Polaina, J., Martínez, J. 2010. Molecular and structural modeling of the *Phanerochaete flavidobrunnea* extracellular laccase reveals its ferroxidase structure. *Archives of Microbiology* 192: 883–892.
- [49] Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K., Lin, F. H. 2008. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry* 43: 736–742.

- [50] Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. 2009. Redox-mediated decolorization of recalcitrant textile dyes by *Trichoderma harzianum* WL1 laccase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 1733–41.
- [51] Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. 2010. Deployment of *Trichoderma harzianum* WL1 laccase in pulp bleaching and paper industry effluent treatment. *Journal of Cleaner Production* 18: 799 – 806.
- [52] Saloheimo, M., Pakula, T. M. 2012. The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Microbiology* 158: 46–57.
- [53] Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- [54] Schuster, A., Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 87: 787–799.
- [55] Shapiro, M. B., Senepathy, P. 1987. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Research* 15(17): 7155–74.
- [56] Silva, C. S., Durão, P., Fillat, A., Lindley, P. F., Martins, L. O., Bento, I. 2012. Crystal structure of the multicopper oxidase from the pathogenic bacterium *Campylobacter jejuni* CGUG11284: characterization of a metallo-oxidase. *Metallomics* 4: 37–47.
- [57] Solomon, E. I., Sundaram, U. M., Machonkin, T. E. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* 96: 2563–03.
- [58] Tetsch, L., Bend, J., Hölker, U. 2006. Molecular and enzymatic characterization of extra- and intracellular laccases from the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila*. *Antonie van Leeuwenhoek* 90: 183–194.
- [59] Uzan, E., Nousiainen, P., Balland, V., Sipila, J., Piumi, F., Navarro, D., Asther, M., Record, E., Lomascolo, A. 2009. High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporuj s coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications. *Journal of Applied Microbiology* 108: 2199–13.
- [60] Vite-Vallejo, O., Palomares, L. A., Dantán-González, E., Ayala-Castro, H. G., Martínez-Anaya, C. *et al.* 2009. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology* 45: 233–239.
- [61] White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications. Edited by Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press, San Diego California, USA. pp. 315–322.
- [62] Xu, F., Berka, R. M., Wahleithner, J. A., Nelson, B. A., Shuster, J. R., Brown, S. H., Palmer, A. E., Solomon, E. I. 1998. Site-directed mutations in fungal

laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochemical Journal* 334: 63–70.

- [63] Zhu, X., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A., Williamson, P. R. 2001. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infection and Immunity*. 69(9): 5589–96.
- [64] Zhukova, Y. N., Xhukhlistova, N. E., Lyashenko, A. V., Morgunova, E. Y., Zaitsev, V. N., Mikhaïlov, A. M. 2007. Comparative analysis of spatial organization of laccases from *Cerrena maxima* and *Coriolus zonatus*. *Structure of Macromolecular Compounds* 52(5): 826–865.

FIGURA SUPLEMENTARIA

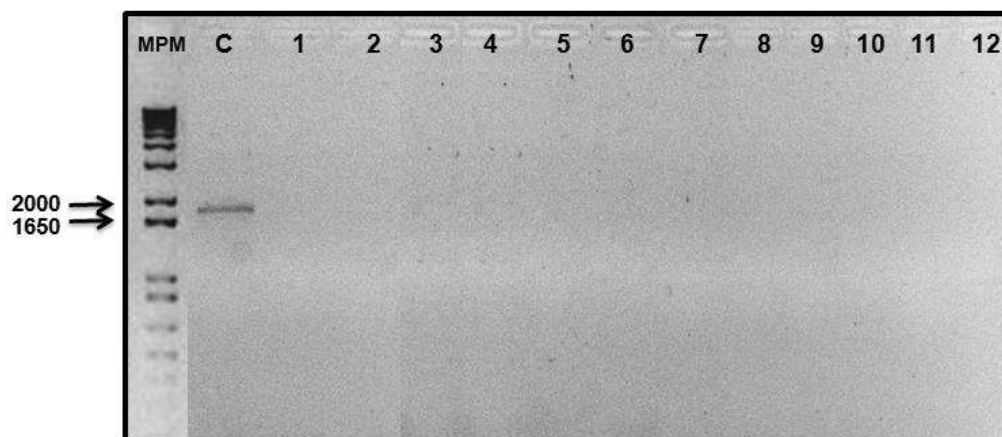


Figura S1. Especificidad de los oligonucleótidos LacT-F y LacT-R. **MPM**, marcador de peso molecular; **C**, control, *T. atroviride*; **1**, *N. crassa*; **2**, *F. oxysporum*; **3**, *M. circinelloides*; **4**, *S. rolfisii*; **5**, *R. solanii*; **6**, *P. brasiliensis*; **7**, *P. janthinellum*; **8**, *P. maculiformans*; **9**, *A. bisporus*; **10**, *P. ostreatus*; **11**, *T. villosa*; **12**, *Amanita* sp.

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria S1. Porcentaje de identidad entre los genes de lacasa de *Trichoderma* spp.

	<i>Ta_54145</i>	<i>Tglac1</i>	<i>Tklac1</i>	<i>Tas_154312</i>	<i>Tvilac1</i>	<i>Tvlac1A</i>	<i>Tvlac1B</i>	<i>Tvlac1</i>	<i>Tv_48916</i>
<i>Talac1</i>	100	89.7	89.7	87.4	89.4	89.4	89.5	89.7	81.6
<i>Ta_54145</i>		89.7	89.7	87.4	89.4	89.4	89.5	89.7	81.6
<i>Tglac1</i>			95.0	85.4	91.8	97.0	93.1	93.0	79.8
<i>Tklac1</i>				86.0	90.9	93.6	93.8	93.7	80.4

<i>Tas_154312</i>	84.6	84.0	84.4	84.3	81.5
<i>Tvilac1</i>		91.3	91.6	91.4	79.2
<i>Tvlac1-A</i>			99.3	98.5	78.9
<i>Tvlac1-B</i>				99.0	79.0
<i>Tvlac1</i>					79.1
<i>Tv_48916</i>					

Tabla suplementaria S2. Identidad (%) de las secuencias de lacasa de las especies de *Trichoderma* spp con respecto a lacasas de hongos Ascomicetos depositadas en la base de datos de NCBI Gean Bank.

	IDENTIDAD						
	<i>Talac1</i>	<i>Tglac1</i>	<i>Tvlac1</i>	<i>Tvlac1A</i>	<i>Tvlac1B</i>	<i>Tvilac1</i>	<i>Tklac1</i>
<i>T. terrestris</i>	1067/1590 (67%)	1065/1579 (67%)	1050/1569 (67%)	1051/1570 (67%)	1050/1569 (69%)	1058/1569 (67%)	1052/1582 (66%)
<i>N. haematococca</i>	436/600 (73%)	506/732 (69%)	429/602 (71%)	429/602 (71%)	430/602 (71%)	508/731 (69%)	508/732 (69%)
<i>V. albo-atrum</i>	430/592 (73%)	395/543 (73%)	431/592 (73%)	408/564 (72%)	412/567 (73%)	431/598 (72%)	422/589 (72%)
<i>F. oxysporum</i>	428/600 (71%)	736/1101 (67%)	431/600 (72%)	428/600 (71%)	426/600 (71%)	736/1110 (66%)	737/1104 (67%)
<i>G. zeae</i>	401/556 (72%)	429/604 (71%)	509/748 (68%)	480/696 (69%)	466/675 (69%)	514/745 (69%)	375/527(7 1%)
<i>F. fujikuroi</i>	677/1019 (66%)	740/1104 (67%)	1004/1528 (66%)	1004/1529 (66%)	999/1529 (65%)	751/1114 (67%)	1006/1533 (66%)

Tabla suplementaria S3. Identidad (%) de las secuencias de lacasa de las especies de *Trichoderma* spp con respecto a las casas de hongos Ascomicetos y Basidiomicetos.

PROTEINA	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
1 Yil_340748005	34.7	34.8	34.5	34.1	33.4	34.4	34.9	34.7	34.7	34.4	33.2	32.7	32.9	34.8	32.8	27.8	32.6	36.0	32.0	32.8	33.1
2 CsuL_31088841	36.3	36.4	35.9	36.1	34.9	36.5	36.6	35.9	35.9	35.4	35.1	35.2	33.2	34.3	34.9	31.3	35.6	35.3	33.1	34.3	34.7
3 Pcn_3128388	37.0	36.9	36.3	36.9	36.0	36.9	36.2	36.3	37.5	36.7	35.2	35.6	34.0	34.6	34.8	32.3	35.7	36.6	34.0	35.6	33.9
4 Tve_15778441	38.2	38.4	37.6	38.1	36.4	38.5	38.1	38.1	38.1	37.9	36.8	36.2	37.1	34.1	35.0	36.5	33.0	36.8	39.1	34.2	35.4
5 Tpu_20270769	36.7	38.9	38.1	38.4	36.6	38.2	38.3	38.2	38.2	37.6	36.0	36.2	34.4	35.2	36.5	33.0	37.6	38.6	35.3	35.8	35.3
6 Tsp_6318610	36.7	36.6	35.6	35.9	34.6	36.0	36.3	36.2	36.1	35.2	34.4	35.6	33.6	34.8	36.0	32.2	35.5	37.5	34.7	35.4	34.6
7 Ove_2598856	37.7	37.9	37.3	37.7	36.7	37.7	37.3	37.2	37.7	37.7	36.3	35.8	36.3	34.0	34.7	36.3	32.4	36.3	37.7	35.2	35.8
8 Pg_AFI176231.1	38.0	38.1	37.6	37.3	36.3	37.6	37.7	37.9	37.9	35.9	36.3	37.1	34.2	35.7	36.6	33.4	36.1	38.6	34.9	36.4	34.4
9 Flr_119416758	38.3	38.1	36.5	37.1	36.8	36.7	36.8	36.9	37.2	36.9	36.3	37.3	34.7	35.6	35.8	32.2	36.4	38.7	34.9	35.6	35.1
10 Ccl_4838345	37.4	37.3	37.4	37.3	36.2	37.3	37.5	37.6	37.6	36.6	34.9	33.9	34.2	34.6	34.2	32.3	35.8	35.7	34.2	33.1	32.3
11 Led_18146853	36.0	36.0	36.5	36.5	35.7	35.3	36.0	36.2	36.0	35.9	34.7	35.8	34.6	34.4	32.7	30.1	34.1	34.8	33.2	34.3	34.1
12 Cga_12484398	37.4	37.4	37.2	37.4	36.8	37.6	37.5	37.6	37.6	35.9	36.0	36.5	34.3	35.6	36.4	32.5	36.3	37.5	34.7	34.8	34.4
13 Pos_21693018	36.9	37.4	36.7	36.5	35.9	36.1	36.6	36.5	36.8	34.8	34.0	36.0	33.8	35.3	34.9	31.6	35.3	37.1	34.7	32.9	35.7
14 Ncr_07920.7	40.1	40.1	39.7	39.5	39.1	39.3	39.8	39.7	39.7	38.9	36.9	40.5	39.3	39.2	38.6	34.6	38.9	41.9	38.3	39.2	37.9
15 Sma_03042	38.2	38.3	38.5	37.9	38.0	37.5	38.1	38.2	38.1	37.7	37.2	38.4	39.0	38.3	35.9	33.6	37.0	40.0	37.8	36.9	36.7
16 Pan_6_7880	40.2	40.3	39.6	39.1	39.3	39.5	39.4	38.2	39.3	38.7	39.3	39.6	38.5	38.5	38.2	34.0	38.9	43.0	39.4	39.5	38.2
17 Ta_40409	38.2	39.3	37.7	38.0	38.9	38.0	38.6	38.8	39.0	40.1	41.6	40.0	38.2	37.7	38.1	34.1	39.8	40.4	38.7	39.7	37.3
18 Tas_68620	38.1	39.0	37.4	37.7	39.2	37.7	38.5	38.8	39.0	38.8	40.7	38.9	37.8	38.2	38.1	33.7	39.6	40.0	37.7	39.1	37.4
19 Th_539081	38.8	38.8	37.9	37.8	38.8	38.0	37.3	37.2	37.3	38.4	39.2	39.6	39.1	38.2	38.3	34.8	38.6	37.3	40.1	39.7	37.2
20 Ncr_00526.7	39.8	39.9	38.1	39.0	39.0	39.1	39.8	39.6	39.9	39.6	41.8	38.9	38.6	39.1	41.8	35.2	39.9	41.2	39.7	40.7	38.5
24 Sma_01222	40.3	40.4	39.0	39.5	39.6	39.3	40.0	39.8	39.7	40.0	42.1	41.0	40.3	38.9	42.2	36.8	40.7	42.1	40.0	40.8	39.1
25 Pan_1_15470	40.5	40.6	39.4	39.3	40.8	39.4	40.3	40.4	40.3	40.4	40.7	41.3	38.3	37.9	40.6	35.4	40.7	40.6	38.6	40.4	38.8
26 Cgl_06172.1	39.3	39.4	38.5	38.3	39.0	38.3	39.0	39.3	39.3	39.5	41.7	40.5	38.3	37.4	39.3	34.8	41.1	40.0	37.4	39.2	38.6
27 Hac_63146071	39.1	39.2	38.9	39.4	37.5	39.0	39.6	39.7	40.0	38.5	39.6	39.7	40.0	38.5	37.0	38.5	33.5	37.9	39.2	37.6	38.8
28 Sma_08572	34.4	34.4	32.6	33.1	33.6	33.0	33.1	33.0	33.0	34.4	33.7	35.0	33.6	33.5	33.7	29.1	33.8	35.3	34.1	34.7	35.8
29 Talact1	100	89.7	89.7	89.7	87.4	89.4	89.4	89.5	89.7	81.6	61.7	44.9	45.2	47.1	43.4	40.1	44.6	45.9	44.2	44.0	43.6
30 Ta_54145			89.7	89.7	85.4	85.4	89.4	89.4	93.0	79.8	60.6	44.4	44.2	45.7	41.5	39.0	42.2	44.3	42.9	43.1	42.6
31 Tglact1				95.0	86.0	86.0	91.8	97.0	93.1	93.0	79.0	60.7	64.0	44.2	45.7	39.0	42.2	44.3	42.9	43.1	42.2
32 Ttlact1							84.6	84.0	93.8	93.7	80.4	61.3	44.4	44.3	44.2	39.5	42.5	44.2	43.2	42.8	42.5
33 Tas_154312							84.6	84.0	84.4	84.3	81.5	61.4	44.5	44.2	46.6	42.1	38.7	42.9	44.5	43.0	43.0
34 Tvlact1								91.3	91.3	91.6	79.2	60.4	44.7	44.0	44.4	41.5	38.7	42.8	43.9	43.5	42.8
35 Tvlact1-A									99.3	98.5	78.9	60.7	44.1	43.6	46.0	42.1	38.7	42.8	44.9	43.1	43.0
36 Tvlact1-B										99.0	79.0	60.7	44.0	43.7	45.8	42.0	38.5	43.1	44.9	43.1	43.1
37 Tvlact1											79.1	61.0	44.2	43.7	46.1	42.1	38.7	43.1	45.0	43.5	43.2
38 Tv_48916											61.9	45.2	44.4	44.4	47.3	43.3	40.4	44.6	45.3	42.5	42.2
39 Fox_152013643																					45.5
40 Psp_EU267174.1																					46.1
41 Pfr_189192569																					44.0
42 Ade_292653487																					44.1
43 Cgl_03552.1																					48.5
44 Sma_08326																					44.1
45 Pan_7_4200																					50.5
46 Cla_12862765																					49.5
47 Ncr_09279.7																					52.1
48 Pan_5_4660																					52.1
49 Ncr_05604.7																					51.4
																					63.7
																					51.4
																					52.0

En negrilla se encuentran los porcentajes de identidad de los genes de lacasa de *Trichoderma* spp. con respecto a los genes de lacasa de hongos ascomicetos y basidiomicetos.

CAPÍTULO IV

Artículo IV

En el presente artículo en preparación se reporta la capacidad de la cepa de referencia IMI 206040 de *T. atroviride* para secretar lacasa extracelular bajo diferentes condiciones de cultivo. Se evaluó el efecto de la adición de CuSO_4 y la presencia de hongos fitopatógenos en la inducción de la transcripción del gen de lacasa extracelular. Trabajo para someter en la revista internacional indizada *Current Genetics*.

PERFIL ENZIMÁTICO Y TRANSCRIPCIONAL DE LA ACTIVIDAD DE LACASA EXTRACELULAR EN *Trichoderma atroviride*

Saila Viridiana Cázares-García^a, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas^b, Alfredo Herrera-Estrella^c, Gerardo Vázquez-Marrufo^a

^aCentro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

^bDivisión de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ^cLaboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO, CINVESTAV-Irapuato). E-mail: gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx

RESUMEN

La actividad de lacasa extracelular se ha determinado en cepas silvestres de *Trichoderma* spp., pero no en cepas de referencia cuyo genoma está disponible. La cepa IMI 206040 de *T. atroviride* fue capaz de decolorar/oxidar *in vitro* distintos sustratos fenólicos indicadores de la actividad de lacasa extracelular, particularmente el Índigo Carmín, el ácido tánico y el ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)). No se detectó actividad de lacasa extracelular en cultivos líquidos en medio de caldo de extracto de malta, pero se indujo la actividad añadiendo al medio asparagina (1% w/v), guayacol (1 mM), rastrojo de sorgo molido (2% w/v), celulosa (1% w/v), ácido tánico (1% w/v), Tween 80 (1 mM) y CuSO₄ (100 μM), obteniéndose actividades máximas de 61.11, 162.22, 296.66, 572.91, 3804.16, 4925.55, 8759.25 mU/mL, respectivamente. La región regulatoria del único gen que codifica para la actividad de lacasa extracelular (*Talac1*) en *T. atroviride* presenta elementos de regulación en *cis* característicos de lacasas fúngicas, incluyendo motivos de respuesta a metales (MREs, ACE₁), a xenobióticos (XREs), a estrés (STRES) y a micoparasitismo (MYC). El CuSO₄ incrementó significativamente los niveles de transcrito del gen *Talac1* respecto a la condición basal. Las confrontaciones *in vitro*

de *T. atroviride* contra hongos fitopatógenos mostraron resultados contrastantes en relación a los niveles de transcrito del gen *Talac1* conforme avanza el tiempo de confrontación, disminuyendo en presencia de *Rhizoctonia solani*, sin variaciones contra *Sclerotium rolfsii* e incrementando en el co-cultivo con *Fusarium oxysporum*; lo que sugiere una respuesta transcripcional fitopatógeno-específica. La transcripción del gen *Talac1* se incrementa cuando *T. atroviride* se confronta contra sí mismo, lo que indica una respuesta asociada a densidad celular (*quorum sensing*).

Palabras clave: *Trichoderma atroviride*, lacasa extracelular, control transcripcional, micoparasitismo, CuSO₄.

INTRODUCCIÓN

Las lacasas (benzenediol:oxygen oxidoreductases, EC 1.10.3.2) son Multicobre Oxidasas (MCOs) que catalizan la oxidación monoelectrónica de polifenoles, aminas aromáticas, hidroxindoles, benzenetioles y algunos iones inorgánicos, utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones y reduciéndolo a agua (Morozova *et al.* 2007). Las lacasas son enzimas comunes en la naturaleza y las funciones fiseoecológicas que llevan a cabo dependen de su origen y de sus propiedades bioquímicas y estructurales (Giardina *et al.* 2010). En los hongos, la actividad extracelular de lacasa se ha relacionado a la depolimerización de la lignina, a procesos de patogénesis e interacciones competitivas y a mecanismos de defensa contra compuestos antimicrobianos de hongos y plantas (Baldrian 2006). Las lacasas fúngicas poseen baja especificidad por sustrato y exhiben amplios potenciales redox, propiedades que han sido aprovechadas para su aplicación en la delignificación y blanqueo de pulpa Kraft, en la remoción de colorantes, pesticidas, explosivos e hidrocarburos policíclicos aromáticos, en la síntesis de biocombustibles y en la fabricación de biosensores (Giardina *et al.* 2010). Dichas aplicaciones biotecnológicas han promovido el estudio de las características bioquímicas, genético-moleculares y funcionales de las lacasas provenientes de diversas especies fúngicas (Chakroun *et al.* 2010, Catalano *et al.* 2011).

En general, una misma especie fúngica produce más de una isoenzima de lacasa. El número de isoenzimas varía en cada especie y son el resultado de la presencia y expresión de múltiples genes de lacasa en el genoma del hongo (Tamayo-Ramos *et al.* 2011). También se han reportado isoformas que provienen del mismo gen y que difieren entre sí debido a *splicing* alternativo o modificaciones postraduccionales (Rühl *et al.* 2013). En los hongos, la síntesis y secreción de las isoenzimas de lacasa está influenciada por factores como los niveles de nutrientes, las condiciones de cultivo, el estado de desarrollo del hongo y por la adición de diferentes inductores al medio de cultivo (Piscitelli *et al.* 2011). En éste sentido, se ha evaluado la presencia de distintas fuentes de carbono y nitrógeno (Ranka y Chattoo 2011), compuestos aromáticos relacionados con la lignina como guayacol, ácido ferúlico y 2,5-xilidina (Hou *et al.* 2004), iones metálicos como Cu^{+2} , Mn^{+2} o Fe^{+2} (Saparrat *et al.* 2010) y en procesos de interacción con otros organismos (Cordoba y Roncero 2008). Los efectos observados difieren entre especies y entre isoenzimas de una misma especie. Estas respuestas se han relacionado con la presencia diferencial de elementos de regulación en *cis* en las regiones promotoras de los genes de lacasa (Pezzella *et al.* 2009). El estudio de la regulación de la expresión de los genes de lacasa es de utilidad tanto para determinar el papel fisiológico de las isoformas encontradas en un mismo organismo, como para incrementar la producción de lacasas nativas con fines biotecnológicos.

El hongo ascomiceto filamentoso *Trichoderma atroviride* (teleomorfo *Hypocrea atroviridis*) es un organismo de vida libre encontrado comúnmente en suelos, raíces de plantas y ambientes foliares, en donde participa activamente en la degradación del material lignocelulósico y en el micotrofismo de hongos patógenos de plantas (Dodd *et al.* 2003). La habilidad de *T. atroviride* para antagonizar, parasitar y aniquilar a otros hongos ha sido aprovechada para su uso como agente de control biológico (Harman *et al.* 2004). Además, se ha utilizado en la producción de antibióticos, aromas y enzimas hidrolíticas y oxidativas con aplicaciones en la industria alimenticia, textil y en biorremediación (Monte 2001, Schuster y Schmoll 2010, Chakroun *et al.* 2010). La capacidad de *T. atroviride* para producir lacasas extracelulares ha sido escasamente investigada, no obstante se ha determinado en

medio de cultivo basal (Gochev y Krastanov 2007) y en cultivos suplementados con ácidos húmicos, lignito (Hölker *et al.* 1999) y CuSO_4 (Chakroun *et al.* 2010). Aunado a ello, se ha reportado la purificación y caracterización bioquímica y fisicoquímica de la lacasa extracelular proveniente de la cepa CTM 10476 de *T. atroviride* (Chakroun *et al.* 2010). La utilidad biotecnológica de dicha enzima ha quedado documentada dada la alta capacidad de oxidación de los compuestos aromáticos catecol y *o*-cresol presentes en aguas residuales (Chakroun *et al.* 2010). Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó la presencia de genes de lacasa en *Trichoderma* spp. (Cázares-García *et al.* 2013). El análisis *in silico* del genoma de la cepa IMI 206040 de *T. atroviride* reveló la presencia de dos genes de lacasa, uno de los cuales codifica para la actividad intracelular y el otro para la actividad extracelular (Cázares-García *et al.* 2013).

En el presente trabajo se evaluó la actividad de lacasa extracelular en la cepa IMI 206040 de *T. atroviride* bajo diferentes condiciones de cultivo y se reportan los niveles de expresión del gen que codifica para la lacasa extracelular tanto en estado basal como inducido con CuSO_4 . Además, se asoció la actividad de lacasa extracelular al proceso de micoparasitismo, permitiendo establecer una función fisiológica de la lacasa extracelular dentro del género *Trichoderma*. Se comparan los resultados obtenidos con trabajos previamente descritos para *Trichoderma* spp. y otros grupos taxanómicos de hongos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas empleadas y medios de cultivo

La cepa de estudio fue IMI 206040 de *T. atroviride*. Para evaluar la participación de la lacasa extracelular de dicha cepa en ensayos de micoparasitismo *in vitro* se utilizaron los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. La cepa IMI 206040 de *T. atroviride* fue cultivada en medio mínimo Vogel (MMV) para el mantenimiento del micelio vegetativo y para la generación de inóculos. La solución stock (50X) de MM está compuesta por (g/L): $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 150; KH_2PO_4 , 250; NH_4NO_3 , 100; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5; biotina (5 mg/100 mL etanol al 50%), 5 mL; solución de oligoelementos, 5 mL. La solución de

oligoelementos contiene (g/0.1 L): ácido cítrico·2H₂O, 5; ZnSO₄·H₂O, 5; FeCl₃·6H₂O, 1; CuSO₄·5H₂O, 0.25; MnCl₂·4H₂O, 0.072; H₃BO₃, 0.05; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.05. Para la siembra de la cepa, el stock se diluyó en agua destilada hasta obtener una concentración final 1X y se adicionó 1.5% de glucosa y agar bacteriológico (15 g/L). El Caldo Extracto de Malta (CEM) se utilizó para la determinación cuantitativa de la actividad de lacasa extracelular. El CEM consta de 1.0% de glucosa y 2% de extracto de malta. El medio de preservación y cultivo de los hongos *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfisii* fue Agar Papa Dextrosa (PDA). Los medios se esterilizaron a 121 °C (15 lb/in²) por 15 minutos.

Ensayos de decoloración y oxidación en placa

La determinación cualitativa de la producción de lacasa extracelular por parte *T. atroviride* IMI 206040 se llevó a cabo en placas Petri (90 mm de diámetro) que contenían 25 mL de MMV suplementado con los colorantes Naranja de Metilo (NM), Azul Directo 71 (AD-71), Azul Ácido 1 (AA-1), Chicago Sky Blue 6B (CSB-6B) del grupo de los colorantes azo, Índigo Carmín (IC, indigoide), Azul Remazol Brillante-R (RBBR, antraquinona) y Fucsina Ácida (FA, trifenilmetano), todos a una concentración de 250 mg/L (Nyanhongo y col., 2002). La solución stock de cada uno de los colorantes se esterilizó por filtración a través de membranas Millipore de 0.45 µm de poro y se adicionó al medio de cultivo después de que éste se esterilizó por autoclave. También se emplearon los sustratos guayacol y ácido tánico a una concentración de 0.01 y 0.04%, respectivamente (Kiiskinen y col., 2004). El guayacol se disolvió por separado en 20 mL de H₂O destilada y se adicionó al medio de cultivo al momento de la esterilización por autoclave. El ácido tánico se disolvió en 50 mL de H₂O destilada y se esterilizó por separado antes de su adición al medio de cultivo. Las placas fueron inoculadas con precultivos en fase logarítmica de crecimiento, los inóculos se obtuvieron del borde de la colonia con un sacabocados de 6 mm de diámetro. El inóculo se colocó en el centro de la placa y en todos los casos se incubó en oscuridad a 28° C. El crecimiento micelial se determinó cada 12 horas, mediante la medición del diámetro colonial. La tasa de crecimiento se determinó mediante la fórmula $T_c = \text{crecimiento final} - \text{crecimiento inicial} / \text{tiempo de incubación}$. El grado de

decoloración se determinó visualmente mediante la formación de un halo de decoloración alrededor del micelio en crecimiento; la oxidación del guayacol se registró por la formación de un halo café-rojizo en el medio de cultivo; y la reacción positiva con ácido tánico se reveló con la aparición de una zona café oscuro (Kiiskinen *et al.* 2004; Nyanhongo *et al.* 2002). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Cultivo en medio líquido

Las cepa IMI 206040 de *T. atroviride* fue cultivada en medio líquido para determinar el crecimiento y los niveles de actividad de lacasa extracelular en estado basal e inducido. Se utilizaron inóculos de micelio obtenidos de la manera previamente descrita. Las cinéticas de crecimiento y actividad en condiciones basales se iniciaron adicionando tres inóculos en matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 25 mL de CEM. Los estudios de inducción enzimática se llevaron a cabo en ensayos separados mediante la adición de 1% de asparagina, 1% de celulosa, 1% de ácido tánico, 1 mM de guayacol, 1 mM de Tween 80, 100 μm de CuSO_4 y 0.5 g de rastrojo de sorgo (*Sorghum* sp.) por cada 25 mL de CEM. El ácido tánico se disolvió en 50 mL de H_2O destilada y se esterilizó por separado antes de su adición al medio de cultivo. La asparagina y el CuSO_4 se disolvieron en 20 mL de H_2O destilada y se esterilizaron por filtración para su adición al medio de cultivo. La celulosa, el guayacol, el Tween 80 y el rastrojo de sorgo se agregaron al CEM al momento de la esterilización por autoclave. El rastrojo fue macerado y esterilizado dos veces antes de su uso. Los matraces inoculados de la manera previamente descrita se incubaron a 28 °C y 120 rpm de agitación. En todos los casos se tomaron muestras cada 24 horas para determinar el peso seco, la cuantificación de proteína y la actividad de lacasa extracelular. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Actividad de lacasa extracelular y cuantificación de proteína

La actividad de lacasa extracelular se determinó espectrofotométricamente utilizando ABTS como sustrato (Nagai *et al.* 2002). La mezcla de reacción contenía 800 μL de buffer Macllvaine pH 4.0 (0.1 M de ácido cítrico, 0.2 M de fosfato de sodio dibásico),

100 μL de ABTS 10 mM y 100 μL de la fase acuosa, obtenida del medio de cultivo filtrado. Las muestras se incubaron a 30° C por 20 min y la reacción se detuvo adicionando 100 μL de ácido tricloroacético al 5% (v/v en agua). La formación del radical catiónico ABTS⁺ se midió por el incremento de la absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de ABTS a 30 °C en 1 min. La proteína total se determinó mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) utilizando albúmina bovina como estándar (Bradford 1976).

Ensayos de antagonismo

La habilidad de *T. atroviride* IMI 206040 para antagonizar a los hongos *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfsii* se evaluó en placas Petri (90 mm de diámetro) que contenían 25 mL de MM recubierto con una membrana estéril de celofán (grado alimenticio) de acuerdo a Reithner *et al.* (2011). Discos de 6 mm de diámetro de precultivos en fase exponencial de crecimiento del antagonista y de cada patógeno se colocaron en lados opuestos de la placa, a una distancia de 7.0 cm. Cada cultivo con una combinación antagonista/patógeno se realizó por triplicado. Los cultivos se incubaron a 28 °C en oscuridad. El radio de la colonia de cada patógeno se determinó en dirección al antagonista (Ra) dos veces al día, hasta el contacto entre ambas colonias (Matarese *et al.* 2012). Como control se utilizaron cultivos duales *T. atroviride* – *T. atroviride* y cultivos individuales de cada hongo. Los valores obtenidos se utilizaron para construir curvas de crecimiento y para determinar las tasas de crecimiento y el porcentaje de inhibición.

Expresión del gen de lacasa

La expresión del gen de lacasa extracelular de *T. atroviride* IMI 206040 se evaluó en cultivos inducidos con CuSO_4 y a partir de los ensayos de confrontación directa mediante RT-PCR semicuantitativa. Las muestras de los cultivos inducidos con CuSO_4 se obtuvieron cada 24 h por filtración con papel Whatman No. 2. El micelio se enjuagó con H_2O destilada desionizada estéril, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, se maceró en un mortero frío y estéril y se almacenó en un tubo de

microcentrífuga de 1.5 mL a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Los ensayos de confrontación directa se realizaron en placas Petri (90 mm de diámetro) que contenían 25 mL de MM recubierto con una membrana estéril de celofán. Antes de la inoculación se realizaron cortes al celofán para facilitar la colecta y evitar dañar el micelio de *T. atroviride*. Discos de 6 mm de diámetro de precultivos en fase exponencial de crecimiento del antagonista y de cada patógeno se colocaron en lados opuestos de la placa, a 6.8 cm de distancia uno del otro. Se cultivaron 8 placas para cada combinación antagonista/patógeno por estado de interacción. Las placas se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. El micelio de *T. atroviride* se cosechó bajo un haz de luz roja en tres diferentes estados de interacción: i) antes del contacto (AC): cuando los micelios del antagonista y del patógeno se encontraban a 5 mm de distancia; ii) durante el contacto (DC); y iii) sobre crecimiento (SC): cuando la colonia de *T. atroviride* sobrecreció 5 mm a la colonia del patógeno. Como control se utilizaron cultivos duales *T. atroviride* – *T. atroviride*. Los micelios de *T. atroviride* se cosecharon lo más rápido posible, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, se maceraron en un matraz estéril y frío para obtener un polvo fino y se almacenaron en tubos microcentrífuga de 1.5 mL a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción del ARN.

Extracción de ARN y transcripción reversa

El ARN total se extrajo del micelio congelado adicionando de acuerdo al protocolo descrito por Jones *et al.* (1985). Todas las muestras fueron tratadas con DNAsa I (Invitrogen, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La calidad del ARN se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % adicionados con buffer MOPS (20 mM de MOPS pH 7, 8 mM de acetato de sodio y 1 mM de EDTA pH 8) y 2.2 M de formaldehído. Los ácidos nucleicos se tiñeron con Bromuro de Etidio (BrEt) (Sambrook y Russell 2001). La cuantificación de la concentración del ARN se realizó en un NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo-Scientific, USA). La pureza del ARN se estimó mediante la relación 260 nm/ 280 nm, solo las muestras que presentaron valores entre 1.8 y 2.1 se utilizaron para la síntesis de cDNA. La síntesis de cDNA se llevó a cabo con el kit SuperScript II Reverse Transcriptase

(Invitrogen, USA) a partir de 2 µg de ARN siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando una mezcla de oligos reversos para la captura de los ARN mensajeros de interés.

Diseño de oligonucleótidos y PCR semicuantitativa

Los primers utilizados en PCR semicuantitativa se diseñaron en base a la secuencia del gen que codifica para la actividad extracelular de lacasa *sensu stricto* (Cázares-García *et al.* 2013) depositado en la base de datos del genoma de la cepa IMI 206040 de *T. atroviride* (<http://genome.jgi-psf.org/Triat2/Triat2.home.html>) y posee el número de acceso 54145 (*Talac1*). Para la amplificación se utilizaron los primers RT-TaLac1-F (5'-ACATTGCAATCGGACAGCGCTACG-3') y RT-TaLac1-R (5'-TTATCTGTATACGAGTAGCCCGTC-3'), los cuales poseen una T_m de 66.9 y 63.6 °C, respectivamente. Con la finalidad de incrementar la especificidad de la amplificación, el primer RT-TaLac1-F se diseñó en los límites de los exones 1 y 2 del gen de lacasa *Talac1*. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 25 µL. Para todas las muestras la concentración de la mezcla de reacción fue la misma: 20 mM de Buffer para PCR Tris-HCl pH 8.4, 500 mM de KCl; 1.5 mM de MgCl₂; 0.2 mM de cada dNTP; 0.2 µM de cada oligonucleótido; 0.04 U de *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen, USA); 1 µg de cDNA; el volumen final se ajustó con H₂O DEPC a 25 µL. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Palm-Cycler™ Gradient thermal cycling (R Corbett Life Science, USA) mediante el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 20 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, alineamiento a 66 °C por 15 segundos y extensión a 72 °C por 1.0 minuto, con una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de amplificación obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 2 % teñidos con BrEt (Sambrook y Russell 2001). La intensidad de las bandas se determinó en un fotodocumentador Bio-Rad ChemiDoc™ XRS+ System. Los valores de intensidad de *Talac1* se normalizaron

con la señal del gen GPD que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella 2007).

Análisis bioinformático

En el genoma reportado de *T. atroviride* se localizó la secuencia del gen *Talac1* depositado en la base de datos con el número de acceso 54145 (ver capítulo 2). A partir del codón de inicio de la transcripción se extrajeron 1550 pb de la región río arriba y se analizó visualmente para la búsqueda de elementos en *cis* involucrados en la regulación de la transcripción.

Compuestos químicos

Los compuestos Naranja de Metilo, Azul Directo 71, Azul Ácido 1, Chicago Sky Blue 6B, Índigo Carmín, Azul Remazol Brillante R, Fucsina Ácida, guayacol, ácido tánico, ácido cítrico, ABTS, albúmina bovina, asparagina, Tween 80, celulosa y el CuSO_4 fueron obtenidos de Sigma-Aldrich® (USA). El ácido tricloroacético provino de Fluka® (USA). El $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, la glucosa y el Agar Papa Dextrosa de JT Baker® (USA). El reactivo de Bradford se adquirió de BioRad® (USA). El extracto de malta y el agar bacteriológico provienen de Difco® (USA). Todos los compuestos y reactivos empleados para la extracción de ARN y los análisis de expresión fueron grado biología molecular.

RESULTADOS

Ensayos de decoloración/oxidación de la cepa IMI 206040 de *T. atroviride*

La capacidad de la cepa IMI 206040 de *T. atroviride* para degradar compuestos fenólicos se evaluó mediante ensayos de decoloración y oxidación en placa. *T. atroviride* degradó con diferente eficiencia los colorantes Naranja de Metilo, Índigo Carmín y RBBR (Tabla 1). En el caso de los colorantes Naranja de Metilo e Índigo Carmín, la decoloración comenzó con la formación de zonas claras en el centro de la colonia y se extendió conforme incrementó el diámetro micelial. Índigo Carmín fue el único colorante degradado completamente por *T. atroviride*, siendo evidente al segundo día de que el micelio cubrió la placa. En relación al colorante RBBR, la

decoloración comenzó en el centro de la colonia luego de tres días de que el micelio cubrió la placa. *T. atroviride* no fue capaz de degradar los colorantes Azul Ácido 1, Fucsina Ácida, Azul Directo 71 y CSB6B (Fig. 1).

Los ensayos con ácido tánico resultaron en la aparición temprana de una coloración café oscuro en el medio de cultivo que se extendió e intensificó con el crecimiento micelial. La oxidación del ABTS fue notoria a las 3 horas de incubación, siendo evidente mediante la aparición de una coloración azul-verde en el medio de cultivo, en la zona de crecimiento micelial y desapareció gradualmente en el centro de la colonia. *T. atroviride* no fue capaz de oxidar los sustratos guayacol y siringaldazina, aún después de 15 días de incubación (Fig. 1).

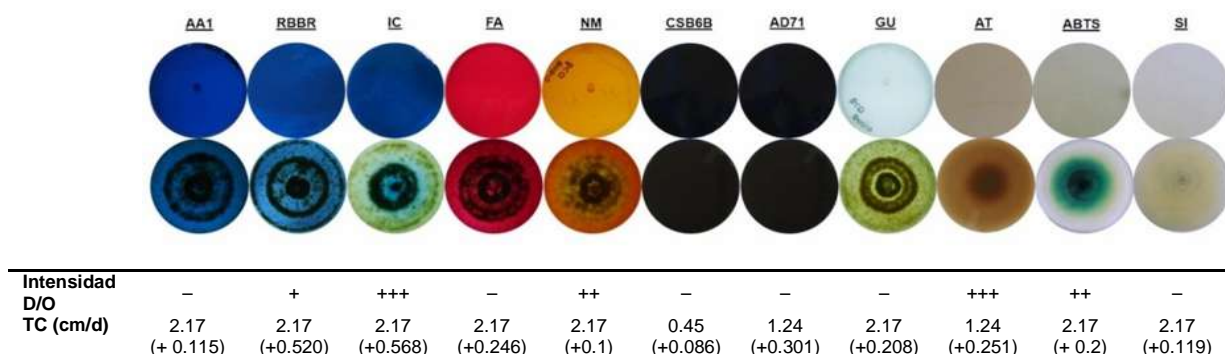


Figura 1. Ensayos de decoloración y oxidación en placa de *T. atroviride* IMI 206040. Claves: AA1, Azul Ácido 1; RBBR, Azul Remazol Brillante R; IC, Índigo Carmín; FA, Fucsina Ácida; NM, Naranja de Metilo; CSB6B, Chicago Sky Blue 6B; AD71, Azul Directo 71; GUA, Guayacol; AT, Ácido Tánico; ABTS, ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato); SYR, Siringaldazina. En la parte superior de la figura se encuentran los controles, que son los medios de cultivo adicionados con los diferentes colorantes y sustratos sin el hongo. En la parte inferior se muestra de manera cualitativa la intensidad de decoloración/oxidación (D/O) y la tasa de crecimiento (TC) en centímetros por día (cm/d), para cada compuesto utilizado. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar de las tasas de crecimiento. Los resultados obtenidos corresponden al promedio de tres réplicas. Claves: +++, decoloración/oxidación intensa; ++, decoloración/oxidación moderada; +, decoloración/oxidación baja; -, no presentó decoloración/oxidación.

La tasa de crecimiento de *T. atroviride* en condiciones control en MM y al adicionar los indicadores Naranja de Metilo, Azul Ácido 1, Fucsina Ácida, Índigo Carmín, RBBR, guayacol, ABTS y siringaldazina fue de 2.17 cm/día (Fig. 1). La adición de Azul Directo 71, CSB6B y Ácido Tánico inhibió el crecimiento micelial, presentando una tasa de crecimiento que osciló entre 0.45 y 1.24 cm/día (Fig. 1). En

los cultivos adicionados con los diversos colorantes y con los sustratos ácido tánico y guayacol se observó abundante formación de conidias. No obstante la adición de ABTS y siringaldazina no promovió la síntesis de conidias, observándose únicamente crecimiento vegetativo.

Cinéticas de crecimiento en medio líquido y actividad de lacasa extracelular

La actividad de lacasa extracelular de la cepa IMI 206040 de *T. atroviride* se determinó en medio líquido tanto en condiciones basales como inducidas con asparagina, guayacol, ácido tánico, celulosa, rastrojo de sorgo, Tween 80 y CuSO_4 . Las cinéticas de crecimiento bajo las condiciones de cultivo evaluadas mostraron una fase logarítmica de duración variable, seguida de una fase estacionaria que se mantuvo hasta el final de las cinéticas de crecimiento (Fig. 2). En condiciones basales *T. atroviride* presentó una fase exponencial de tres días, mientras que al adicionar asparagina al medio de cultivo la fase exponencial se redujo a dos días de incubación (Fig. 2-A). En el tiempo total de incubación empleado en los ensayos, la máxima producción micelial en condiciones basales fue de 62.45 (± 0.0009) mg y de 56.5 (± 0.0009) mg al adicionar asparagina (Fig. 2-A, Tabla 1). Al agregar al medio de cultivo guayacol, rastrojo de sorgo y Tween 80 la biomasa fúngica incrementó a 79.75 (± 0.0008) mg, 91.18 (± 0.0156) mg y 92.70 mg (± 0.0002), respectivamente (Tabla 1). Las cinéticas con guayacol y Tween 80 presentaron un patrón similar de crecimiento, con una fase exponencial que se mantuvo hasta el décimo día de incubación (Fig. 2-C y 1-D). Con rastrojo de sorgo se presentó una fase exponencial hasta el tercer día de incubación, seguido de un cambio rápido a la etapa de decaimiento (Fig. 2-B). Al adicionar al medio de cultivo ácido tánico, celulosa y CuSO_4 la biomasa fúngica disminuyó con respecto al cultivo en condiciones basales, siendo la máxima de 39.63 (± 0.001) mg, 54.33 (± 0.0512) mg y 54.33 (± 0.0012) mg, respectivamente. El efecto en el desarrollo micelial de *T. atroviride* fue más pronunciado con ácido tánico, siendo la única condición en la que se presentó una

fase lag de un día, que continuó con una fase logarítmica hasta el cuarto día de incubación (Fig. 2-C).

Tabla 1. Actividad extracelular de lacasa y producción de biomasa en *T. atroviride* IMI 206040 con diferentes inductores.

Condición de cultivo	Biomasa (mg)	Relación de biomasa (I/B)	Actividad máxima (mU/mL)	Relación de actividad (I/B)
Basal	62.45 (\pm 0.009) ^a	Na	nd	na
Inductor				
Asparagina	56.50 (\pm 0.0009) ^b	0.90	61.11 (\pm 0.008) ^a	61.11
Celulosa	54.33 (\pm 0.0512) ^c	0.86	572.91 (\pm 0.035) ^b	572.91
Sorgo	91.18 (\pm 0.0156) ^d	1.46	296.66 (\pm 0.008) ^c	296.66
Ácido tánico	39.63 (\pm 0.001) ^e	0.63	3804.16 (\pm 0.085) ^d	3804.16
Guayacol	79.75 (\pm 0.0008) ^f	1.27	162.22 (\pm 0.000) ^e	162.22
Tween 80	92.70 (\pm 0.0002) ^g	1.48	4925.55 (\pm 0.066) ^f	4925.55
CuSO ₄	54.33 (\pm 0.0012) ^c	0.86	8759.25 (\pm 0.141) ^g	8759.25

Clave: nd, no determinada; na, no aplica; I, inductor; B, basal. La desviación estándar aparece entre paréntesis. En cada columna los valores que tienen diferente letra de superíndice indica que las diferencias son significativas ($p < 0.05$). Para todas las cepas, excepto para el crecimiento de CMU-218, las diferencias en los valores de crecimiento y actividad enzimática entre los cultivos basales y con RS son significativas.

En condiciones basales la cepa IMI 206040 de *T. atroviride* no mostró actividad de lacasa extracelular, siendo cero desde el inicio hasta el final de la cinética de actividad (Fig. 2-A). En el cultivo adicionado con asparagina se detectó actividad de lacasa a partir del segundo día, presentando una máxima actividad de 61.11 (\pm 0.008) mU/mL en el tercer día de incubación (Fig. 2-A). Aun cuando la adición de celulosa y rastrojo de sorgo al medio de cultivo indujo la actividad de lacasa extracelular, ésta se mostró en diferentes etapas de crecimiento (Fig. 2-B). Con rastrojo de sorgo la máxima actividad de lacasa se presentó en la fase exponencial, con un máximo de 296.66 (\pm 0.008) mU/MI en el quinto día de incubación, mientras que con celulosa, la actividad de lacasa se detectó en la fase estacionaria, a partir del quinto día de incubación, presentando un máximo de 572.91 (\pm 0.035) mU/mL (Fig. 2-B). En el caso del cultivo adicionado con guayacol, la actividad de lacasa se manifestó desde el segundo hasta el sexto día de incubación, con una máxima de 162.22 (\pm 0.0) mU/mL hacia el quinto día, correspondiente a la etapa estacionaria de

crecimiento (Fig. 2-C). Al adicionar ácido tánico al medio de cultivo, *T. atroviride* mostró un patrón de actividad similar al observado con guayacol, detectándose la actividad de lacasa desde el cuarto hasta el décimo día de incubación. La máxima actividad de lacasa en los cultivos suplementados con ácido tánico fue de 3804.16 (\pm 0.085) mU/mL en el quinto día de incubación (Fig. 2-C). Con Tween 80 se observó el mayor incremento de actividad de lacasa en relación al resto de los cultivos inducidos, presentando un máximo de 4925.55 (\pm 0.066) mU/mL hacia el cuarto día de incubación (Fig. 2-D). También se indujo la actividad con CuSO₄, la cual mostró niveles más altos que todos los inductores anteriores. No obstante, debido a que el caso de la inducción con CuSO₄ se realizó una determinación semicuantitativa de los niveles de transcrito del gen *Talac1*, los resultados se presentan más adelante (ver sección Determinación semicuantitativa de la expresión del gen de lacasa extracelular de *T. atroviride* IMI 206040).

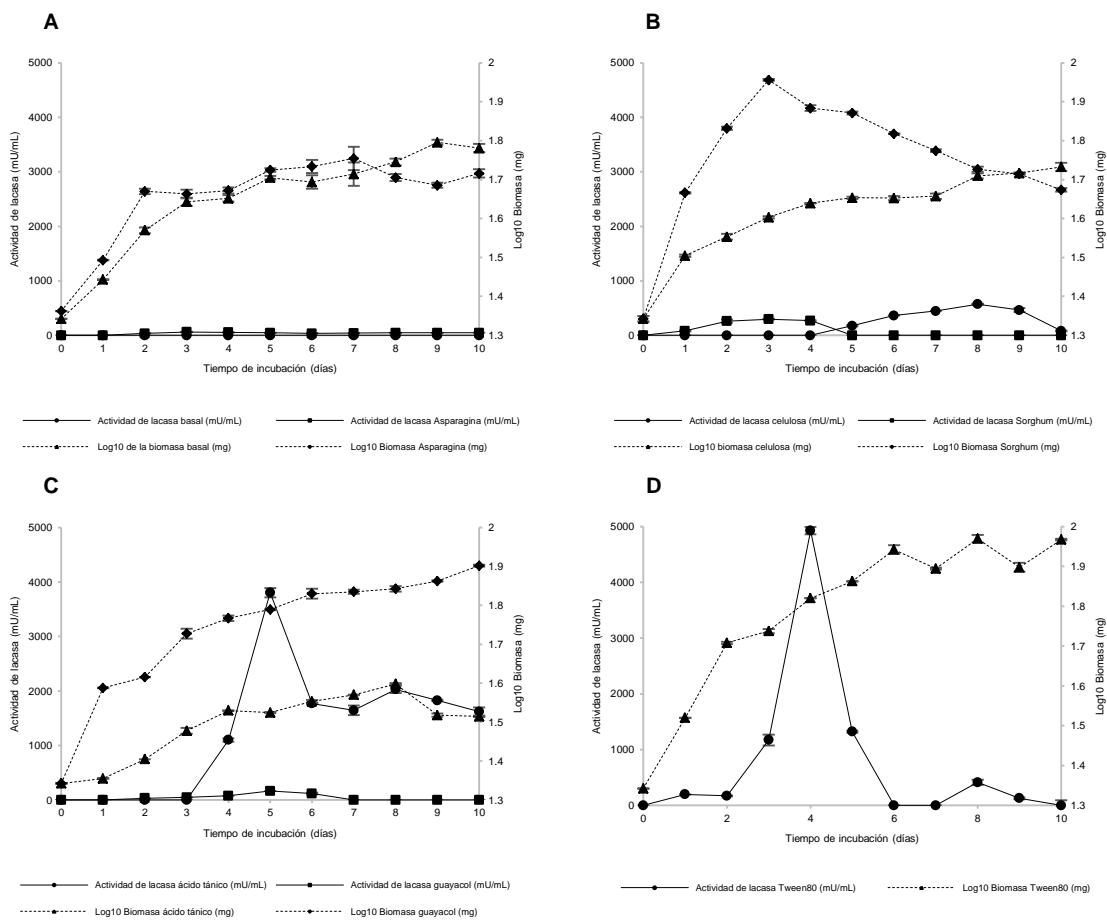


Figura 2. Cinéticas de crecimiento y actividad de lacasa extracelular de *T. atroviride* IMI 206040. Cultivos en Caldo Extracto de Malta adicionados con: **A**, basal y asparagina (1%); **B**, celulosa (1%) y rastrojo de sorgo (0.5 g por cada 25 mL de CEM); **C**, ácido tánico (1 %) y guayacol (1 mM); **D**, Tween 80 (1 mM). Los cultivos se incubaron a 28 °C y 120 rpm de agitación. Todas las gráficas tienen la misma escala en el eje y.

Región promotora del gen de lacasa *Talac1* de *T. atroviride* IMI 206040

Se analizó una región de 1550 pb 'río arriba' del codón de inicio de la transcripción (ATG) con la finalidad de identificar la presencia y localización de los elementos de regulación en *cis* involucrados en la transcripción de los genes de lacasa (Fig. 3). Se encontró una caja TATA, en la posición -148, y cinco cajas CAAT en las posiciones -88, -121, -502, -993 y -1345. Adicionalmente, se identificó un elemento de respuesta a metales (MREs, metal responsive elements), un elemento de respuesta a xenobióticos (XREs, xenobiotic responsive elements) y un elemento de respuesta a ACE₁ (ACE₁), en las posiciones -627, -1391 y -1519, respectivamente (Fig. 3). Dos elementos de respuesta a CreA (CreA) se encontraron en las posiciones -845 y -1024 (Fig. 3). Adicionalmente, se identificaron los elementos de respuesta a micoparasitismo MYC1 y MYC3 en las posiciones -943 y -164, respectivamente.

```

-1550 TCATCAGCCTTTAAAGATAACTTGGGAGAGGCATAATCTCTAAAAAGTCTAGTAAAGTAA
-1490 GTTGAAGAAACAAAAGAAACATTCCACCATTTCCAGGTGGCGATCTTCTCTTTTATACAA
-1430 GGCCGCTGTAAATGAAATATTACTTTTTCTTTCAATCGGTGTTATCCAAAACCTTGACAA
-1370 CTTCACTATTCTCTTTCTA CAATCTACCCCGTGTGTTATAGGCCACGCGTCAATGTACGG
-1310 CAACGGTATGTTATACGATTGGACAGGATAAACTTTTTATCCCAATTGCAAGGTAAAGAGT
-1250 TGTGACCAAAATAGCATAGGAAACATGTATCATGACTCATAATAAGTCTTACAATATAAAA
-1190 CAAGTACAAAATATGTAAGTGCACATCTCTCTCAACCAAAAAGAATAACAATTTTCTCAA
-1130 GAACCAGCTTGGCCAAGTCGTGGTTAGATACATATTCTACATCCTGCATCCTCAAGGACA
-1070 TATTAGTGCATTCATTTATAAACTTGGATTTGTAGAATCAACTCCGGTTTTTTTATTTACA
-1010 AAGTCTTTACA GCCAATCTTTTAGATCCAACATCCTCGTATAAGACTTCCATTGTAGTTT
-950 GTGCTTCAGGTTACATGCTAGTAGTTCCATTTCGACCCTGCACAGCCGGTGTAGGGGATTA
-890 CGCGGAAAGGGGAAAACCTGGATACTTGTAGCGGTATATC CCCCACATACCGAACAACCT
-830 AGTATAGCTGGCCCGTACAGAAAGAGTTTTCCATTTTTGCAACTCAGGGGATCTCCAACC
-770 AAAAAGATGTATATTTAAAGCCGTCATCACTATTTGAAAGCTACGCCCTATTCTTCA
-710 GTTTCAGTTTGCCAAATTGAGCATGAGAAGCTTTATATCGAGGCTGTGCTGTACCGTGCC
-650 GTGCCGCGCTACTGTACTGCGCACATAAACCGCCTGACTTTTAAATGAAAGCCGTAGATGA

```

-590 GAAGCTACTCCGAACCATGATTGTAACCAAAAAATCTCGTAACTACTATACCCGTCCTCGT
 -530 TACAACGGGCAGCCGATTACGCAACCAATTACGCAACTGCAAAGCCCTCAAGACGACTTC
 -470 TGTATGAATGCACTGATAGTAAAAATTATTATTTTACATGTGAAATAATTGACTTGGGTA
 -410 TGGACAAATCTGCCTTGCCGTCGAGGGGTTCTCGATTCCAGGAGTTCTTGATATCCCTGG
 -350 TAGATCCTGATTTAGAAACGTTTGCCTAGGCTTCTTCTAGCTACCACGGGGTACTGGGCT
 -290 ATGCGGAATAGAGACAGCGTATAGCTAAAGAGTTGATTGCATGAACACCATGGTGTTTGG
 -230 AAGTGATAGGAGATACTTCTAGACTACAGAATAACAAGGGACTGTATGGCATAACAAGCTT
 -170 GGCAGGACCAGAAACGAGTATAAGAAGTGTGCCACGCCCTGATTCAATCTGATCAAAAAGC
 -110 TTGTCACTCTCATTTCATCAATCTCAACTACAGATCTTTTCAACTCATTCTTTATTGGCAC
 -50 AGCTCCAAGCGTATCACAATTTCAATTCGTTTCATCAATAGGCCTATTTCAGCATG

Figura 3. Región promotora del gen *Talac1* de *T. atroviride* IMI 206040. codón ATG; caja TATA; caja CAAT; elemento de respuesta a CreA; elemento de respuesta a ACE; elemento de respuesta a metales (MREs); elemento de respuesta a xenobióticos (XREs); elementos de respuesta a estrés (STRES); y elemento de respuesta a micoparasitismo (MYC).

Determinación semicuantitativa de la expresión del gen de lacasa extracelular de *T. atroviride* IMI 206040

La expresión semicuantitativa del gen de lacasa extracelular *Talac1* de *T. atroviride* IMI 206040 se evaluó a partir de los cultivos basales en medio líquido y en cultivos inducidos con CuSO₄. Además, se analizó el nivel de expresión del gen *Talac1* durante la confrontación de *T. atroviride* contra los hongos *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfsii*.

Con respecto al cultivo basal en medio líquido, como se comentó anteriormente, no es posible medir actividad de lacasa extracelular. Los datos de RT-PCR cuantitativa en dicha condición son congruentes con esto, aun cuando es posible observar una banda tenue del transcrito del gen *Talac1* en el gel (Fig. 4-B), ésta fue indetectable al análisis densitométrico durante todo el tiempo de incubación (Fig. 4-C). La adición de CuSO₄ (100 µM) al medio de cultivo indujo la actividad de lacasa extracelular hasta un máximo de 8759.25 (+ 0.141) mU/mL en el cuarto día de incubación, al inicio de la fase estacionaria. Estos niveles de actividad fueron significativamente superiores a los de todos los inductores orgánicos empleados (ver Figura 2 y texto correspondiente). De manera interesante, el transcrito del gen *Talac1* en presencia de CuSO₄ se acumula desde el primer día de incubación y se mantiene significativamente más alto en todo el tiempo de cultivo en relación al cultivo basal (Fig. 4-B y 4C). Además, se observa un incremento relativo hacia el tercer día de

incubación, 24 horas antes del pico máximo de actividad enzimática, el cual se sostiene durante el 4 día de incubación, para disminuir a partir del 5 día.

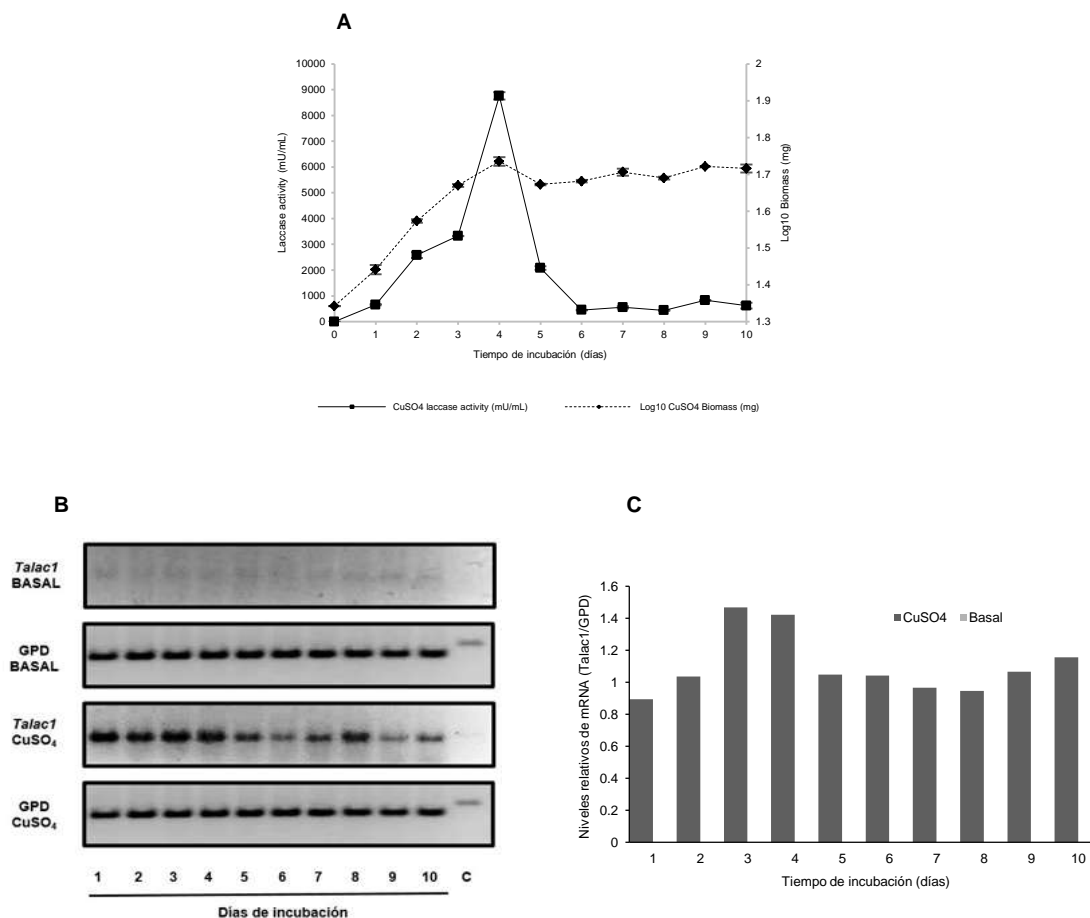


Figura 4. Actividad extracelular de lacasa y expresión del gen *Talac1* de *T. atroviride* IMI 206040. A, cinética de crecimiento y actividad de lacasa extracelular en cultivos inducidos con CuSO_4 ; B, Patrón de transcripción del gen *Talac1* en condiciones basales e inducido con CuSO_4 ; C, Niveles de expresión de *Talac1* normalizados mediante la relación *lac1/GPD*.

El estudio de la expresión del gen *Talac1* durante la confrontación directa de *T. atroviride* contra los hongos *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfsii* resultó en un patrón transcripcional complejo (Fig. 5). La cuantificación densitométrica de las señales obtenidas de detección del RNAm del gen *Talac1*, reveló que durante la confrontación de *T. atroviride* contra *F. oxysporum* dicho gen posee un nivel relativo de expresión relativamente constante durante todo el proceso de la interacción (Fig.

5-A). En relación a la confrontación de *T. atroviride* contra *R. solani*, la expresión del gen *Talac1* fue mayor antes del contacto y después del sobre-crecimiento de *T. atroviride*, aunque las diferencias posiblemente no sean significativas en todo el proceso de interacción (Fig. 5-B). En esta confrontación fue en donde se detectaron los niveles relativos de transcrito del gen *Talac1* más altos. La expresión del gen de lacasa *Talac1* durante la confrontación de *T. atroviride* contra *S. rolfsii* mostró una reducción que parece ser significativa durante el contacto inicial y el sobre-crecimiento del antagonista sobre el patógeno (Fig. 5-C). En dicha confrontación fue donde se detectaron los niveles relativos de transcrito más bajos, particularmente durante el contacto inicial.

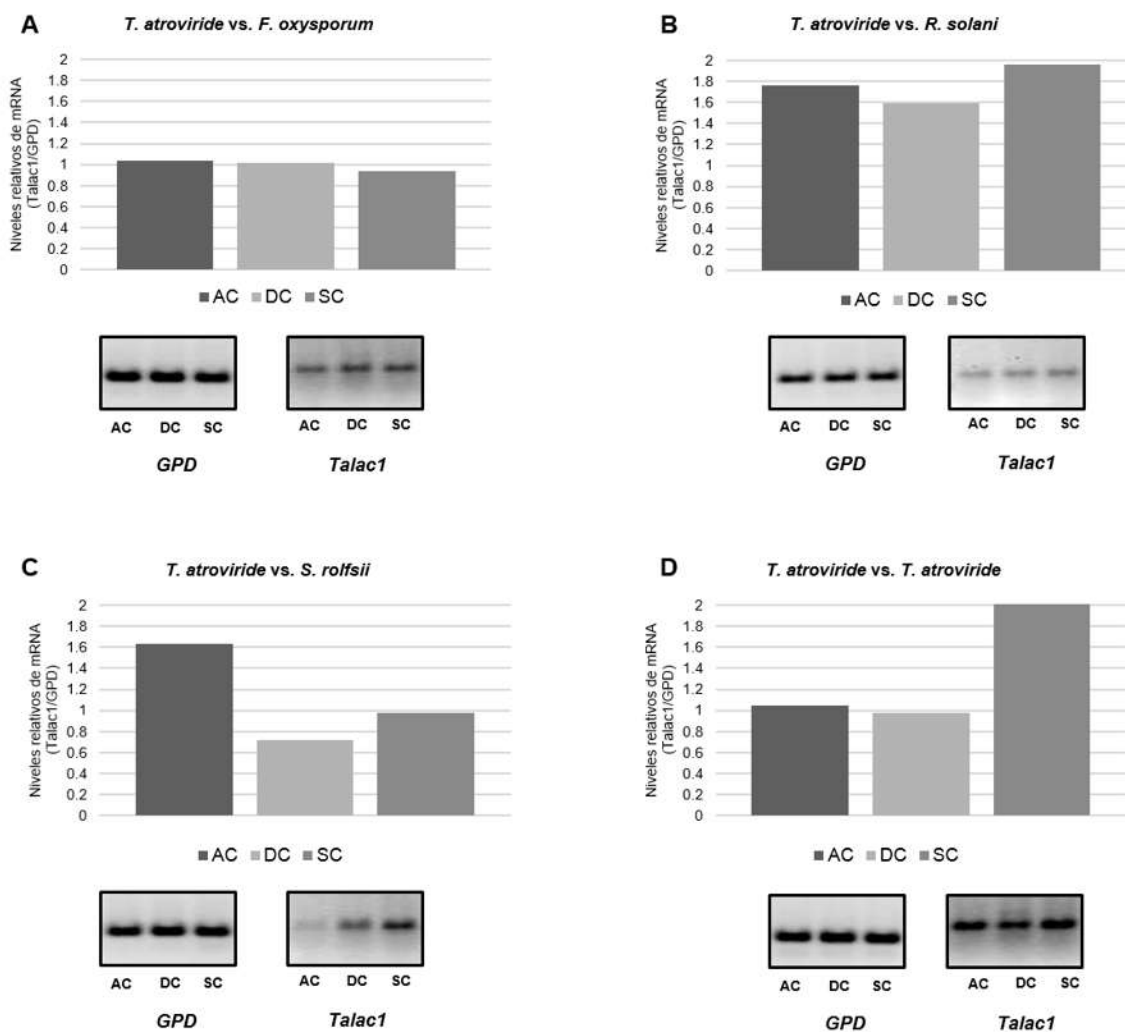


Figura 5. Análisis RT-PCR semicuantitativo del gen de lacasa extracelular *Talac1* de *T. atroviride* IMI 206040 en confrontación directa contra los hongos fitopatógenos *R. solani*, *S. rolfii* y *F. oxysporum*. AC, antes del contacto; DC, durante el contacto; SC, sobre crecimiento; GPD, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, gen control.

Un resultado inesperado pero interesante fue que durante la confrontación directa de *T. atroviride* contra sí mismo, el nivel relativo del transcrito del gen *Talac1* durante el sobre-crecimiento fue el más alto, comparado con cualquiera de los ensayos de confrontación contra los hongos fitopatógenos evaluados.

DISCUSIÓN

Ensayos de decoloración y oxidación de *T. atroviride* IMI 206040

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de la cepa IMI 206040 de *T. atroviride* para degradar compuestos recalcitrantes en base a ensayos de decoloración y oxidación en placa. Se ha documentado previamente la capacidad del micelio de cepas de *Trichoderma* spp. para absorber colorantes industriales en medio líquido (Abd El-Rahim *et al.* 2003, Sadhasivam *et al.* 2007, Da Silva *et al.* 2008, Sivasamy y Sundarabal 2011). Aunque un reporte documenta la actividad de lacasa de *T. harzianum* para decolorar colorantes (Sadhasivam *et al.* 2009), es poco probable que dicha enzima sea una lacasa *sensu stricto*, ya que esta especie no posee genes de lacasa extracelular (Cázares-García *et al.* 2013). Ningún reporte previo documenta la capacidad de decoloración de cepas de referencia de *Trichoderma*, ni su uso para evaluar la producción de lacasa extracelular. El estudio de cepas de referencia del *Trichoderma* spp. de las cuales se cuenta con la secuencia completa del genoma, tiene la ventaja de poder aplicar herramientas de genética molecular para evaluar el posible papel fisiológico de las lacasas y los niveles de regulación de la expresión de la actividad.

T. atroviride presentó mayor eficiencia para degradar los colorantes Naranja de Metilo, Índigo Carmín y RBBR, así como los sustratos ABTS y ácido tánico. Las zonas de decoloración se originaron desde el inóculo central e irradiaron a partir de éste, siendo más pequeñas que el diámetro micelial. Este patrón de decoloración es consistente con la aseveración de que la oxidación de los colorantes es un proceso del metabolismo secundario y que ocurre cuando disminuyen los niveles de

nutrientes (Levin *et al.* 2004). Resultados similares se han reportado para la degradación de Poly R-478, Verde de Malaquita, Azul de Metileno B, Azul Antraquinona y Rojo Congo por distintas especies de hongos ascomicetos y basidiomicetos (Kiiskinen *et al.* 2004, Levin *et al.* 2004). La eficiencia en la degradación de los colorantes por una especie en particular está influenciada por factores como la temperatura, el pH, la agitación, por la presencia y concentración de nutrientes específicos en el medio de cultivo y por la estructura química de cada colorante (Kumar *et al.* 2012). Debido a su estructura aromática condensada, los colorantes tipo azo y antraquinona son más recalcitrantes a la transformación fúngica que colorantes con otras estructuras químicas (Andleeb *et al.* 2012). No obstante, *T. atroviride* fue capaz de degradar ambos tipos de colorantes, lo que lo convierte en una excelente herramienta para su empleo en procesos de biorremediación. Contrario a lo observado en el aislado CMU-8 de *T. atroviride* (ver Capítulo 1), la cepa IMI 206040 degradó eficientemente el colorante Índigo Carmín y RBBR, aunque presentó menor capacidad para degradar al colorante Fucsina Ácida. Esto indica que existe diversidad intraespecífica en *T. atroviride* para degradar colorantes; las bases genéticas y bioquímicas de dichas variaciones intraespecíficas serían interesantes de evaluar a futuro. La habilidad de los hongos para depolimerizar colorantes se ha relacionado directamente a su capacidad para secretar enzimas oxidativas, principalmente lacasas. En los hongos ascomicetos *Pestalotia* sp., *Tolyposcladium* sp. (Jarosz-Wilkokazka *et al.* 2002) y *Myceliphthora thermophila* (Kunamneni *et al.* 2008) se ha documentado que la capacidad de decoloración es el resultado de la actividad de lacasa extracelular. Aunado a ello, se ha determinado que la lacasa de *Aspergillus oryzae* y *Paraconiothyrium variabile* degrada eficientemente los colorantes Azul de Metileno y RBBR (Forootanfar *et al.* 2012). En hongos basidiomicetos se ha reportado extensamente la participación de las lacasas en procesos de decoloración, Palmieri *et al.* (2005) probaron que la lacasa de *Pleurotus ostreatus* es la principal enzima responsable de la decoloración de RBBR. La decoloración parcial de azo colorantes y la completa degradación de colorantes tipo antraquinona por parte del hongo *Pleurotus sanguineus* es debida únicamente a la actividad de lacasa extracelular (Pointing y Vrijmoed, 2000). La capacidad de las lacasas fúngicas para

degradar colorantes con diferente estructura química se debe a su baja especificidad por sustrato y a que poseen potenciales redox que superan al de los colorantes.

Aunque en algunos reportes la capacidad de las especies *T. atroviride*, *T. longibrachiatum*, *T. reesei* y *T. viride* para degradar el colorante Cristal Violeta se ha asociado a la secreción de lacasas al medio de cultivo (Gochev y Krastanov, 2007), esto no puede ser cierto para todos los casos, ya que *T. reesei* no posee una lacasa extracelular *sensu stricto* (Cázares-García *et al.* 2013). Lo que indica que en este proceso puede estar participando alguna otra enzima oxidativa extracelular como una lacasa-ferrooxidasa, la cual si se encuentra en *T. reesei* (Cázares-García *et al.* datos no publicados).

T. atroviride oxidó de forma eficaz los sustratos ácido tánico y ABTS, pero no así el guayacol y la siringaldazina. Estos cuatro sustratos se han utilizado ampliamente para la detección de la actividad de lacasa extracelular, ya sea adicionados en medio sólido (Kiiskinen *et al.* 2004), o para la cuantificación espectrofotométrica a partir de cultivos líquidos (Terrón *et al.* 2004). El ácido tánico es un polifenol que posee un centro decagaloil glucosa que al ser oxidado por las lacasas forma estructuras cromóforas fácilmente detectables. La habilidad de *T. atroviride* para oxidar ácido tánico puede estar relacionada a su estilo de vida saprofítico, ya que el ácido tánico es un tipo de tanino hidrolizable producido en las raíces y tallos de las plantas (Mueller-Harvey 2001). Resultados similares a los de la cepa IMI 206040 se obtuvieron con la cepa silvestre CMU-8 de *T. atroviride* puesto que oxidó eficientemente el ácido tánico, aunque a diferencia de la cepa de referencia, la cepa CMU-8 oxidó moderadamente el guayacol (Capítulo 1).

La oxidación de ácido tánico por acción de las lacasas se ha reportado en *T. atroviride*, *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* (Desai *et al.* 2011). Sin embargo, en algunos aislados de *Trichoderma* la degradación/oxidación del ácido tánico se ha atribuido a la actividad de tanasas (Iqbal y Kapoor 2012), esto es factible, ya que *T. harzianum* tampoco posee genes de lacasa extracelular (Cázares-García *et al.* 2013), aunque sí genes que codifican para otros miembros de la familia de las MCO (Cázares-García *et al.* datos no publicados). No obstante, en el hongo ascomiceto *Botrytis cinerea*, la delección del gen de lacasa BcLCC2 resultó en la reducción de la

capacidad de oxidación y resistencia a ácido tánico por dicha especie, lo que refuerza la participación de las lacasas en la oxidación de éste compuesto (Schouten *et al.* 2008). Es necesario realizar más estudios para determinar los papeles relativos de la tanasa y la lacasa en la degradación/oxidación de ácido tánico por especies de *Trichoderma*.

El ABTS es un compuesto no fenólico rico en electrones que al ser oxidado por las lacasas genera un radical catiónico estable (ABTS^{•+}) de color azul-verde (Terrón *et al.* 2004). La aparición de la coloración azul-verde en el cultivo de *T. atroviride* fue evidente en la zona de crecimiento micelial y desapareció gradualmente en el centro de la colonia. Durante el metabolismo secundario, las especies de *Trichoderma* producen una gran variedad de compuestos no polares de bajo peso molecular tales como pirones, policétidos, terpenoides y esteroides, entre otros (Mukherjee *et al.* 2013). Una posibilidad es que alguno o varios de éstos compuestos actúen como reductores del ABTS^{•+} convirtiéndolo en la forma incolora ABTS, siendo ésta la razón por la que desaparece la coloración azul-verde en el medio de cultivo. La reducción del ABTS^{•+} a ABTS por ácidos orgánicos fisiológicos (Collins *et al.* 1998) y por compuestos orgánicos sulfhidrilo (Johannes y Majcherczyk 2000) ya ha sido reportada y ha conducido a la subestimación en la producción y actividad de lacasa extracelular.

Chakroun *et al.* (2010) reportaron la purificación y caracterización bioquímica de la lacasa extracelular de la cepa CTM 10476 de *T. atroviride*. La lacasa purificada oxidó eficientemente los sustratos ABTS, 2,6-Dimetoxifenol, siringaldazina e hidroquinona con una actividad relativa de 100, 75, 60 y 47 %, respectivamente. Estos datos sugieren que la incapacidad de la cepa IMI 206040 de *T. atroviride* para oxidar siringaldazina adicionada al medio sólido, puede deberse a la escasa o nula producción de lacasa extracelular en las condiciones de cultivo aquí probadas.

La probabilidad de detectar actividad de lacasa extracelular en cualquier cepa fúngica se incrementa considerablemente cuando se emplea un batería de sustratos con distintas estructuras químicas (Kiiskinen *et al.* 2004), como en el caso de los ensayos aquí realizados con la cepa IMI 206040. No obstante, es necesario también realizar ensayos espectrofotométricos de cultivos en medio líquido para determinar

cuantitativamente la actividad extracelular de lacasa. Lo que constituyó el siguiente paso de este trabajo.

Actividad de lacasa extracelular en cultivo basal e inducido

La producción de lacasa extracelular por *T. atroviride* IMI 206040 se evaluó en cultivos líquidos tanto en condiciones basales como inducidas con asparagina, celulosa, rastrojo de sorgo, guayacol, ácido tánico, Tween 80 y CuSO₄. En cultivos basales no se detectó actividad de lacasa extracelular, mientras que al adicionar los distintos compuestos al medio de cultivo la actividad de lacasa incrementó significativamente. El hecho de no encontrar actividad basal de lacasa extracelular en la cepa IMI 206040 es consistente con el resultado obtenido para la cepa silvestre CMU de *T. atroviride* estudiada en este trabajo (ver Capítulo 1), en la cual tampoco se detectó dicha actividad en las mismas condiciones de cultivo. Esto sugiere que la incapacidad de producir lacasa extracelular en condiciones de no inducción es una característica fisiológica estable en aislados geográficos de *T. atroviride*, lo cual no siempre se cumple dentro de otros grupos de hongos. Por ejemplo, se han documentado distintos niveles de actividad basal de lacasa extracelular entre aislados del ascomycete *Botryosphaeria rhodina* (Saldanha *et al.* 2007). Aún más evidente es la variación en la actividad de lacasa extracelular de aislados monospóricos del basidiomicete *Volvariella volvacea* crecidos sobre rastrojo de arroz (Ahlawat *et al.* 2010). No obstante, es necesario analizar más aislados de distintas regiones geográficas para poder corroborar dicha hipótesis.

La adición de los sustratos apropiados al medio de cultivo es un factor clave para obtener alta actividad de lacasa extracelular, ya que se ha reportado que un mismo compuesto puede generar efectos opuestos en diferentes especies fúngicas (Piscitelli *et al.* 2011). En general, se han obtenido buenos resultados con sustratos que son utilizados rápida y eficientemente por los hongos, tales como carbohidratos monoméricos y diméricos (Hao *et al.* 2007) y compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos (Dekker *et al.* 2007). El efecto de la concentración y naturaleza de la fuente de nitrógeno sobre la producción de lacasa extracelular es un tema controversial, debido a que en algunas especies la síntesis de lacasas requiere de

altos niveles de nitrógeno, mientras que en otras la producción de lacasa es estimulada únicamente en concentraciones limitantes de nitrógeno (Piscitelli *et al.* 2011). Además, se ha observado que fuentes de nitrógeno inorgánico conducen a bajos niveles de actividad de lacasa aun con suficiente producción de biomasa, en tanto que fuentes orgánicas de nitrógeno generan altos niveles de actividad y de biomasa fúngica (Dong *et al.* 2005). En *T. atroviride* la presencia de asparagina como fuente de nitrógeno estimuló más de 61 veces la actividad de lacasa extracelular, en relación al cultivo basal, sin efectos adicionales sobre la producción micelial. Resultados similares se obtuvieron al cultivar distintas especies de *Colletotrichum* en un medio rico en asparagina y al igual que en *T. atroviride*, la actividad de lacasa se detectó en la fase primaria de crecimiento (Levin *et al.* 2007). En el caso de la cepa MAMB-05 del hongo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* la presencia de asparagina no influenció la producción de lacasa en relación a cultivos basales, aunque la adición conjunta de asparagina y de alcohol veratrílico incrementó significativamente la actividad de lacasa y el crecimiento micelial (Dekker *et al.* 2007).

Una de las principales fuentes de carbono utilizadas para el crecimiento *in vitro* de los hongos es la glucosa (Piscitelli *et al.* 2011). Sin embargo, se ha reportado que la adición de concentraciones excesivas de glucosa en el medio de cultivo tiene un efecto inhibitorio en la producción de lacasa extracelular debido a la represión catabólica de los genes involucrados en el metabolismo de fuentes alternativas de carbono (Ronne 1995). El efecto de represión catabólica en cultivos fúngicos puede evitarse suplementando los medios con diferentes polisacáridos, particularmente celulosa, como fuente de carbono (Gochev y Krastanov 2007). La adición de celulosa como inductor de la actividad de lacasa de hongos está poco documentada. En este trabajo se observó que en *T. atroviride* la adición de celulosa incrementó la actividad de lacasa extracelular en más de 500 veces, aunque con reducción de la biomasa fúngica, en relación al cultivo basal. El efecto opuesto se observó en el hongo patógeno de plantas *Pestalotiopsis* sp., puesto que la adición de celulosa al medio de cultivo resultó en la disminución de los niveles de lacasa extracelular (Hao *et al.* 2007). En *Trametes hirsuta* la adición de celulosa inhibió tanto la producción de lacasa como de biomasa fúngica (Dhakar y Pandey 2013). Así, el presente trabajo

parece ser el primero en documentar la inducción de lacasa en hongos empleando celulosa como fuente de carbono, no obstante, el mecanismo mediante el cual dicha inducción se produce tendrá que ser estudiado en trabajos posteriores. La incubación de aislados silvestres de *Trichoderma atroviride* en presencia de celulosa y xilana induce la producción de celulasas y xilanasas (Kaur et al. 2005). También se ha reportado la inducción de hidrolasas degradadoras de celulosa y hemicelulosa en *T. atroviride* cuando se utilizan residuos lignocelulósicos (Kovacs et al. 2009). La inducción de lacasa extracelular en dicha especie en presencia celulosa resulta interesante desde un punto de vista biotecnológico, ya que bajo estas condiciones de cultivo es capaz de producir enzimas que atacan los tres principales polímeros de la pared celular de las plantas.

Mientras que la actividad de lacasa extracelular en los cultivos adicionados con celulosa se presentó en la fase estacionaria de crecimiento, en los cultivos suplementados con rastrojo de sorgo se detectó en la etapa exponencial y además, tuvo un efecto estimulante en el crecimiento micelial. La aparición temprana de la actividad de lacasa en cultivos suplementados con rastrojo de sorgo sugiere que dicha enzima participa en el establecimiento de *T. atroviride* sobre el sustrato ligninolítico. El rastrojo de sorgo indujo en casi 300 veces la actividad de lacasa extracelular en la cepa IMI 206040 de *T. atroviride*, mientras que en el caso de la cepa silvestre CMU-8 dicha inducción fue de aproximadamente 1321 veces (ver capítulo 1). Nuevamente, lo anterior sugiere una capacidad diferencial de cepas de la misma especie para colonizar sustratos ligninolíticos.

En el secretoma de la cepa S4F8 de *T. asperellum* durante fermentación en estado sólido sobre bagazo de caña de azúcar no se detectó actividad de lacasa extracelular (Marx et al. 2013). Dicho resultado es interesante debido a que ya se ha reportado la presencia de genes de lacasa extracelular en el genoma de *T. asperellum* (Cázares-García et al. 2013). La diferencia entre los resultados descritos por Marx et al. (2013) y los obtenidos en el presente trabajo puede atribuirse al tipo de material lignocelulósico utilizado y a las diferentes capacidades metabólicas que posee cada una de las especies de *Trichoderma*. El efecto de la adición de sustratos naturales sobre la actividad de lacasa extracelular ha sido poco investigada en

hongos ascomicetos. Entre los pocos estudios en ese sentido, se ha reportado que en *Penicillium martensi* NRC 345 la adición de los residuos lignocelulósicos paja de trigo, salvado de arroz, paja de maíz y bagazo de caña de azúcar, estimula la actividad de lacasa extracelular (Elshafei *et al.* 2012). En contraste, la inducción de la actividad de lacasa extracelular por hongos basidiomicetos se ha reportado en un gran número de especies. En la cepa RC3 de *Coriolus versicolor* la presencia de salvado de arroz indujo entre 2.4 y 22 veces la actividad de lacasa extracelular (Chawachart *et al.* 2004) y la adición de aserrín de uva incrementó fuertemente la actividad de lacasa en *P. pulmonaris* (Stajić *et al.* 2007). Sousa *et al.* (2002) reportaron que la cepa brasileña de *P. pulmonaris* presenta la mejor producción de lacasa cuando es cultivada con salvado de trigo. La utilización de residuos agrícolas para inducir la actividad de lacasa extracelular representa una alternativa para reducir los costos de producción e incrementar las aplicaciones biotecnológicas de dichas enzimas y de manera paralela, emplear eficientemente estos sustratos.

Los compuestos aromáticos estructuralmente relacionados a la lignina o derivados de ésta, son usados con regularidad para incrementar la producción de lacasa extracelular en las especies fúngicas (Piscitelli *et al.* 2011). Se ha demostrado que la inducción de las lacasas por sustratos fenólicos varía en cada organismo y parece ser específica de la estructura química y la concentración del inductor, así como del tiempo de adición al medio de cultivo (Janusz *et al.* 2006). La presencia de los sustratos guayacol y ácido tánico al cultivo de *T. atroviride* mostró un incremento en la actividad de lacasa de 162 y 3800 veces, respectivamente, en relación a las condiciones basales. El patrón de actividad enzimática con ambos compuestos fue similar, presentándose la máxima actividad de lacasa en el quinto día y en el caso del ácido tánico, ésta se mantuvo hasta el décimo día de incubación. Con ácido tánico se observó una disminución considerable en la producción de la biomasa fúngica, por lo que la mayor actividad de lacasa puede estar relacionada a la defensa del hongo contra compuestos aromáticos tóxicos. Una de las funciones fisiológicas que se ha sugerido para las lacasas es la detoxificación de compuestos fenólicos a través de reacciones de polimerización (Thurston 1994). La aparición de una coloración café oscuro en los cultivos suplementados con ácido tánico durante los

primeros días de incubación de *T. atroviride*, podría soportar dicha función dentro de *Trichoderma*. Además, a lo largo del tiempo de incubación, la intensidad de la coloración café disminuyó gradualmente y la actividad de lacasa extracelular se mantuvo hasta el final de la cinética. Esto podría indicar que la lacasa de *T. atroviride* también participa en la degradación de los compuestos generados durante la oxidación inicial del ácido tánico (Bollag *et al.* 1998). Los resultados aquí documentados en relación con la inducción de la actividad extracelular de lacasa en *T. atroviride* son congruentes con los reportado en los hongos ascomicetos *B. cinerea* (Schouten *et al.* 2002) y *Cryphonectria parasitica* (Chung *et al.* 2008) y en el hongo basidiomiceto *Coriolopsis gallica* (Carbajo *et al.* 2002) al suplementar los cultivos con ácido tánico, en los que se ha observado una inducción de la transcripción de genes de lacasa extracelular.

El guayacol es un monofenol sustituido que generalmente induce la actividad de lacasa extracelular al ser adicionado al medio de cultivo (Piscitelli *et al.* 2011), tal como se observó en *T. atroviride*. Sin embargo, en algunas especies fúngicas la adición de guayacol no tiene efecto sobre la actividad de lacasa extracelular, mientras que en otras especies la presencia de guayacol reprime dicha actividad enzimática. Por ejemplo, en el hongo ascomiceto *Pestalotiopsis* sp. la presencia de guayacol en el medio de cultivo no generó un efecto significativo en la producción de lacasa extracelular, comparado con el cultivo control (Hao *et al.* 2007). En los hongos basidiomicetos *Pleurotus florida* y *Pycnoporus cinnabarinus* la presencia de guayacol suprimió la producción de lacasa extracelular (Eggert *et al.* 1998). En comparación con lo reportado para el hongo *P. ostreatus* en el cual se observó una inducción de 2 veces en la actividad de lacasa extracelular, en *T. atroviride* se observó una inducción de 162 veces. Estos resultados demuestran la importancia de evaluar diversos sustratos aromáticos con la finalidad de identificar aquellos con los cuales se obtengan altos niveles de lacasa extracelular para ser utilizados en procesos biotecnológicos. Además, puede contribuir a identificar las funciones fisiológicas de las lacasas en una especie determinada o en grupos taxonómicos.

El uso de surfactantes como Tween 20 y Tween 80 para inducir la actividad de lacasa extracelular se ha extendido tanto al estudio de especies de hongos

ascomicetos como basidiomicetos. Los surfactantes incrementan la permeabilidad de la bicapa lipídica facilitando la secreción tanto de enzimas con actividad extracelular como intracelular, y aquellas ancladas a la membrana (Nemec y Jernejc 2002). La adición de Tween 80 al medio de cultivo de *T. atroviride* promovió un incremento de la actividad de lacasa de más de 4900 veces, en relación al cultivo basal. Estos resultados son congruentes en término cualitativos con los reportados para el hongo *B. rhodina* en donde la adición tanto de Tween 60 como de Tween 80 incrementaron la actividad de lacasa extracelular y la biomasa fúngica. En *B. rhodina*, se obtuvo una actividad entre 0.77 y 1.03 U/mL en cultivos no inducidos y de 6.01 a 9.14 U/mL en cultivos inducidos con alcohol veratrílico y suplementados con Tween 80 (Dekker *et al.* 2007). En *T. atroviride* la producción de biomasa fue mayor en los cultivos adicionados con Tween 80 que con el resto de los compuestos empleados para inducir la actividad de lacasa extracelular. El incremento de la masa fúngica puede ser atribuido a la habilidad de *T. atroviride* para usar a Tween 80 como fuente de carbono. La inducción de la actividad de lacasa extracelular por Tween 80 también se ha reportado en cultivos de los hongos basidiomicetos *Pycnoporus sanguineus* (Pointing *et al.* 2000) y *Trametes trogii* (Levin y Forchiassin 2001). En *Ganoderma* sp. kk-02 la adición de diversos tipos de surfactantes, incluido Tween 80, incrementó la actividad de lacasa entre 1.85 y 2.25 veces (Sharma *et al.* 2005). En contraste, la adición de Tween 80 en cultivos de *P. sanguineus* inducidos con 2,5-xilidina resultó en la reducción de la actividad de lacasa (Pointing *et al.* 2000). Nuevamente, todos estos resultados muestran la variación fisiológica y bioquímica entre grupos de hongos (ascomicetes/basidiomicetes) y entre especies de un mismo grupo, lo que justifica la búsqueda de nuevas cepas productoras de lacasa extracelular y su respuesta a diversos inductores.

En especies fúngicas, el efecto de la adición de cobre al medio de cultivo ha sido extensamente investigado debido a que el cobre además de inducir la síntesis de lacasa extracelular, es indispensable para la activación de la apoenzima (Baldrian 2006). Acorde a la literatura, tanto la concentración como el tiempo de adición del cobre al medio de cultivo son factores importantes para obtener altas concentraciones de lacasa extracelular (Janusz *et al.* 2006). En *T. atroviride* IMI

206040 el CuSO_4 se adicionó al medio de cultivo antes de la inoculación, obteniendo un incremento en la actividad de lacasa extracelular de más de 8700 veces, con respecto al cultivo basal. La máxima actividad de lacasa se presentó en el cuarto día de incubación con 8759.25 mU/mL y se mantuvo a lo largo de la cinética de crecimiento aunque en menor concentración. Previamente se ha reportado la inducción de lacasa extracelular en presencia de cobre en la cepa CTM 10476 de *T. atroviride*, alcanzando un máximo de actividad de 661 mU/mL hacia el séptimo día de incubación (Chakroun *et al.* 2010). Mientras que en la cepa CTM 10476 se empleó una concentración de 300 μM de CuSO_4 , en la cepa IMI 206040 se adicionó únicamente 100 μM de CuSO_4 . Las distintas concentraciones empleadas en ambos estudios podrían explicar las diferencias observadas en relación a la producción de lacasa extracelular, siendo trece veces mayor en la cepa IMI 206040. En *T. atroviride* IMI 206040 se evaluaron dos concentraciones adicionales de CuSO_4 , 200 μM y 300 μM , sin embargo, dichas concentraciones fueron tóxicas para el hongo, inhibiendo completamente el desarrollo micelial (datos no mostrados). De manera similar a lo encontrado en el presente estudio, en la cepa CTM 10476 no se observó actividad de lacasa extracelular basal, por lo que fue necesaria la adición de cobre u otros compuestos orgánicos para su medición (Chakroun *et al.* 2010). La inducción por cobre de la actividad de lacasa extracelular se ha confirmado en los hongos ascomicetes *R. praticola* (Janusz *et al.* 2006) *Gaeumannomyces graminis* (Litvintseva y Henson 2002) y *Podospora anserina* (Fernández-Larrea y Stahl 1996).

Los resultados aquí obtenidos muestran que sustancias orgánicas e inorgánicas pueden inducir significativamente la actividad de lacasa extracelular en *T. atroviride* IMI 206040. A futuro, sería interesante evaluar si es posible incrementar aún más la actividad de lacasa extracelular en *T. atroviride* IMI 206040 mediante la adición conjunta de dos o más de los compuestos utilizados en el presente trabajo, o empleando otros sustratos con diferente estructura química. Algo que es efectivo en distintas especies fúngicas.

Debido a que tanto inductores inorgánicos como orgánicos han mostrado regular a nivel transcripcional la actividad de lacasa extracelular en distintas especies fúngicas, y dados los resultados obtenidos con las sustancias inductoras empleadas

en el presente trabajo, se decidió estudiar la posible regulación transcripcional de la actividad de lacasa extracelular en *T. atroviride*, algo que a la fecha no ha sido documentado en ninguna especie del género *Trichoderma*.

Análisis de la región promotora del gen de lacasa *Tglac1* de *T. atroviride* IMI 206040

La presencia de diversos elementos de regulación en *cis* en la región promotora del gen *Talac1* de *T. atroviride*, indicó que la inducción observada en la actividad extracelular de lacasa al adicionar al medio de cultivo tanto el cobre como los distintos compuestos orgánicos es regulada a nivel de transcripción. Los elementos encontrados en la región promotora del gen *Talac1* incluyeron las cajas TATA y CAAT, y los elementos de respuesta a CreA, ACE_i, MREs, XREs, STRES y MYC. Una secuencia rica en pirimidinas, localizada frecuentemente entre el codón de inicio y la caja TATA en genes con altos niveles de expresión (Shapiro *et al.* 1987), no se localizó en la región promotora del gen *Talac1*. La caja CAAT es particularmente abundante en la región 'rio arriba' del gen *Talac1* con cinco de estos elementos. Las cajas TATA y CAAT han sido identificadas previamente en otros promotores de lacasas fúngicas (Eggert *et al.* 1998, Fan *et al.* 2011); sin embargo, tanto el número como su localización varía considerablemente. La presencia de dos elementos putativos de respuesta a CreA (ZYGGRG) sugiere que la expresión del gen de lacasa de *T. atroviride* es reprimida por glucosa, particularmente a concentraciones mayores a 15 g/L como ha sido reportado para los hongos *A. nidulans* (Xiao *et al.* 2006), *T. pubescens* (Galhaup *et al.* 2002) y *Trametes* sp. AH28-2 (Xiao *et al.* 2006). En el presente trabajo no se evaluaron altas concentraciones de glucosa, por lo que a futuro sería interesante determinar el efecto de altos niveles de glucosa en la producción de lacasa extracelular en *T. atroviride* IMI 206040. Elementos de respuesta a CreA han sido reportados previamente para genes de lacasa de *Myrioconium* sp. UHH 1-13-18-4 (Martin *et al.* 2007), *L. bicolor* (Courty *et al.* 2009) y *Trametes* sp. 48424 (Fan *et al.* 2011). Se encontró un sólo elemento putativo de

respuesta a metales (MREs) que mantiene la secuencia consenso TGCRNC (Thiele 1992). Adicionalmente, se identificó un elemento de respuesta a ACE₁, el cual es un factor de transcripción dependiente de cobre, originalmente encontrado en *Saccharomyces cerevisiae* (Álvarez *et al.* 2009). Estos dos elementos contribuyen a que la regulación de la expresión de lacasas por metales esté generalizada en los hongos, siendo posiblemente la razón por la cual se obtuvieron los mayores niveles de actividad de lacasa extracelular en *T. atroviride* IMI 206040 al adicionar cobre al medio de cultivo. En los promotores de los genes de lacasa de las especies de los géneros *Gaeumannomyces* (Litvintseva *et al.* 2002), *Myrioconium* (Martin *et al.* 2007) y *Trametes* (Fan *et al.* 2011) se identificaron MREs y ACE₁ y se reportó que el cobre regula los niveles del transcrito de manera positiva. El factor ACE₁ no solamente media la expresión de los genes de lacasa, sino que también está relacionado a la expresión de genes de otras MCOs como es el caso de ferroxidasas de *S. cerevisiae* y en la mco1 de *Phanerochaete chrysosporium* (Piscitelli *et al.* 2011). Cabe señalar que la inducción por cobre también se ha reportado para genes de lacasa cuyos promotores no poseen elementos ACE₁ o MREs, por lo que se ha propuesto un mecanismo que involucra la generación de especies reactivas de oxígeno (Collins y Dobson 1997). Los elementos de respuesta a xenobióticos (XREs) median la activación de la transcripción por compuestos aromáticos, tales como colorantes o compuestos relacionados a la lignina. Los XREs se acompañan de la secuencia consenso TNGCGTG (Piscitelli *et al.* 2011), la cual se identificó en la región promotora del gen *Talac1* y puede ser responsable del incremento en la actividad de lacasa en *T. atroviride* al adicionar ácido tánico y guayacol al medio de cultivo. Los XREs se han identificado en la región regulatoria 5' del gen que codifica para una MCO de *T. reesei* (Levasseur *et al.* 2010), para la lacasa *lac2* de *P. anserina* (Fernández-Larrea y Stahl 1996) y en los promotores de los genes de lacasa de diversas especies de basidiomicetos (Giardina *et al.* 2010). La adición de metales o xenobióticos en el medio de cultivo también puede activar los elementos de respuesta a estrés, STRE (Piscitelli *et al.* 2011), presentes en la región promotora de *Talac1*. Aunado a ello, en el promotor del gen *Talac1* se encontraron los elementos MYC1 (GCTTCA) y MYC2 (TTGGCAA). Se ha propuesto que los elementos MYC

son los sitios de unión para un inductor global de genes de respuesta a micoparasitismo (Cortes *et al.* 1998), por lo que la presencia en el promotor del gen de lacasa indica su participación durante dicho proceso. Los elementos MYC se identificaron inicialmente en los promotores de los genes *prb1* y *ech42* de *T. atroviride* (Cortés *et al.* 1998) y posteriormente se describieron en genes homólogos de la especie *T. hamatum* (Steyaert *et al.* 2004).

Tomados en su conjunto, los datos anteriores muestran que la región regulatoria del gen *Talac1* posee reguladores en *cis* previamente reportados en hongos para genes de lacasa extracelular, no obstante, la localización de regiones asociadas a respuesta de micoparasitismo es un hallazgo novedoso en genes de lacasa. Es necesario en estudios posteriores a este realizar ensayos que permitan determinar el papel de cada uno de estos elementos en *cis* en la expresión del gen de lacasa extracelular de *T. atroviride* en distintas condiciones de cultivo. En este estudio, y dados los datos generados del análisis bioinformático de la región regulatoria, se decidió evaluar el control transcripcional del gen *Talac1*.

Expresión del gen de lacasa *Tglac1* de *T. atroviride* IMI 206040 en cultivos suplementados con CuSO_4

La adición de CuSO_4 al medio de cultivo de *T. atroviride* IMI 206040 resultó en la inducción de la transcripción del gen de lacasa extracelular *Talac1* con respecto a las condiciones basales. En condiciones basales, el nivel de expresión del gen de lacasa fue extremadamente bajo y se mantuvo constante a lo largo de la cinética de crecimiento, lo cual es congruente con los resultados de actividad enzimática en condiciones basales. Al adicionar cobre al medio de cultivo se observó un incremento significativo en la transcripción del gen *Talac1* y se mantuvo hasta el cuarto día de incubación, tiempo a partir del cual se observó la reducción paulatina en los niveles del transcrito. En esta condición, mientras que el transcrito se acumula desde el primer día de incubación, la máxima actividad se observa hasta el cuarto día. Dichos resultados indican que posiblemente: i) el transcrito no es traducido inmediatamente, ii) existe regulación post- traduccional (Vite-Vallejo *et al.* 2009), y/o iii) ocurren ambas

cosas de manera simultánea. Esto último no se ha documentado previamente en hongos en términos de la producción de lacasa extracelular.

Los datos de transcripción encontrados también sugieren que la expresión de *Talac1* está relacionada al estado de crecimiento de *T. atroviride*, siendo mayor durante la trofofase que durante la idiofase. Una posibilidad es que la mayor expresión de *Talac1* en la etapa inicial de crecimiento se deba al papel que juegan las lacasas en la defensa del hongo contra metales o sustancias tóxicas durante la colonización de sustratos naturales. Por otro lado, parece ser que la adición de cobre promovió la activación y estabilización de las lacasas. En el hongo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* la presencia de cobre redujo la actividad proteolítica resultando en la estabilización de las lacasas en el extracto crudo (Palmieri *et al.* 2000), proceso que también podría estar sucediendo en los cultivos de *T. atroviride*. En cualquier caso, los altos niveles de actividad extracelular de lacasa en presencia de cobre correlacionan con la inducción de la transcripción del gen de lacasa *Talac1*.

La regulación de la transcripción de los genes de lacasa por cobre se ha demostrado mayoritariamente en especies de hongos basidiomicetos y solo algunos estudios hacen referencia a hongos ascomicetos (Litvintseva y Henson 2002). Dichos trabajos han reportado que la transcripción de los genes de lacasa no solamente depende de la presencia de cobre, sino también de la concentración empleada. En el presente trabajo, la adición de 100 μM de CuSO_4 al medio de cultivo fue suficiente para incrementar los niveles de transcrito del gen *Talac1* hasta en 1.46 veces en el tercer día de incubación, en relación a las condiciones basales. Este resultado es congruente con el hallazgo de los motivos ACE_1 o MREs en la región regulatoria del gen *Talac1* de *T. atroviride*. Sin embargo, queda por determinar cuál de los dos elementos regulatorios en *cis* es el responsable del incremento en la transcripción o si ambos participan en la regulación de manera simultánea.

En el hongo *Podospora anserina* la adición de sales de Cu^+ y Cu^{++} a concentraciones entre 100 y 500 μM , no generó un efecto apreciable sobre los niveles de transcrito del gen *lac2*; sin embargo, al elevar la concentración a 1 mM, la transcripción aumentó por más de veinte veces (Fernández-Larrea y Stahl 1996). En *G. graminis* var. *tritici* la adición de tan solo 40 μM de CuSO_4 al medio de cultivo

generó un patrón diferencial en la transcripción de los genes de lacasa *LAC1* y *LAC2*. Mientras que la transcripción del gen *LAC1* es independiente de cobre, la transcripción del gen *LAC2* incrementó al menos diez veces en presencia de cobre (Litvintseva y Henson 2002b). El análisis de la región regulatoria 5' de los genes *LAC1* y *LAC2* reveló la presencia de dos MREs y un ACE1 en el promotor del gen *LAC1* y de cuatro MREs y dos ACE1 en la región promotora del gen *LAC2*, siendo ésta posiblemente la razón por la cual ambos genes presentan un patrón transcripcional diferente (Litvintseva y Henson 2002b).

En los hongos basidiomicetos *P. ostreatus* (Palmieri *et al.* 2000), *T. pubescens* (Galhaup *et al.* 2002) y *Corioloopsis rigida* (Saparrat *et al.* 2010) se ha demostrado que el cobre está involucrado en la regulación de la transcripción de los genes de lacasa. Aun cuando se han descrito diversos elementos de regulación en *cis* (MREs y ACE₁) en la región promotora, a la fecha no se conoce en su totalidad el mecanismo exacto de cómo el cobre activa la transcripción de los genes de lacasa. Un conocimiento más detallado del mecanismo de regulación de la transcripción de los genes de lacasa puede contribuir a incrementar la producción de dichas enzimas, lo que permitiría purificar y caracterizar a la proteína con mayor eficiencia, esto podría ser de utilidad tanto para elucidar sus funciones biológicas como para el uso de esta enzima en biotecnología

Capacidad antagónica y expresión del gen *Talac1* durante la confrontación de *T. atroviride* IMI 206040 contra hongos fitopatógenos

La habilidad de *T. atroviride* IMI 206040 para inhibir el crecimiento de los hongos *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfsii* se evaluó en cultivo duales. *T. atroviride* inhibió el crecimiento de los hongos *R. solani* y *S. rolfsii* y fue incapaz de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum*, aunque sobrecreció rápidamente la colonia de los tres patógenos. El tipo de interacción que mostró *T. atroviride* sobre *R. solani* y *S. rolfsii* puede describirse como predación, mientras que con *F. oxysporum* se observó un mecanismo de parasitismo (Atanosova *et al.* 2013). Ambos procesos son altamente agresivos y destructivos, y en la mayoría de las ocasiones conducen a la aniquilación de la presa y al uso de los nutrientes liberados como alimento (Druzhinina *et al.*

2011). La actividad antagónica de *T. atroviride* y otras especies del género *Trichoderma* se ha atribuido a la producción de antibióticos, toxinas y enzimas hidrolíticas principalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que participan en la degradación de la pared celular del patógeno (Herrera-Estrella y Chen 2003). Sin embargo, a la fecha la contribución de las lacasas en dicho proceso ha sido poco investigada (Catalano *et al.* 2011). El estudio de la expresión del gen *Talac1* durante la confrontación directa de *T. atroviride* contra los hongos *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfisii* resultó en un patrón transcripcional distinto, dependiendo del patógeno en cuestión. Además, se encontró que la expresión del gen *Talac1* depende del estado de interacción antagonista – patógeno.

Catalano *et al.* (2011) reportaron el uso de la cepa $\Delta tku70$ para determinar la participación de la lacasa LCC1 de *T. virens* en micoparasitismo de esclerocios de los patógenos de plantas *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*. En dicho estudio encontraron que el gen *lcc1* está fuertemente expresado en etapas tempranas de la colonización de esclerocios de *B. cinerea* e inducido constantemente durante la colonización de esclerocios de *S. sclerotiorum*. La delección del gen *lcc1* (mutante $\Delta tku70\Delta lcc1$) alteró la habilidad de *T. viride* para degradar a los dos tipos de esclerocios. Mientras que la capacidad de degradación de esclerocios de *B. cinerea* se redujo significativamente, la degradación esclerocios de *S. sclerotiorum* fue mayor, sugiriendo la participación de diferentes mecanismos en el micoparasitismo de estos dos tipos de esclerocios por parte de la lacasa LCC1.

El trabajo de Catalano *et al.* (2011) y los resultados presentados en este trabajo sugieren una participación de la actividad de lacasa extracelular en el proceso de micoparasitismo por parte de *Trichoderma* spp., tanto contra esclerocios como contra micelio vegetativo de hongos fitopatógenos. Los estudios de expresión han generado evidencia a cerca de la participación de las lacasas extracelulares en procesos de patogénesis. En el hongo fitopatógeno *G. graminis* var. *tritici*, el gen *lac3* se expresa únicamente en planta o en presencia de homogeneizados de plantas, demostrando que la transcripción de algunas lacasas fúngicas es dependiente de la presencia del hospedero (Litvintseva y Henson, 2002). Los autores propusieron que la lacasa *lac3* degrada los depósitos de lignina producidos por la planta en respuesta

a la invasión y oxida/reduce fitoalexinas y otros compuestos tóxicos, facilitando la invasión del tejido. En el hongo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se encontró que los genes de lacasa *lac1*, *lac3* y *lac9* son potentes factores de virulencia y están expresados durante la infección de raíces y tallos de plantas de tomate. Se ha propuesto que las lacasas de *F. oxysporum* participan en la protección del hongo contra estrés oxidativo y compuestos tóxicos secretados por las plantas (Cordoba y Roncero 2008). También se ha documentado que la lacasa *CNLAC1* es el principal factor de virulencia del patógeno de humanos *Cryptococcus neoformans* (Zhu y Williamson 2004). *CNLAC1* es una enzima anclada a la membrana que participa en la síntesis de melaninas que le confieren a la célula resistencia contra oxidantes, proteínas microbicidas y antibióticos, además de alterar la carga celular superficial, haciéndolas más resistentes a la fagocitosis. Altos de niveles de expresión del gen *CNLAC1* se han reportado durante la invasión del tejido cerebral por parte de *C. neoformans* (Zhu y Williamson 2004).

Un resultado inesperado fue encontrar niveles relativamente altos de transcrito del gen *Talac1* en la confrontación de *T. atroviride* contra sí mismo, en relación a los niveles del mensajero observados en co-cultivo con hongos fitopatógenos. El principal incremento relativo se observó en la etapa de sobre-crecimiento. Este efecto sugiere activación transcripcional mediada por densidad celular. Fenómenos mediados por densidad celular se han descrito en la formación de biofilms (*quorum sensing*) en hongos, particularmente en el caso de transiciones morfológicas. Por ejemplo, la síntesis y secreción de alcoholes aromáticos que permiten la transición morfogenética de levadura al crecimiento filamentosos en *Saccharomyces cerevisiae*, es dependiente de la densidad celular (Chen y Fink, 2006). También se ha documentado que en *Candida albicans* se suprime la formación de hifas a altas densidades celulares (revisado en Hogan, 2006). No obstante, los ejemplos anteriores involucran la secreción de metabolitos mediada por densidad celular, y no de enzimas. Sin embargo, en el caso de *Aspergillus niger* recientemente se ha reportado que la formación de biofilms incrementa la producción de celulosa extracelular, en comparación con cultivos sumergidos o fermentación en sustrato sólido (Gamarra et al. 2010), algo que posiblemente está relacionado con la densidad

celular. Hasta donde sabemos, el estudio en *Aspergillus nidulans* es el único reporte de una enzima extracelular relacionada con la degradación de pared celular vegetal cuya inducción aumenta en biofilms. La posibilidad de que la actividad de lacasa extracelular de *T. atroviride* este mediada por densidad celular hace necesario el estudio de esta enzima en mayor profundidad, dadas las implicaciones fisiológicas y biotecnológicas de dicha hipótesis.

CONCLUSIONES

El hecho de que se cuente con el genoma completo de la cepa IMI 206040 *T. atroviride* representa una ventaja para el estudio fisiológico y bioquímico de la actividad extracelular de lacasa en el género *Trichoderma*. La inducción de la actividad de lacasa extracelular en la cepa IMI 206040 en presencia de distintas sustancias orgánicas, un sustrato complejo como el rastrojo de sorgo y el Cu^{+2} , es congruente con la presencia de diversos motivos de regulación en *cis* del gen *Talac1*, lo que sugiere una regulación transcripcional, lo cual se demostró para el caso del Cu^{+2} . El presente trabajo no descarta la posibilidad de que exista regulación postraducciona de la actividad de lacasa extracelular en *T. atroviride*. La respuesta diferencial de la transcripción del gen *Talac1* en los ensayos de confrontación de *T. atroviride* con distintos hongos fitopatógenos sugiere una respuesta específica de especie cuyas bases celulares y moleculares necesitan ser evaluadas a futuro. En ese sentido, sería interesante analizar la participación de los motivos MYC de regulación en *cis* en el encendido/apagado del gen *Talac1* durante la confrontación de *T. atroviride* contra distintos hongos fitopatógenos. Otra hipótesis que requiere una evaluación más detallada es la posible regulación de la transcripción del gen *Talac1* en respuesta a densidad celular (*quorum sensing*). El estudio de la actividad de lacasa extracelular en *T. atroviride* generó hipótesis relacionadas con funciones novedosas para la actividad de lacasa extracelular en hongos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abd El-Rahim, W.M., Moawad, H., Khalafallah, M. 2003. Microflora involved in textile dye waste removal. *Journal of Basic Microbiology*. 43(3): 167-174.
- [2] Ahlawat, O. P., Gupta, P., Kamal, S., Dhar, B. L. 2010. Variability in intra-specific and monosporous isolates of *Volvariella volvacea* based on enzyme activity, ITS and RAPD. *Indian Journal of Microbiology* 50(2): 192-198.
- [3] Alvarez J. M., Canessa, P., Mancilla, R. A., Polanco, R., Santibáñez, P. A., Vicuña, R. 2009. Expression of genes encoding laccase and manganese-dependent peroxidase in the fungus *Ceriporiopsis subvermispora* is mediated by an ACE1-like copper-fist transcription factor. *Fungal Genetics and Biology* 46: 104–111.
- [4] Andleeb, S., Atiq, N., Robson, G. D., Ahmed, S. 2012. An investigation of anthraquinone dye biodegradation by immobilized *Aspergillus flavus* in fluidized bed bioreactor. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 1728–37.
- [5] Atanasova, L., Crom, D. L., Gruber, S., Couplier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics* 14: 121.
- [6] Baldrian, P. 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215–242.
- [7] Bollag, J. M., Shuttleworth, K. L., Anderson, D. H. 1998. Laccase-neduated detoxification of phenolic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 3086–91.
- [8] Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- [9] Carbajo, J. M., Junca, H., Terrón, M. C. González, T., Yagüe, S., Zapico, C., González, A. E. 2002. Tannic acid induces transcription of laccase gene *cgllc1* in the White-rote fungus *Corioloropsis gallica*. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 1041–47.
- [10] Catalano, V., Vergara, M., Hauzenberger, J. R., Seiboth, B., Sarrocco, S., et al. 2011. Use a non-homologous end-joining-deficient strain (*delta-ku70*) of the biocontrol fungus *Trichoderma virens* to investigate the function of the laccase gene *lcc1* in sclerotia degradation. *Current Genetics* 57: 13–23.
- [11] Cázares-García SV, Vázquez-Garcidueñas MS, Vázquez-Marrufo G (2013) Structural and phylogenetic analysis of laccases from *Trichoderma*: a bioinformatics approach. *PLoS ONE* 8(1): E55295. Doi 10.1371/journal.pone.0055295.
- [12] Chakroun, H., Mechichi, T., Martinez, M. J., Dhouib, A., Sayadi, S. 2010. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry* 45: 507–513.

- [13] Chakroun, H., Mechichi, T., Martinez, M. J., Dhouib, A., Sayadi, S. 2010. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry* 45: 507–513.
- [14] Chawachart, N., Khanongnuch, C., Watanabe, T., Lumyong, S. 2004. Rice bran as an efficient substrate for laccase production from thermotolerant basidiomycete *Coriolus versicolor* strain RC3. *Fungal Diversity* 15: 23–32.
- [15] Chen, H., Fink, G. R. 2006. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes and Development* 20: 1150-1161.
- [16] Chung, H.J, Kwon, B. R., Kim, J. M., Park, S. M., Park J. K., Cha B. J., Yang M. S., Kim D. H. 2008. A tannic acid-inducible and hypoviral-regulated laccase3 contributes to the virulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Molecular Plant- Microbe Interactions* 21(12): 1582–1590.
- [17] Collins, P. J. Dobson, D. W. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(9): 3444–50.
- [18] Collins, P. J., Dobson, A. D. W., Field, J. A. 1997. Reduction of the 2.2'-azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) cation radical by physiological organic acids in the absence and presence of manganese. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2026–31.
- [19] Cordoba, C. D., Roncero, M. I. G. 2008. Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 98 (5): 509 – 519.
- [20] Cortes, C., Gutierrez, A., Olmedo, V., Inbar, J., Chet, I., Herrera-Estrella, A. 1998. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. *Molecular Genetics and Genomics* 260: 218–225.
- [21] Courty, P. E., Hoegger, P. J., Kilaru, S., Kohler, A., Buée, M., Garbaye, J., Martin, F., Kües, U. 2009. Phylogenetic analysis, genomic organization, and expression analysis of multi-copper oxidases in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *New Phytology* 182: 736–750.
- [22] Da Silva, M., Passarini, M.R., Bonugli, R.C., Sette, L.D. 2008. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. *Environmental Technology*. 29(12):1331-1339.
- [23] Dekker, R. F. H. Barbosa, A. M., Giese, E. C., Godoy S. D. S., Covizzi L. G. 2007. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International Microbiology* 10: 177–185.
- [24] Desai, S. S., Tennali, G. B., Channur, N., Snup, A. C., Deshpande, G., Azhar, M. B. P. 2011. Isolation of laccase producing fungi and partial characterization of laccase. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering* 1(4): 543–549.

- [25] Dhakar, K., Pandey, A. 2013. Laccase production form a temperature and pH tolerant fungal strain of *Trametes hirsuta* (MTCC 11397). *Enzyme Research* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/869062>.
- [26] Dodd, S. L., Lieckfeldt, E., Samuels G. J. 2003. *Hypocrea atrovirididis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* 95(1): 27–40.
- [27] Dong, J. L., Zhang, Y. W., Zhang, R. H., Huang, W. Z., Zhang, Y. Z. 2005. Influence of culture conditions on laccase production and isozymem patterns in the white-rote fungus *Trametes gallica*. *Journal of Basic Microbiology*. 3: 190–198.
- [28] Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M. et al. 2011 *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology* 9: 749–759.
- [29] Eggert, C., LaFayette, P. R., Temp, U., Eriksson, K. E. L., Dean, J. F. D. 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(5): 1766 – 72.
- [30] Eggert, C., LaFayette, P. R., Temp, U., Eriksson, K. E. L., Dean, J. F. D. 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1766-1772.
- [31] Elshafei, A. M., Hassan, M. M., Haroun, B. M. Elsayed, M. A., Othman, A. M. 2012. Optimization of laccase production from *Penicilliu martensii* NRC 345. *Advances in Life Sciences* 2(1): 31–37.
- [32] Esquivel-Naranjo, E. U., Herrera-Estrella, A. 2007. Enhanced responsiveness and sensitivity to blue light by *blr-2* overexpression in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 153: 3909–22.
- [33] Fan, F., Zhuo, R., Sun, S., Wan, X., Jiang, M., Zhang, X., Yang, Y. 2011. Cloning and functional analysis of a new laccase gene from *Trametes* sp. 48424 which had the high yield of laccase and strong ability for decolorizing different dyes. *Bioresource Technology* 102: 3126–37.
- [34] Fernández-Larrea, J., Stahl, U. 1996. Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserine*. *Molecular Genetics and Genomics* 252: 539–551.
- [35] Forootanfar, H., Moezzi, A., Aghaie-Khozani, M., Mahmoudjanlou, Y., Ameri, A., Niknejad, F., Faramarzi, M. A. 2012. Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. *Iranian Journal of Environmental Health Sciences and Engineering* 9:27.
- [36] Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C. K., Strauss, J., Haltrich, D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148: 2159–69.
- [37] Gamarra, N.N., Villena, G. K., Gutiérrez-Correa, M. 2010. Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(2): 545-

551. Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sanna, G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 369–385.
- [38] Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sanna, G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 369–385.
- [39] Gochev, V. K., Krastanov, A. I. 2007. Fungal laccases (Review) *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 13: 75–83.
- [40] Hao, J., Song, F., Huang, F., Yang, C., Zhang, Z., Zheng, Y., Tian, X. 2007. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34: 233–40.
- [41] Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Microbiology* 2: 43–56.
- [42] Hogan, D. A. 2006. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryotic Cell* 5(4):613–619.
- [43] Hölker, H., Ludwig, S., Scheel, T., Höfer, M. 1999. Mechanisms of coal solubilization by the deuteromycetes *Trichoderma atroviride* and *Fusarium oxysporum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 57–59.
- [44] Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C., Yan, B. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry* 39: 1415–19.
- [45] Iqbal, H., Kapoor, A. 2012. Culture conditions for the production of tannase from *Trichoderma harzianum* MTCC 10841. *International Journal of Science and Technology* 1(11): 584–595.
- [46] Janusz, G., Rogalski, J., Barwinska, M., Szczodrak, J. 2006. Effects of culture conditions on production of extracellular laccase by *Rhizoctonia praticola*. *Polish Journal of Microbiology*. 55(4): 309–319.
- [47] Jarosz-Wilkolazka, A., Ruzgas, T., Gorton, L. 2005. Amperometric detection of mono- and diphenols at *Cerrena unicolor* laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure. *Talanta* 66:1219–24.
- [48] Johannes, C., Majcherczyk, A. 2000. Laccase activity test and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* 78(2): 193–199.
- [49] Jones, J. D. G., Dunsmuir, P., Bedbrook, J. 1985. High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. *The EMBO Journal* 4(10): 2411–18.
- [50] Kaur, J., Munshi, G.D., Singh, R. S. Koch, E. 2005. Effect of carbon source on production of lytic enzymes by the sclerotial parasites *Trichoderma atroviride* and *Coniothyrium minitans*. *Journal of Phytopathology* 153(5): 274–279.

- [51] Kiiskinen, L. L., Rättö, M., Kruus, K. 2004. Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology* 97: 640–646.
- [52] Kim, D. H., Rigling, D., Zhang, L., van Alfred, N. K. 1995. A new extracellular laccase of *Cryphonectria parasitica* is revealed by deletion of *Lac1*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8(2): 259–266.
- [53] Kovacs, K., Macrelli, S., Szakacs, G, and Zacchi G. 2009. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnology for Biofuels* 2:14 doi:10.1186/1754-6834-2-14
- [54] Kumar, S. R., Surech, K. R., Jitender, K. R. 2012. Decolorization of Reactive Black HFGR by *Aspergillus sulphureus*. *ISCA Journal of Biological Sciences* 1(1): 55–61.
- [55] Kunamneni, A., Ballesteros, A., Plou, F. J., Alcalde, M. 2007. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Mendez-Vilas, A. Ed., pp. 233–244, Formatex, Badajoz, Spain, 2007.
- [56] Levasseur, A., Saloheimo, M., Navarro, D., Andberg, M., Pontarotti, P., Kruus, K., Record, E. 2010. Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete *Trichoderma reesei*: a functional, phylogenetic and evolutionary study. *BMC Biochemistry*. 11: 32.
- [57] Levin, L., Forchiassin, F. 2001. Ligninolytic enzymes of the White rot basidiomycete *Trametes trogii*. *Acta Biotechnologica* 21(2): 179–186.
- [58] Levin, L., Papinutti, L., Forchiassin, F. 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology* 94: 169–176.
- [59] Litvintseva, A. P., Henson, J. M. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(3): 1305–11.
- [60] Martin, C., Pecyna, M., Kellner, H., Jehmlich, N., Junghanns, C., Benndorf, D., von Bergen, M., Schlosser, D. 2007. Purification and biochemical characterization of a laccase from the aquatic fungus *Myriocoonium* sp. UHH 1-13-18-4 and molecular analysis of the laccase-encoding gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 613–624.
- [61] Marx, I. S., van Wik, N., Smit, S., Jacobson, D., Viljoen-Bloom, M., Volschenk, H. 2013. Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels* 6: 172.
- [62] Matarese, F., Sarrocco, S., Gruber, S., Seidl-Seiboth, V., Vannacci, G. 2012. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Mycrobiology* 158: 98–106.

- [63] Monte E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology* 4: 1–4.
- [64] Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., Yaropolov, A. I. 2007. “Blue” Laccases. Review. *Biochemistry (Moscow)* 72(10): 1136–1150.
- [65] Mueller-Harvey, M. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 91(1–2): 3–20.
- [66] Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., Kenerley, C. M. 2013. *Trichoderma* research in the genome Era. *The Annual Review of Phytopathology* 51: 105–129.
- [67] Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., Enei, H. 2002. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes* and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 327–335.
- [68] Nemeč, T., Jernejc, K. 2002. Influence of tween 80 on lipid metabolism of an *Aspergillus niger* strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 101(3): 229–238.
- [69] Nyanhongo, G. S., Gomes, J., Gübitz, G. M., Zvauya, R., Read, J., Steiner, W. 2002. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research* 36: 1449–56.
- [70] Palmieri, G., Giardina, P., Sannia, G. 2005. Laccase-mediated Remazol Brilliant Blue R decolorization in a fixed-bed bioreactor. *Biotechnology Progress* 21(5): 1436–41.
- [71] Pezzella, C., Autore, F., Giardina, P., Piscitelli, A., Sannia, G., Faraco, V. 2009. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Current Genetics* 55: 45–57.
- [72] Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., Faraco, V. 2011. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics* 12: 104–112.
- [73] Pointing, S. B., Vrijmoed, L. L. P. 2000. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 317–318.
- [74] Ranka, K., Chato, B. B. 2011. Biochemical characterisation of two novel laccases from *Magnaporthe grisea*. *Journal of Yeast and Fungal Research* 2(10): 153–164.
- [75] Reithner, B., Ibarra-Laclette, E., Mach, L. R., Herrera-Estrella, A. 2011. Identification of mycoparasitism-related genes in *Trichoderma atroviride*. *Applied and Environmental Microbiology* 77(13): 4361–70.

- [76] Rühl, M., Majcherczyk, A., Kües, U. 2013. Lcc1 and Lcc5 are the main laccases secreted in liquid cultures of *Coprinopsis cinerea* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 103: 1029–39.
- [77] Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. 2007. Exploitation of *Trichoderma harzianum* mycelial waste for the removal of rhodamine 6G from aqueous solution. *Journal of Environmental Management*. 85(1): 155-161.
- [78] Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. 2009. Redox-mediated decolorization of recalcitrant textile dyes by *Trichoderma harzianum* WL1 laccase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 1733–1741.
- [79] Saldanha, R. L. Garcia, J. E., Dekker, R. F. H., Vilas-Boas, L. A., Barbosa, A. M. 2007. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:259-264.
- [80] Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- [81] Saparrat, M., Balatti, P. A., Martínez, M. J., Jurado, M. 2010. Differential regulation of laccase gene expression in *Coriopsis rigida* LPSC No. 232. *Fungal Biology* 114: 999–06.
- [82] Schouten, A., Maksimova, O., Cuesta-Arenas, Y., van der Berg, G., Raaijmakers, J. M. 2008. Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environmental Microbiology* 10(5): 1145–57.
- [83] Schouten, A., Wagemakers, L., Stefanato, F. L., van der Kaaij R. M., van Kan J. A. L. 2002. Resveratrol acts as a natural antifungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. *Molecular Microbiology* 43(4): 883–894.
- [84] Schuster, A., Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 787–99.
- [85] Shapiro, M. B., Senepathy, P. 1987. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Research* 15(17): 7155–74.
- [86] Sharma, K. K., Kapoor, M. Kuhad, R. C. 2005. *In vivo* enzymatic digestion, *in vitro* xylanase digestion, metabolic analogues, surfactants and polyethylene glycol ameliorate laccase production from *Ganoderma* sp. kk-02. *Letters in Applied Microbiology* 41: 24–31.
- [87] Sivasamy, A., Sundabharal, N. 2011. Biosorption of an azo dye by *Aspergillus niger* and *Trichoderma* sp. fungal biomasses. *Current Microbiology*. 62(2):351-357.
- [88] Souza, C. G. M., Zilly, A., Peralta, R. M. 2002. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *The Journal of Basic Microbiology* 42: 83–90.

- [89] Stajiã, M., Vukojeviã, J., Duletiã-Lauševiã, S. 2007. Influence of the cultivation conditions on ligninolytic enzyme production in *Pleurotus pulmonarius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: 303–312.
- [90] Steyaert, J. M., Stewart, A., Jaspers, M. V., Carpenter, M., Ridgway, H. J. 2004. Co-expression of two genes, a chitinase (*chit42*) and proteinase (*prb1*), implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hamatum*. *Mycologia* 96(6): 1245–52.
- [91] Tamayo-Ramos, J. A., Barends, S., Verhaert, R. M. D., de Graaff, L. H. 2011. The *Aspergillus niger* multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccase-like encoding genes. *Microbial Cell Factories* 10(1): 78.
- [92] Terrón, M. C., López-Fernández, M., Carbajo, J. M., Junca, H., Téllez, A., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., González, T., González, A. E. 2004. Tannic acid interferes with the commonly used laccase-detection assay base don ABTS as the substrate. *Biochimie* 86: 519–522.
- [93] Thiele, D. J. 1992. Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 20(6): 1183–91.
- [94] Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Mycrobiology* 140: 19–26.
- [95] Vite-Vallejo, O., Palomares, L. A., Dantán-González, E., Ayala-Castro, H. G., Martínez-Anaya, C. *et al.* 2009. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology* 45: 233–239.
- [96] Xiao, Y. Z., Hong, Y. Z., Li, J. F., Hang, J., Tong, P. G., Fang, W., Zhou, C. Z. 2006. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 493–501.
- [97] Zhu, X., Williamson, P. R. 2004. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research* 5: 1–10.

V. CONCLUSIONES GENERALES

1. El sistema de lacasas *sensu stricto* en el género *Trichoderma* es relativamente simple, encontrándose en el estado ancestral un gen de actividad intracelular y uno de actividad extracelular. Según esta hipótesis las especies modernas del género: i) han retenido el estado ancestral, ii) han perdido la actividad extracelular y iii) han adquirido genes de actividad ancestral mediante transferencia horizontal.
2. La hipótesis de este trabajo es falsa, ya que debido a la adquisición de genes mediante transferencia horizontal no todas las lacasas extracelulares del género *Trichoderma* están codificadas por genes relacionados estructural y filogenéticamente.
3. En general, la aplicación de ensayos de decoloración/oxidación en placa son una buena herramienta para seleccionar cepas con actividad de lacasa extracelular en el género *Trichoderma*; no obstante, en algunos casos se pueden seleccionar cepas con otro tipo de actividades extracelulares incluidos otros miembros de la familia de las Multicobre Oxidasas.
4. Los iniciadores específicos para la amplificación mediante PCR de genes de lacasa extracelular en especies del género *Trichoderma*, usados en conjunto con ensayos de decoloración/oxidación, permiten discriminar cepas que poseen lacasas *sensu stricto* de aquellas que tienen otro tipo de Multicobre Oxidasas, optimizando el proceso de selección de cepas.
5. Tanto el análisis bioinformático estructural de la proteína deducida como las cinéticas de actividad extracelular en cepas silvestres y la cepa IMI 206040 sugieren una capacidad catalítica diferencial interespecífica de las lacasas extracelulares *sensu stricto* en el género *Trichoderma*.

6. El gen *Talac1*, que codifica para la lacasa extracelular en *T. atroviride*, está sujeto a regulación transcripcional por la presencia de CuSO_4 , lo que puede asociarse a la presencia de elementos en *cis* de respuesta a metales (MREs) y específicamente a cobre (ACE_1) en la región regulatoria del gen.

7. Existe una regulación transcripcional patógeno-específica del gen *Talac1* de *T. atroviride*, cuyas bases bioquímicas y genéticas se desconocen; también hay indicios de una respuesta transcripcional mediada por densidad celular (*quorum sensing*) en dicho gen.

VI. PERSPECTIVAS

1. Es importante obtener mutantes del gen de lacasa extracelular en las diferentes especies del género *Trichoderma*. Esto permitirá evaluar el papel fisiológico de las lacasas en distintas condiciones de crecimiento.

2. La purificación de la lacasa extracelular permitirá evaluar en mayor detalle las posibles diferencias catalíticas entre especies del género *Trichoderma* y conocer más a fondo el potencial biotecnológico de las proteínas purificadas.

3. El análisis bioinformático de otros genomas de especies del género *Trichoderma* liberados posteriormente a la realización de este estudio permitirá ampliar el análisis evolutivo de la función de lacasa en este grupo taxonómico.

4. La aplicación del análisis genómico, transcriptómico y proteómico a las cepas silvestres del género *Trichoderma* aquí estudiadas sin duda es necesaria para tener un panorama más preciso del papel fisiológico y ecológico de las lacasas y otras Multi Cobre Oxidasas en este grupo de hongos.