



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



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

***CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA SILVESTRE DE DIDYMOSPHERIA SP.
(SIN.= PARACONIOTHYRIUM BRASILIENSE SENSU LATO) Y APLICACIONES
DERIVADAS DE SU ACTIVIDAD LIGNINOLÍTICA***

QUE PRESENTA:

M.C. MARINA ARREDONDO SANTOYO

PARA OBTENER EL GRADO DE

DRA. EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN: BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR AGROPECUARIA

ASESOR:

DR. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

Morelia, Michoacán. Agosto de 2018

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Se agradece al CONACYT el apoyo brindado mediante la beca con registro No. 226634 para la realización de estudios de posgrado. Este proyecto se realizó con el apoyo parcial de la CIC-UMSNH en su Programa de Investigación 2018.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
I. RESUMEN GENERAL.....	1
ABSTRACT.....	2
II. INTRODUCCIÓN GENERAL	
Asociación entre los géneros <i>Didymosphaeria</i> y <i>Paraconiothyrium</i> y sus taxa asociados, diversidad taxonómica y de estilos de vida con amplio potencial biotecnológico	3
II.1 Consideraciones taxonómicas y filogenéticas de <i>Paraconiothyrium</i>.....	6
II.2 Estilos de vida y ambientes de aislamiento.....	11
II.2.1 Fitopatógenos y endófitos.....	11
II.2.2 Saprotismo y otros estilos de vida.....	12
II.3 Impacto en salud humana.....	14
II.4 Producción de metabolitos secundarios.....	15
II.5 Interacción con metales.....	18
II.6 Enzimas extracelulares y aplicaciones biotecnológicas derivadas.....	20
II.7 Omicas.....	22
II.8 Misceláneo.....	23
III. JUSTIFICACIÓN.....	35
IV. HIPÓTESIS.....	35
V. OBJETIVOS.....	35
V.1 Objetivo general.....	35
V.2 Objetivos particulares.....	35

VI. RESULTADOS	37
VI.1 CAPÍTULO I. Identification and characterization of the biotechnological potential of a wild strain of <i>Paraconiothyrium</i> sp.....	38
VI.2 CAPÍTULO II. Análisis experimental y bioinformático del complejo de enzimas ligninolíticas en <i>Didymosphaeria</i> sp.....	51
VI.3 CAPÍTULO III. Producción de lacasa extracelular del hongo ascomicete <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin.= <i>Paraconiothyrium brasiliense sensu lato</i>) en presencia de rastrojo de maíz y digestibilidad ruminal <i>in vitro</i> del tratamiento fúngico de dicho sustrato.	78
VI.4 CAPÍTULO IV. Purificación y caracterización de la lacasa extracelular de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin.= <i>Paraconiothyrium brasiliense sensu lato</i>).....	106
VII. DISCUSIÓN GENERAL	139
VIII. PERSPECTIVAS	145
IX. CONCLUSIÓN GENERAL	146
ANEXO 1. Pared celular de las plantas: Función, estructura y aplicaciones. Saber Más Revista de Divulgación.	147

ÍNDICE DE FIGURAS

VI. RESULTADOS

VI.1 CAPÍTULO I

No. de figura	Título	
1	Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the ribosomal ITS region of strain CMU-196.....	43
2	Decolorization of aqueous solutions of synthetic dyes by strain CMU-196.....	44
3	Decolorization of wastewater from the paper industry by strain CMU-196.....	45
4	Growth kinetics and extracellular laccase activity of strain CMU-196.....	45
5	Antagonism and growth inhibition of phytopathogenic fungi and oomycetes by strain CMU-196.....	46
6	Inhibition and growth of phytopathogenic fungi and oomycetes in confrontation with strain CMU- 196.....	47

VI.2 CAPÍTULO II

No. de figura	Título	
1	Diseño de oligos para la amplificación completa del gen <i>lac</i> de <i>P. brasiliense</i>	59
2	Cinéticas de crecimiento y actividades extracelulares de LiP y MnP de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin= <i>P. brasiliense sensu lato</i>) basales e inducidas.....	62
3	Patrones de amplificación mediante PCR	63

4	Estructura del gen <i>lac</i> de <i>Didymosphaeria</i> spp. y <i>Paraconiothyrium sporulosum</i>	64
5	Alineamiento de secuencias de lacasas de <i>Didymosphaeria</i> spp. <i>Paraconiothyrium sporulosum</i>	66
6	Análisis filogenético de lacasas <i>Didymosphaeria</i> spp. y <i>Paraconiothyrium sporulosum</i>	67

VI.3 CAPÍTULO III

No. de figura	Título	
1	Cinética de crecimiento y actividad extracelular de lacasa de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin= <i>P. brasiliense sensu lato</i>) en presencia de rastrojo de maíz.....	89
2	Modificaciones estructurales del rastrojo de maíz tratado con la cepa CMU-196 de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin= <i>P. brasiliense sensu lato</i>).....	91
3	Producción de gas de la fermentación ruminal <i>in vitro</i> de rastrojo de maíz tratado con la cepa CMU-196 <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin= <i>P. brasiliense sensu lato</i>).....	94
4	Digestibilidad de FDN de rastrojo de maíz tratado y no tratado con la cepa CMU-196 de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin= <i>P. brasiliense sensu lato</i>).....	95

VI.4 CAPÍTULO IV

No. de figura	Título	
1	Cromatogramas de los pasos de purificación de la lacasa extracelular de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin= <i>Paraconiothyrium</i>	

	<i>brasiliense sensu lato</i>).....	116
2	Perfil electroforético de los pasos de purificación de la lacasa extracelular de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin.= <i>Paraconiothyrium brasiliense sensu lato</i>).....	118
3	Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de lacasa purificada de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin.= <i>Paraconiothyrium brasiliense sensu lato</i>).....	119
4	Estabilidad termica de la lacasa de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin.= <i>Paraconiothyrium brasiliense sensu lato</i>).....	120
5	Efecto de cationes divalentes e inhibidores sobre la actividad de la lacasa de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin.= <i>Paraconiothyrium brasiliense sensu lato</i>).....	121

ÍNDICE DE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

No. de tabla	Título	
1	Especies del género <i>Paraconiothyrium</i>	9

VI. RESULTADOS

VI.1 CAPÍTULO 1

No. de tabla	Título	
1	Data of Wild Isolates of Phytopathogenic Microorganisms....	40
2	Assimilation Efficiency of Carbon and Nitrogen Sources by Strain CMU-196.....	44

VI.2 CAPÍTULO II

No. de figura	Título	
1	Oligonucleotidos diseñados para la amplificación del gen <i>lac</i>	59
2	Características estructurales de las lacasas de <i>Didymosphaeria</i> spp. <i>Paraconiothyrium sporulosum</i>	65

VI.3 CAPÍTULO III

No. de tabla	Título	
1	Actividad extracelular de lacasa de la cepa CMU-196 en presencia de rastrojo de maíz y extracto de rastrojo.....	90
2	Análisis bromatológico de los tratamientos de rastrojo con la cepa CMU-196 y controles WI e IS.....	92

VI.4 CAPÍTULO IV

No. de tabla	Título	
1	Resumen de purificación de lacasa de de la lacasa extracelular de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin.= <i>Paraconiothyrium brasiliense sensu lato</i>).....	117
2	Efecto de iones divalentes en la actividad de la lacasa de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin.= <i>Paraconiothyrium brasiliense sensu lato</i>).....	122
3	Efecto de típicos inhibidores de la actividad de lacasa de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin.= <i>Paraconiothyrium brasiliense sensu lato</i>).....	123
4	Parámetros cinéticos de la lacasa de <i>Didymosphaeria</i> sp. (sin.= <i>Paraconiothyrium brasiliense sensu lato</i>).....	124

I. RESUMEN GENERAL

En este trabajo se caracterizó a la cepa CMU-196 aislada en el estado de Michoacán, inicialmente identificada como *Paraconiothyrium brasiliense* mediante filogenia molecular empleando la región ITS de rDNA, pero posteriormente asignada a *Didymosphaeria* sp. La cepa CMU-196 fue capaz de metabolizar 57 de 95 sustratos de las placas Biolog, incluidas dextrinas y glicógeno, así como la α -D-lactosa, inductora de enzimas celulolíticas pero asimilada pobremente por los hongos. También fue capaz de antagonizar e inhibir el crecimiento *in vitro* de hongos y oomicetes fitopatógenos de los géneros *Colletotrichum* y *Phytophthora*, respectivamente, así como de decolorar colorantes fenólicos y agua residual de la industria papelera. Se detectó la actividad extracelular de las enzimas ligninolíticas lacasa (LAC), manganeso peroxidasa (MnP) y lignin peroxidasa (LiP) en la cepa CMU-196. Sin embargo, evidencia genómica y proteómica generada por otros grupos de investigación durante el desarrollo del presente trabajo mostró que los ascomicetes no poseen genes que codifiquen para MnP y LiP. El rastrojo de maíz incrementa la actividad de LAC extracelular de la cepa CMU-196 con respecto a medio caldo de papa basal, y ensayos de fermentación en sustrato sólido mostraron que la cepa de interés delignifica significativamente dicha biomasa, mejorando su digestibilidad ruminal *in vitro*. La LAC extracelular purificada de la cepa de estudio mostró una masa molecular de 98 kDa y condiciones catalíticas óptimas a pH 4.5 y 60 °C, con alta afinidad por ABTS y dimetoxifenol (DMP). La secuencia de aminoácidos de la LAC extracelular de la cepa CMU-196 obtenida *in silico* presenta los motivos de una lacasa *sensu stricto* de ascomicetes y el análisis filogenético muestra una estrecha relación con las enzimas de *Paraconiothyrium sporulosum* y del ascomicete fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.

Palabras clave: *Paraconiothyrium*, enzimas ligninolíticas, aplicaciones biotecnológicas, caracterización bioquímica, caracterización *in silico*.

ABSTRACT

In this work, strain CMU-196 isolated in the state of Michoacán was characterized; identified at first as *Paraconiothyrium brasiliense* through molecular phylogeny using the ITS¹ region of rDNA², but later assigned to *Didymosphaeria* sp. Strain CMU-196 was able to metabolize 57 out of 95 substrates of Biolog plates, including dextrans and glycogen, as well as α -D-lactose, an inducer of cellulolytic enzymes poorly assimilated by fungi. It was also able to antagonize and inhibit *in vitro* growth of phytopathogenic fungi and oomycetes of *Colletotrichum* and *Phytophthora* genera, respectively, as well as to decolorize phenolic dyes and wastewater from paper industry. Extracellular activity of ligninolytic enzymes laccase (LAC), manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP) was detected in strain CMU-196. However, genomic and proteomic evidence generated by other research groups during the development of this work revealed that ascomycetes do not have genes coding for MnP and LiP. Corn straw significantly increases extracellular LAC activity of CMU-196 strain related to basal potato medium broth and solid state fermentation assays showed that studied strain considerably delignificates this biomass, improving its *in vitro* ruminal digestibility. Purified extracellular LAC of studied strain showed a 98 kDa³ molecular mass and optimal catalytic conditions at pH 4.5 and 60°C, with high affinity for ABTS⁴ and dimethoxyphenol (DMP). The *in silico* obtained amino acid sequence of extracellular LAC of the strain CMU-196 presents the domains and motifs of a laccase *sensu stricto* of ascomycetes, and the phylogenetic analysis shows a close relationship with the enzymes of *Paraconiothyrium sporulosum* and phytopathogenic ascomycete *Fusarium oxysporum*.

Key words: *Paraconiothyrium*, ligninolytic enzymes, biotechnological applications, biochemical characterization, *in silico* characterization.

¹ From English acronym of Internal Transcribed Spacer

² From English acronym of ribosomal Deoxyribonucleic Acid

³ From acronym of kiloDalton

⁴ From acronym of 2,2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulphonic Acid)

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

“Asociación entre los géneros *Didymosphaeria* y *Paraconiothyrium* y sus taxa asociados, diversidad taxonómica y de estilos de vida con amplio potencial biotecnológico”

Artículo de revisión científica concluido para postularse a la revista
Mycoscience

Asociación entre los géneros *Didymosphaeria* y *Paraconiothyrium* y sus taxa asociados, diversidad taxonómica y de estilos de vida con amplio potencial biotecnológico

Marina Arredondo- Santoyo¹, 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. Km 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro, Col. La Palma, CP 58893. Tarímbaro, Michoacán, México.

² División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Ave. Rafael Carrillo esq. Dr. Salvador González Herrejón, Col. Cuauhtémoc, CP 58020. Morelia, Michoacán, México.

* Autor para correspondencia:

Dr. Gerardo Vázquez-Marrufo
Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro
Col. La Palma
Tarímbaro, Michoacán CP 58262
Tel/Fax: +52 01 443 2 95 80 29
E-mail: gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx

RESUMEN

El género *Paraconiothyrium* fue descrito por primera vez en 2004 y a la fecha cuenta con 16 especies. Desde su descripción el género ha mantenido un reacomodo de especies muy dinámico, incluyendo nuevas especies y excluyendo especies acomodadas previamente dentro de él. Las especies de *Paraconiothyrium* y taxa relacionados presentan diferentes estilos de vida, incluyendo el saprofitismo, endofitismo, micoparasitismo y fitopatogénesis. Algunas especies causan infecciones en humanos, por lo que tienen relevancia en salud pública. A la fecha se ha reportado la producción de por lo menos 44 metabolitos secundarios distintos producidos principalmente por distintas cepas de *P. variable*. Los metabolitos producidos por *Paraconiothyrium* spp. incluyen terpenoides, del tipo di- y triterpenoides, terpenoides cíclicos y glicósidos diterpénicos; también se han identificado furanonas y una lactona. Dichos metabolitos presentan actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer humano, aunque también se ha identificado actividad antibacteriana y antifúngica en extractos orgánicos. La única actividad enzimática extracelular analizada de manera detallada en especies del género es la lacasa, reportada únicamente en *Didymosphaeria variable* (sin=*P. variable*) y *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense sensu lato*). La lacasa de dichas especies muestra eficiencia para la decoloración de distintos colorantes sintéticos, la degradación de sustancias farmacológicas, la síntesis de nanopartículas de oro y la aplicación en biosensores para la detección de catecol. La interacción de *Paraconiothyrium* spp. con minerales es explorada para la generación de nanotubos para recuperar metales. El reporte del genoma y el secretoma de *P. sporulosum* reveló mecanismos específicos para la degradación de fuentes de carbono que pueden ser explotados biotecnológicamente para la degradación de biomasa vegetal. En la presente revisión se cubren los aspectos taxonómicos, ecológicos, médicos y biotecnológicos de las especies del género *Paraconiothyrium* y taxa estrechamente relacionados entre los cuales ha habido reacomodo de especies.

Palabras clave: *Paraconiothyrium*, ascomycota, diversidad, metabolitos secundarios, lacasa.

I.1 Consideraciones taxonómicas y filogenéticas de *Paraconiothyrium*

El género *Paraconiothyrium* fue descrito apenas en el año 2004, incluyendo inicialmente a las nuevas especies *P. estuarinum*, *P. brasiliense*, *P. cyclothyrioides* y *P. fungicola* (Verkley et al., 2004), siendo el holotipo del género la primera. Las especies inicialmente descritas dentro del nuevo género presentaron características de la fase asexual (anamórficas) claramente distintivas de otros grupos dentro de los Coelomycetes. El análisis filogenético empleando la secuencia completa de la región ITS y parcial de la SSU (18S) de nrDNA sugirió a Verkley et al. (2004) que las fases sexuales (teleomorfos) de las especies de *Paraconiothyrium* se encontraban dentro de los Pleosporales, particularmente en el género *Paraphaeosphaeria* O.E. Erikss. Posteriormente se separó a *Paraconiothyrium* y *Paraphaeosphaeria* como dos géneros distintos dentro de la familia *Didymosphaeriaceae* (Verkley et al., 2014). En la descripción inicial del género se consideró la inclusión de las especies previamente descritas como *Coniothyrium minitans*, *Coniothyrium sporulosum*, sugiriendo cambiar sus nombres a *P. minitans* y *P. sporulosum*, respectivamente. Un análisis filogenético posterior generó evidencia para acomodar a esas dos especies dentro del género *Paraphaeosphaeria*, como *Paraph. minitans* y *Paraph. sporulosa*, respectivamente (Verkley et al., 2014). No obstante, Zhang et al. (2012) mostró mediante filogenia multilocus que los estados sexuales de *Paraconiothyrium* están relacionados con *Paraphaeosphaeria michotii* (Westend.) O.E. Erikss. y *Paraph. pilleata* Kohlm et al.

Junto con la incorporación de las especies de nueva descripción *P. variable* y *P. africanum*, la evidencia filogenética empleando distintas regiones de la Unidad Ribosomal mostró que *Microdiplodia hawaiiensis* (Crous and Groenewald, 2006) se agrupaba con el resto de especies de *Paraconiothyrium*, por lo que se sugirió el cambio a *P. hawaiiense* (Damm et al., 2008). La siguiente especie de nueva descripción en incorporarse al género fue *P. babiogorensis*, a

partir de una aislado obtenido de plántulas del musgo *Huperzia selago* en Polonia (Budziszewska et al., 2011). Posteriormente se agregó al género a la nueva especie *P. maculicutis*, así como las especies *P. flavescens*, *P. fuckelii*, *P. fuscomaculans*, *P. lini* y *P. tiliae*, inicialmente asignadas a otros géneros (de Gruyter et al., 2013). La especie de nueva descripción más recientemente incluida dentro del género es *P. hakeae* (Crous et al., 2017). Evidencia morfológica y filogenética sugiere que *Microsphaeropsis pseudaspera* pertenece a *Paraconiothyrium*, aunque sin los datos de la cepa tipo no fue posible realizar conclusiones definitivas al respecto (Verkley et al., 2014).

La morfología de las conidias de *Paraconiothyrium* es parecida a las de los géneros *Coniothyrium sensu stricto* y *Alloconiothyrium* ya que poseen conidias con 0-1 septos; sin embargo, análisis filogenético detallado muestra que el primer taxón se encuentra dentro de la familia *Pleosporineae* (Wijayawardene et al. 2014), y aunque el segundo género y *Paraconiothyrium* están dentro de *Didymosphaeriaceae*, son distintos (Hyde et al., 2013; Ariyawansa et al., 2014a; Wijayawardene et al., 2014). Adicionalmente, análisis filogenético realizado empleando las subunidades SSU y LSU de rDNA sugiere que algunas especies que se consideran dentro de *Paraconiothyrium* podrían estar en otros grupos taxonómicos. Por ejemplo, *P. flavescens* (cepa CBS 178.93 en Genbank) se agrupa con las especies *Pseudocoleophoma calamagrostidis* y *Pseudocoleophoma polygonicola* dentro de la familia *Dictyosporiaceae*, de reciente descripción (Boonmee et al., 2016). Aún dentro de la familia *Didymosphaeriaceae*, la especie *P. fuckelii* (cepa CBS 797.95 de Genbank) se agrupa con *Pseudocamarosporium cotinae* y *P. tiliae* (cepa CBS 265.94 de Genbank) con *Neokalmusia brevispora* (Boonmee et al., 2016). Ariyawansa et al. (2014a) encuentran que el holotipo de *P. brasiliense* se agrupa con *Didymosphaeria rubi-ulmifolii*, por lo que lo consideran sinonimia. Otras cepas descritas como *P. brasiliense* no se agrupan como *D. rubi-ulmifolii*, y ante la carencia de evidencia morfológica para proponer una especie nueva sugieren que esas cepas seas consideradas como *Didymosphaeria* sp.; de la misma manera,

proponen que *P. variable* debe quedar asociado como sinónimo de *Didymosphaeria variable*. El carácter parafilético del género *Paraconiothyrium* ha quedado de manifiesto en diferentes estudios (Verkley et al., 2014; Boonmee et al., 2016; Crous et al., 2017), por lo que la propuesta de 16 especies actualmente dentro de dicho taxón (Tabla 1) puede seguir variando conforme se genere nueva evidencia genético molecular, morfológica y ecológica.

Como se comentó anteriormente, uno de los géneros estrechamente relacionados con *Paraconiothyrium* y con el que se han reasignado especies, es el género *Didymosphaeria*, el cuál ha sido revisado recientemente (Ariyawansa et al., 2014 a, b), de donde se extrajo la siguiente información. Dicho género fue descrito por Fuckel en 1870 para tres especies de ascomicetes que presentaban ascosporas de dos células, reconociéndose posteriormente siete especies que incluyen a *D. bisphaerica*, *D. conoidea*, *D. dimastospora*, *D. futilis*, *D. massarioides*, *D. oblitescens* y *D. spinosa*; recientemente se incluyó a *D. rubi-ulumifolii* y se consideró que la situación taxonómica de *D. decolorans* está por definirse, debido a su naturaleza fungícola y a la estructura del peridio (Ariyawansa et al., 2014 b). Posteriormente se describió a *D. igniaria* como la fase sexual de *Periconia igniaria* (Booth, 1968), la cual después fue reasignada como *Massarina igniaria* de la familia *Massarinaceae* (Aptroot 1998). Adicionalmente, la especie tipo del género, *D. futilis* aun presenta problemas taxonómicos para su correcta clasificación. Los estados asexuales de las especies del género se han asociado a *Ascochyta*, *Periconia*, *Fusicladiella* y *Phoma*, pero no son asociaciones claras, por lo que se considera que no existe certidumbre en la fase anamórfica de *Didymosphaeria*.

El rápido incremento en la descripción de especies dentro de géneros con afinidades filogenéticas, así como la información taxonómica, ecológica, biotecnológica y de salud humana de especies de *Paraconiothyrium* y *Didymosphaeria* hace interesante revisar este grupo taxonómico desde una perspectiva amplia e integral, que permita delinear el potencial biotecnológico de las especies dentro del taxón y evaluar la posible diversidad de funciones

ecológicas de estos grupos de hongos estrechamente relacionados, algunos de descripción reciente y otros con reacomodos constantes desde hace más de un siglo.

Tabla 1. Especies del género *Paraconiothyrium* y taxa relacionados.

Especie	Procedencia/Tipo de muestra de aislamiento del holotipo	Referencia
<i>P. estuarinum</i> Verkley & M. da Silva	Brasil, aislado de un sedimento estuarino contaminado con descargas industriales. Holotipo del género.	Verkley et al. 2004
<i>P. cyclothyrioides</i> Verkley	Papua New Guinea, aislado de una muestra de suelo.	
<i>P. fungicola</i> Verkley & Wicklow	E.U., área de pantano, colonizando al basidiocarpo de poliporáceo resupinado creciendo en la rama de un árbol muerto.	
<i>P. africanum</i> Damm, Verkley & Crous	Sudáfrica, aislado de un picinido de corteza de <i>Prunus persica</i> .	Damm et al., 2008
<i>P. hawaiiense</i> (Crous) Damm, Crous & Verkley	Basionym. <i>Microdiplodia hawaiiensis</i> Crous.	
<i>P. babiogorensis</i> Budziszewska	Polonia, endófito del musgo de abeto <i>Huperzia selago</i> (Huperziaceae).	Budziszewska et al., 2011
<i>P. flavescens</i> (Gruyter, Noordel. & Boerema) Verkley & Gruyter.	Holanda, muestra de suelo de la rizósfera de <i>Solanum tuberosum</i> (Solanaceae).	de Gruyter et al., 2013
<i>P. fusco-maculans</i> (Sacc.) Verkley & Gruyter	Italia, obtenido de madera descortezada de <i>Malus pumila</i> (Rosaceae), holotipo de <i>Phoma fusco-maculans</i> Sacc.	
<i>P. lini</i> (Pass.) Verkley & Gruyter	Holanda, de un tanque de residuos Wisconsin.	
<i>P. maculicutis</i> Verkley & Gruyter	E.U., de una lesión cutánea humana.	
<i>P. tiliae</i> (F. Rudolphi) Verkley & Gruyter	Austria, de una hoja de <i>Tilia platyphyllos</i> (Tiliaceae).	
<i>P. fuckelii</i> (Fuckel) Verkley & Gruyter	Dinamarca, aislado de la raíz de una planta gimnosperma y en ramas de <i>Rubus</i> sp.;	Verkley et al. 2014

	Alemania, de <i>Picea abies</i> con llagas (canker); Holanda, de esputo humano.	
<i>P. magnoliae</i> Monkai, Ariyawansa & K.D. Hyde	Tailandia, sobre hojas muertas de <i>Magnoliae liliifera</i> (Magnoliaeaceae). Saprófito en hojas muertas de ambientes terrestres Estado sexual. Se desconoce el estado asexual.	Ariyawansa et al., 2014
<i>P. nelloi</i> W.J. Li, Camporesi & K.D. Hyde	Saprófito, en tallos muertos de <i>Spartium junceum</i> L. Morfología asexual de coelomyceto. Morfología sexual desconocida.	Liu et al., 2015c
<i>P. thysanolaenae</i> Phookamsak, Chethana & K.D. Hyde	Saprófito en tallos de <i>Thysanolaena maxima</i> . Morfología sexual.	
<i>P. hakeae</i> Crous & Barber	Australia, sobre <i>Hakea</i> sp. (Proteaceae).	Crous et al., 2017

Especies abordadas en la revisión que han cambiado de género

<i>Didymosphaeria rubi- ulmifolii</i> (sin.= <i>P. brasiliense</i> Verkley)	<i>P. brasiliense</i> fue aislado en Brasil, de un fruto de <i>Coffea arabica</i> . <i>P. brasiliense</i> se agrupa junto con <i>D. rubi- ulmifolii</i> , por lo que se consideran sinónimos.	Verkley et al. 2004
<i>Didymosphaeria</i> sp.	Otras cepas de <i>P. brasiliense</i> que no son el holotipo y no se agrupan con <i>D. rubi- ulmifolii</i> .	Ariyawansa et al., 2014
<i>P. variabile</i> Riccioni, Damm, Verkley & Crous	Sudáfrica, aislado de madera decolorada de <i>Prunus persica</i> , cerca de una herida de poda. <i>P. variabile</i> forma una clado bien soportado dentro de <i>Didymosphaeria</i> , por lo que pasa a ser sinónimo de <i>Didymosphaeria</i>	Damm et al., 2008
<i>Didymosphaeria variabile</i> (Riccioni et al.) Ariyawansa & K.D. Hyde, comb. nov.		Ariyawansa et al., 2014

I.2 Estilos de vida y ambientes de aislamiento

I.2.1 Fitopatógenos y endófitos

Los holotipos del género *Paraconiothyrium* relacionados con especies vegetales pueden dividirse de manera general en cuatro grupos; aquellos asociados a tejido foliar o frutos, como endófitos o de estilo de vida no identificado con seguridad; los asociados al tronco o tejido leñoso, los asociados a la rizósfera y aquellos identificados como fitopatógenos (Tabla 1). En el grupo de endófitos pueden identificarse al holotipo de *P. tiliae*, que se encontró asociada a hojas de *Tilia platyphyllos* (de Gruyter et al., 2013). El holotipo de *P. babiogoreense*, se obtuvo como endófito de musgo *Huperzia selago* (Budziszewska et al., 2011), mientras que *P. hakeae* se encontró en tejido foliar de *Hakea* sp. (Proteaceae), pero no se especifica si como endófito o posible fitopatógeno (Crous et al., 2017). El holotipo de *P. brasiliense* (ahora *D. rubi-ulmifolii*) fue aislado inicialmente de un fruto de *Coffea arabica* en Brasil (Verkley et al., 2004),

Entre las especies asociadas al tallo y tejidos leñosos, el holotipo de *P. variable* (ahora *D. variable*) se obtuvo de madera decolorada de *Prunus persica* y el picnidio de *P. africanum* se colectó de la corteza de la misma especie (Damm et al., 2008), mientras que *P. fusco-maculans* de madera descortezada de *Malus pumila* (Rosaceae), aunque inicialmente identificada como *Phoma fusco-maculans* Sacc. (de Gruyter et al., 2013).

Aquellos holotipos obtenidos de la rizósfera son los de *P. flavescens* en *Solanum tuberosum* (de Gruyter et al., 2013) y *P. fuckelii* del ambiente de raíz de una gimnosperma (Verkley et al. 2014); aunque en el caso de la descripción de esta última especie también se analizaron ejemplares obtenidos de ramas de *Rubus* sp., troncos de *Picea abies* con chancro y aún de esputo humano. Por su relevancia, cepas de *Paraconiothyrium* asociadas a salud humana se analizan en el siguiente apartado.

Después de la descripción de los holotipos, otras cepas han sido asociadas con distintas especies vegetales, principalmente como fitopatógenas o endófitas. Así, cepas de *D. variable* (sin=*P. variable*) se han descrito como patógenas de

distintas especies leñosas, incluyendo causante de la mancha foliar (*leaf spot*) de la palma *Phoenix theophrasti* (Ligoxigakis et al., 2013), en *Prunus salicina*, y *Malus* sp. en Sudáfrica (Cloete et al., 2011; Damm et al., 2008), *Actinidia chinensis* y *A. deliciosa* en Italia (Damm et al., 2008), *Laurus nobilis* en Turquía (Damm et al., 2008) y *Salix matsudana* en China (Gao et al., 2011). Aunque se han observado lesiones ocasionadas por *D. variable* (sin=*P. variable*) en tronco de *Vitis* sp., no es concluyente su participación como causante de enfermedad del tronco de dicha planta (Cloete et al., 2011). Otra especie que ha sido asociada con diferentes plantas es *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense*), quien se ha encontrado causando lesiones en el tronco de *Prunus* spp. en Sudáfrica (Damm et al., 2008). En una comparación con secuencias depositadas en el Genbank, Damm et al. (2008) documentan que dicha especie se encuentra como endófito foliar en *Ginkgo biloba* y *Pinus tabulaeformis*, *Picea glauca* y *Alliaria petiolata*.

Como se mencionó anteriormente, *Didymosphaeria decolorans*, especie aún de afinidad incierta, se encontró creciendo dentro de cuerpos fructíferos de *Leptosphaeria* y posiblemente *Pleospora*, por lo que se considera fungícola (Ariyawansa et al., 2014 b).

1.2.2 Saprofitismo y otros estilos de vida

Holotipos de las especies *P. magnoliae*, *P. nelloi* y *P. thysanolaenae* son considerados como saprófitos, asociados a la descomposición de hojas de *Magnoliae liliifera* (Ariyawansa et al., 2014), y los tallos de *Spartium junceum* y *Thysanolaena máxima* (Liu et al., 2015c), respectivamente. *P. cyclothyrioides* proviene de una muestra de suelo (Verkley et al., 2004), por lo que posiblemente pueda ser considerado inicialmente como saprófito. El holotipo de *P. fungicola* se encontró colonizando el basidiocarpo de un poliporal resupinado creciendo en madera en descomposición (Verkley et al., 2004), aunque no se reporta específicamente como micoparásito. El holotipo de *P. estuarinum* como su nombre sugiere, fue obtenido de un estuario marino (Verkley et al., 2004). Por último, el

holotipo de *P. lini* se aisló de un tanque de desechos líquidos derivados del petróleo, y *P. maculicutis* de lesiones cutáneas humanas (de Gruyter et al., 2013).

Otras cepas de distintas especies de *Paraconiothyrium* han sido aisladas de muestras vegetales distintas a las de proveniencia de sus holotipos o de ambientes y muestras no relacionadas directamente con tejidos de plantas ni en interacciones biotróficas, ni como saprófitos de residuos vegetales, lo que indica versatilidad en los estilos de vida de las especies del género. Por ejemplo *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense*) se ha obtenido del tronco decolorado de un árbol *Platanus × acerifolia* (Damm et al., 2008), mientras que *D. variable* (sin=*P. variable*) como endófito de la especie arbórea *Cephalotaxus harringtonia* (Langenfeld et al., 2013). Por otra parte, una cepa relacionada con *P. sporulosum* se aisló de ambiente marino (Mohamed et al., 2010). De manera interesante, una cepa de *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense*) ha sido aislada del tracto digestivo del insecto *Acrida cinerea* (Liu et al., 2015b), otra del pez *Pennahia argentata*, identificado inicialmente dentro del género *Myrothecium*, así como una de muestras de agua superficial de un humedal (Damm et al., 2008).

Los reportes de micoparasitismo de especies del género *Paraconiothyrium* se han asociado a *P. minitans* (Whipps et al., 2008; Kim yVujanovic, 2016) y que ahora ha sido identificada como *Paraphaeosphaeria minitans* y anteriormente era considerada *Coniothyrium minitans*. Nuestro grupo de trabajo también ha documentado la capacidad de *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense*) para antagonizar e inhibir el crecimiento *in vitro* de hongos y oomycetes fitopatógenos (Arredondo-Santoyo et al., 2018). En *D. variable* (sin=*P. variable*) se ha documentado la capacidad para inhibir *in vitro* el crecimiento de hongos fitopatógenos, particularmente contra *Fusarium oxysporum* (Combès et al., 2012).

En general, las especies de *Didymosphaeria* se consideran saprofitas sobre ramificaciones leñosas, tallos de herbáceas y tejido foliar (revisado en Ariyawansa et al., 2014 b).

I.3 Impacto en salud humana

Hasta ahora son pocos los casos en los que se ha asociado a especies de *Paraconiothyrium* con patologías infecciosas humanas, sin embargo, la agresividad del patógeno en por lo menos un caso, la alta incidencia reportada en uno de los estudios y la presencia del patógeno en distintos tipos de tejido hacen necesario prestar atención a las infecciones por especies del género.

El primer reporte de una especie del género *Paraconiothyrium* asociada a casos clínicos de infecciones en humano fue *P. cyclothyrioides* causando phaeohyphomycosis cutánea en un paciente que fue sometido a trasplante de riñón, el cual respondió al tratamiento con posaconazol (Gordon et al., 2012). Esta misma especie fue encontrada causando co-infección de piel y tejidos blandos con *Phaeoacremonium parasiticum* en un paciente que recibió trasplante de riñón el cual murió pese al tratamiento con voriconazol y amfotericina B, debido a que la infección se extendió a pulmón y cerebro (Colombier et al., 2015). Otros reportes de infecciones cutáneas y subcutáneas involucran a esta especie en pacientes con injertos de riñón o linfoma (Guégan et al., 2016) y con trasplante de hígado (Balajee et al., 2007), los cuales fueron tratados con amfotericina B y voriconazol, respectivamente. Otras especies del género también se han asociado con micosis cutáneas y subcutáneas. Por ejemplo, *P. maculicutis* fue identificada retrospectivamente como una nueva especie del género (de Gruyter et al., 2013) a partir de un aislado obtenido de nódulos subcutáneos que inicialmente había sido asignado a *Pleurophoma pleurospora* (Dooley et al., 1989) y que respondió a la aplicación tópica de miconazole. Recientemente se ha identificado a *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense*) aislado de fluido peritoneal también como agente causando lesiones subcutáneas (Jeyaprakasam et al., 2016).

Además de su participación en infecciones cutáneas, *P. cyclothyrioides* se encontró causando neumonía en un paciente inmunosuprimido (Aulakh et al., 2016), reportándose la remisión de la infección con el uso de isavuconazonium, un azol usado por primera vez en el tratamiento con una infección fúngica. Un estudio reciente documento que de 230 aislados clínicos de EU obtenidos

principalmente de infecciones de piel y del tracto respiratorio, 16 (7%) fueron identificados mediante filogenia molecular como *P. cyclothyrioides*, la segunda especie en incidencia detrás del 15% de *Neoscytalidium dimidiatum* (Valenzuela-Lopez et al., 2017). Finalmente, un aislado de *Paraconiothyrium* de especie no identificada fue obtenido de un proceso de endoftalmitis ocasionado por la contaminación de un tubo de drenado de un dispositivo para tratar el glaucoma (Rowlands et al., 2016); la paciente de 74 años había estado sometida previamente a la infección a terapia inmunosupresiva para tratar escleritis necrotizante y además de cirugía para remover el dispositivo, respondió al tratamiento con fluconazol. Por último, dos cepas de especies no identificadas del género se aislaron de infecciones profundas locales de pacientes con diagnóstico de Phaeohyphomycosis (Revankar et al., 2017).

Los casos clínicos anteriormente documentados muestran la relevancia creciente que como patógeno oportunista ha tomado *Paraconiothyrium*, particularmente *P. cyclothyrioides* como agente infeccioso de piel y de vías respiratorias. No obstante, es evidente que deben extremarse precauciones en el caso de trasplantes y tratamientos inmunosupresores para evitar infecciones con dicho patógeno, aunque en general todo indica que aún se puede ser controlado con los antimicóticos de elección para este tipo de casos.

I.4 Producción de metabolitos secundarios

La producción y caracterización de metabolitos secundarios por especies del género *Paraconiothyrium* es sin duda alguna uno de las áreas de mayor desarrollo dentro de este grupo taxonómico. A la fecha existe documentación de una amplia diversidad de compuestos con actividad biológica producidos por *Paraconiothyrium* spp. Desde la descripción del holotipo de *P. fungicola* Verkley et al. (2004) mencionan que en extractos de acetato de etilo de cultivos de fermentación en sustrato sólido dicha especie se identificaron un diterpenoide tipo glucósido de isopimarano y un análogo ácido que es activo contra *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides*.

La siguiente descripción de producción de metabolitos con actividad farmacológica en el género fue la producción de las brasilamidas (*brasilamides*) A–D y de pintunamida por parte de una cepa de *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense*) aislada de las ramas de *Acer truncatum* (Liu et al., 2010a). Estos compuestos son sesquiterpenos tricíclicos con esqueleto de bergamotano, dos de los cuales fueron nuevas estructuras dentro de este grupo de compuestos y otros dos nuevos análogos de estructuras previamente descritas. Dos de los compuestos mostraron actividad modesta de para inhibir la replicación del virus HIV-1 en células C8166. Cuatro brasilamidas nuevas (K-N) fueron aisladas posteriormente del medio extracelular de la misma cepa, sin embargo, ningunas de estas estructuras presentó actividad inhibitoria significativa contra ocho líneas de células cancerosas (Guo et al., 2015). Seis nuevos compuestos del mismo grupo fueron encontrados cuando se escaló el volumen de fermentación de la misma cepa (Liu et al., 2015a), uno de los cuales mostró citotoxicidad significativa contra las líneas celulares tumorales MCF-7 y MGC sin afectar a concentraciones aún mayores a las líneas normales HaCaT (queratinocito humano) y NIH-3T3 (fibroblasto de embrión de ratón). Un primer reporte que pasó inicialmente desapercibido para el género, fue el de la producción de dos compuestos caracterizados como epoxifomalinas A (1) y B (2), por una cepa marina que inicialmente había sido identificada como *Phoma* sp. que posteriormente fue reclasificada como *Paraconiothyrium* sp., posiblemente *P. sporulosum* (Mohamed et al., 2010). Estos compuestos están formados por un esqueleto básico que comprende a un anillo de decalina isoprenoide fusionado a un residuo de epoxidona que presentan patrones de sustitución y oxidación característicos. La epoxifomalina A(1) tiene actividad citotóxica contra líneas celulares tumorales, mostrando dicho efecto a concentraciones nanomolares aparentemente vía la inhibición de proteasa del proteosoma (Mohamed et al., 2010).

Posteriormente se han identificado glicosidos diterpenénicos del tipo isopimarano en una cepa endofítica no identificada de *Paraconiothyrium*, los cuales presentan actividad citotóxica moderada contra la línea celular humana

HL60 de leucemia promielocítica (Shiono et al., 2011). Por otra parte, extractos de n-butanol del micelio, pero particularmente del medio de cultivo de una cepa endofítica de la planta medicinal *Trillium tschonoskii*, posiblemente de *P. sporulosum*, muestran actividad antibacteriana moderada (Zhou et al., 2011). Un extracto orgánico del medio de cultivo, obtenido con acetato de etilo, de una cepa de especie no identificada aislada como endófito del tejido foliar de la planta medicinal *Rheedia brasiliensis* mostró actividad antioxidante y potente actividad antiproliferativa contra la línea celular HaCat de queratinocitos humanos inmortalizados, por lo que se propone una aplicación potencial en el tratamiento de la psoriasis (de Carvalho et al., 2012). El extracto obtenido mostró ser rico en distintos tipos de ácidos grasos, aunque también se encontraron fenoles, azúcares y carbohidratos, sin embargo, no se identificó el principio activo responsable de la actividad biológica.

El extracto orgánico del medio de cultivo obtenido con acetato de etilo de una cepa endofítica de *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense*) aislada del tallo de la planta medicinal *Cinamonum camphor* mostró actividad antifúngica *in vitro* contra distintas especies de hongos fitopatógenos (Han et al., 2012). Otra cepa endófito de una especie vegetal no identificada produce ascotoxina, un antibiótico tipo lactona que presenta actividad herbicida, inhibiendo la germinación de semillas de *Lactuca sativa* y *Echinochloa crus-galli* (Khan et al., 2012). El extracto de acetato de etilo del medio de crecimiento de un aislado de *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense*) endófito de tejido aéreo de la planta *Ostrya carpinifolia* mostró actividad antifúngica contra el fitopatógeno *Rhizoctonia solani* y actividad antiproliferativa de las células de carcinoma cervicouterino HeLa (Nicoletti et al., 2013). Una cepa endófito de la planta *Laguncularia racemosa*, posiblemente *P. hawaiiense*, secreta la furanona graminina B, la cual muestra una actividad antibacteriana limitada, principalmente activa contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, no posee actividad antifúngica y tampoco muestra propiedad antiproliferativa contra las células tumorales evaluadas (Almeida et al., 2014). No obstante, debido a que la graminina B es una

toxina asociada a diversos cultivos que es de relevancia en salud pública, la presencia del hongo en cultivos de trigo y algunas variedades de frijol debe de ser considerada como un factor de riesgo.

Una cepa entomógena aislada de un insecto del género *Diaspidiotus* e identificada como *P. hawaiiense* secreta al medio de cultivo los diterpenos hawaiinolidos E–G, dos de los cuales son tipo cassano y el otro cleistantano (Chen et al., 2014). Uno de los compuestos caracterizados mostró actividad citotóxica relevante contra células cancerosas, principalmente contra las líneas T24 y MCF-7. En otra cepa aislada del tracto digestivo de *Acrida cinerea* e identificada como *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense*) se documentó la producción de ocho furanonas distintas denominadas paraconfuranonas, ninguna de las cuales mostró actividad citotóxica contra tres líneas celulares tumorales (Liu et al., 2015b). Posteriormente de esta misma cepa se aislaron y caracterizaron siete nuevas furanonas, una de las cuales mostró efecto neuroprotector, al proteger a células PC12 de neuroblastoma contra daño oxidativo (Liu et al., 2016), por lo que dichos compuestos pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Un aspecto relevante de *D. variable* (sin=*P. variable*) es la capacidad para producir taxol, lo cual fue demostrado en una cepa endófito del árbol *Taxus baccata* (Somjaipeng et al., 2015, 2016).

1.5 Interacción con metales

Algunos aislados del género *Paraconiothyrium* provienen de sedimentos y cuerpos de agua ricos en Mn(II), uno de los cuales ha sido identificado mediante análisis filogenético de la región ITS como *P. sporulosum* y otro más cuya especie está por determinarse de manera precisa (Takano et al., 2006). Estas cepas son capaces de oxidar Mn(II) a la forma insoluble de Mn(III/IV), transformando el hidróxido soluble en agua de dicho metal al óxido insoluble (Takano et al., 2006; Sasaki et al., 2008). La forma mineral del óxido en la que la cepa de *Paraconiothyrium* sp. precipita el Mn(II) es la birnesita, lo que está asociado a su alta resistencia a dicho

metal (Sasaki et al., 2006), además de ser un material que adsorber Co^{+2} (Sasaki et al., 2008; Yu et al., 2012). Adicionalmente, la adsorción de Co^{+2} y Ni^{+2} en birnesita generada por dicha cepa es mejor que la de dicho mineral generado químicamente (Sasaki et al., 2014). La cualidad de *Paraconiothyrium* sp. de formar birnesita permite su utilización como biotemplado para la síntesis de microtubos de óxido de litio manganeso (LMO-MTs) útiles en la recuperación de Li^+ de distintas fuentes (Yu et al., 2013), los cuales presentan características distintivas en comparación con los mismos microtubos generados por mecanismos abióticos (Yu and Sasaki, 2014, 2016). Cepas de *P. estuarinum* capaces de oxidar Mn(II) también han sido aisladas de nódulos de Mn de campos de cultivo de arroz (Cahyani et al., 2009).

Las distintas estructuras en las que el óxido de Mn(IV) se puede presentar en la naturaleza son relevantes ya que juegan un papel importante en los ciclos geoquímicos de varios elementos metálicos, al controlar su movilización en el ambiente, y ser conducto para la oxidación de sustancias inorgánicas y orgánicas, como los compuestos húmicos (Miyata et al., 2007). En ambientes anóxicos como sedimentos y las capas internas de suelo el Mn, junto con el Fe, son los aceptores finales de electrones de la respiración celular microbiana mediada por metales, controlando así la conversión metabólica en dichos ambientes de diversos compuestos como ácidos orgánicos, ácidos grasos, y compuestos aromáticos. Además, el proceso de oxidación del Mn(II) en la naturaleza es de relevancia ambiental, ya que el agua subterránea que puede ser utilizada con fines de consumo humano contiene dicho catión disuelto, el cual debe de ser eliminado para cumplir normatividad de salud, algo en lo cual la oxidación y precipitación microbiana puede ser aplicada (Miyata et al., 2007).

Una cepa de *P. sporulosum* aislada de un estanque contaminado con aguas residuales muestra resistencia a Se y capacidad de reducir el Se(IV) a Se(0) (Rosenfeld et al., 2017), cualidad que también tiene implicaciones ambientales y en procesos de detoxificación.

I.6 Enzimas extracelulares y aplicaciones biotecnológicas derivadas

Se ha reportado la producción de lacasa extracelular en *D. variable* (sin=*P. variable*) (Forootanfar et al., 2011; Gao et al., 2011). La enzima purificada tiene una masa molecular de 84 kDa, un valor de pI de 4.2 y un pH y temperatura óptimos de 4.8 y 50 °C, respectivamente (Forootanfar et al., 2011). La actividad de lacasa reportada en dicha especie fue de 512 U/L en medio Sabouraud con 2% de dextrosa y se suplementó con 250 µM de CuSO₄ y 100 µM de 2,5-xilidina a las 72 h de incubación (Forootanfar et al., 2011). Las condiciones de incubación para obtener dicha actividad fueron de 30 °C y 150 rpm y el valor máximo se registró después de nueve días de incubación. En otro estudio con *D. variable* (sin=*P. variable*) en el que se probaron varios medios de cultivo, la máxima actividad de lacasa se encontró en un medio a base de salvado, peptona, extracto de carne de res, Vitamina B1, KH₂PO₄, MgSO₄, CaCl₂ y NaCl (Gao et al., 2011). En dicho estudio la actividad máxima de 484.72 U/ml se registró hacia el décimo día de incubación a 28 °C y 200 rpm. Nosotros reportamos recientemente la actividad de lacasa extracelular en *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense*) incubada en caldo papa dextrosa, la cual no se detecta en cultivos basales pero en presencia de 150 µM CuSO₄ muestra una actividad de 46.8 (±0.33) U/L hacia el quinto día de incubación a 24 °C y 120 rpm de agitación (Arredondo-Santoyo et al., 2018). El diseño aplicando la metodología de superficie de respuesta es una herramienta útil para incrementar la actividad extracelular de lacasa en *D. variable* (sin=*P. variable*) (Weile et al., 2011), que puede ser aplicado a *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense*) con la finalidad de optimizar la producción de dicha enzima.

La lacasa purificada de *D. variable* (sin=*P. variable*) es capaz de remover derivados clorofenólicos (Forootanfar et al., 2012a) y decolorar tintes sintéticos (Aghaie-Khouzani et al. 2012; Ashrafi et al., 2013; Rezaei et al., 2015) de soluciones acuosas. La eficiencia en el proceso de decoloración se incrementa cuando la enzima es inmovilizada en esferas de silica o gel de alginato-gelatina, y la estabilidad de la enzima permite su utilización por un tiempo más prolongado a una temperatura más alta (Mogharabi et al., 2012; Mirzadeh et al., 2014). De

manera interesante, Forootanfar et al. (2012b) documentan que la lacasa de *D. variable* (sin=*P. variable*) es más eficiente para decolorar azul de bromofenol, azul de comassie brillante, panseu-S, rojo Congo y azul de metileno que la lacasa de *Trametes versicolor* una especie de poliporáceo de pudrición blanca, grupo de hongos que se caracterizan por producir enzimas ligninolíticas muy eficientes en decoloración de colorantes sintéticos. La degradación de colorantes sintéticos de la lacasa de *D. variable* (sin=*P. variable*) no genera residuos tóxicos (Forootanfar et al., 2016), lo que sugiere una degradación eficiente de dichos sustratos que no deja subproductos con riesgo para la salud.

Debido a la detección de residuos de compuestos farmacológicos en distintas ambientes naturales, urbanos y de alimentos (Bottoni y Caroli, 2018), existe un creciente interés en su eliminación debido sus implicaciones negativas en salud humana. Así, se ha evaluado la capacidad de la lacasa de *D. variable* (sin=*P. variable*) para remover benzodiazepinas de solución acuosa (Ostadhadi-Dehkordi et al., 2012). La enzima es capaz de atacar eficientemente a las benzodiazepinas nitrazepam, alprazolam, diazepam y oxazepam, y el proceso de remoción se mejora cuando se agregan mediadores, particularmente el 1-hidroxibenzotriazol (HBT); no obstante, la degradación de clobazam, clordiazepóxido, y lorazepam no es eficiente aun en presencia de mediadores (Ostadhadi-Dehkordi et al., 2012). Otro fármaco eficientemente degradado por la lacasa de *P. variable* es la imipramina (Tahmasbi et al., 2016). La degradación de sustancias con actividad farmacológica y sus metabolitos derivados es un área de aplicación biotecnológica de lacasas extracelulares que todavía está en desarrollo, por los que se puede esperar la optimización de procesos.

La lacasa de *D. variable* (sin=*P. variable*) también es útil para la síntesis de nanopartículas de oro; la enzima puede sintetizar nanopartículas de dicho metal en el rango de 71–266 nm a partir de HAuCl_4 (0.6 mM) empleando 73 U lacasa a 70 °C (Faramarzi y Forootanfar, 2011). La enzima inmovilizada en una matriz compuesta de Fe_3O_4 /polianilina/quitosana forma parte de un biosensor eficiente para la detección de catecol en hojas de té (Sadeghi et al., 2015).

También se han reportado la actividad extracelular de lignin peroxidasa y manganeso peroxidasa (MnP) en *D. variabile* (sin=*P. variabile*) (Gao et al., 2011). No obstante, el valor de actividad de la primera actividad es muy bajo por lo que es necesario corroborar dicha evidencia con un análisis bioquímico y genético adicional.

I.7 Omicas

Para la especie *Paraconiothyrium sporulosum*, ahora considerado *Paraphaeosphaeria sporulosa*, se encuentra disponible el genoma y se ha analizado el secretoma en medio suplementado con Mn^{+2} (Zeiner et al., 2016). El análisis genómico funcional reveló que dicha especie tiene 535 genes codificantes de proteínas de secreción de las cuales se comprobó experimentalmente la secreción de 189 glicosil-hidrolasas en las condiciones de cultivo usadas en el estudio, mayoritariamente celulasas y hemicelulasas de la familia GH5. Además, la especie mostró 38% de proteínas secretadas únicas, de un total de 578 proteínas, al ser comparado con otras tres especies de ascomicetes.

La caracterización del secretoma obtenido posteriormente de *Paraph. sporulosum* en medio suplementado con Mn^{+2} incrementó el número de proteínas a 1461 (Zeiner et al., 2017). El perfil de secreción observado mostró cambios significativos en los niveles de varias enzimas activas hacia carbohidratos (denominadas CAZymes) y peptidasas (MEROPS) de diversas familias, conforme se extiende el tiempo de incubación. En etapas tempranas de incubación se observó un incremento significativo de enzimas relacionadas con la degradación de celulosa, como GH5 β -glucosidasas, GH47 α -manosidasas y GH79 β -glucuronidasas. En etapas más tardías ocurre un cambio en el que predominan enzimas oxidativas sobre las hidrolíticas, incluyendo actividad de celobiosa deshidrogenasa (AA3) y monooxigenasas de la familia AA9, las cuales actúan de manera sinérgica para oxidar fuentes de carbono mediante la producción de intermediarios reactivos.

El análisis proteómico de *Paraph. sporulosum* ha revelado estrategias de degradación de compuestos de carbono específicas de la especie y de gran relevancia biotecnológicas. Es necesario estudios similares en especies del mismo género y taxa estrechamente relacionados, con la finalidad de reconocer su potencial biotecnológico para el procesamiento de biomasa vegetal, tan relevante para la producción de biocombustibles en la actualidad.

I.8 Misceláneo

Una cepa de una especie no identificada de *Paraconiothyrium* muestra capacidad para producir sideróforos (Andrews et al., 2016a, b). Los sideróforos son agentes químicos cuya función primaria es capturar ion férrico (Fe^{+3}) insoluble en distintos hábitats los cuales tienen una gran diversidad de aplicaciones (Saha et al., 2016), por lo que la producción de sideróforos incrementa sustancialmente el potencial biotecnológico de las especies dentro de *Paraconiothyrium*. Una cepa de *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense*) ha sido asociada al daño de bloques de madera de *Prunus sargentii*, por lo que representa una amenaza para edificios históricos construidos con dicha madera, aunque se encuentra entre las cepas de riesgo más bajo (Lee et al., 2018). Una cepa de una especie no identificada del género muestra alta eficiencia para oxidar lactosa aparentemente a través de una oxidasa extracelular, útil en la producción de ácido lactobiónico (Nakano et al., 2006).

Referencias

1. Aghaie-Khouzani, M., Forootanfar, H., Moshfegh, M., Khoshayand, M. R., & Faramarzi, M. A. (2012). Decolorization of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Biochemical Engineering Journal*. 60: 9–15.
2. Almeida, C., El Aouad, N., Martín, J., Pérez-Victoria, I., González-Menéndez, V., Platas, G., de la Cruz, M., Monteiro, M.C., de Pedro, N., Bills, G.F.,

- Vicente, F., Genilloud, O. and Reyes, F. 2014. Graminin B, a furanone from the fungus *Paraconiothyrium* sp. *The Journal of Antibiotics*. 67: 421–423.
3. Andrews, M. Y., Santelli, C. M., & Duckworth, O. W. (2016a). Layer plate CAS assay for the quantitation of siderophore production and determination of exudation patterns for fungi. *Journal of Microbiological Methods*. 121: 41-43.
 4. Andrews, M. Y., Santelli, C. M., & Duckworth, O. W. (2016b). Digital image quantification of siderophores on agar plates. *Data in Brief*. 6: 890-898.
 5. Aptroot, A. (1998). A world revision of *Massarina* (Ascomycota). *Nova Hedwigia* 66(1–2):89–162.
 6. Ariyawansa HA, Tanaka K, Thambugala KM, Phookamsak R, Tian Q, Camporesi E, Hongsanan S, Monkai J, Wanasinghe DN, Chukeatirote E, Kang JC, Xu JC, McKenzie EHC, Jones EBG, Hyde KD. (2014a). A molecular phylogenetic reappraisal of the *Didymosphaeriaceae* (= *Montagnulaceae*). *Fungal Diversity*. 68:69–104.
 7. Ariyawansa, H. A., Camporesi, E., Thambugala, K. M., Mapook, A., Kang, J. C., Alias, S. A., Chukeatirote E., Thines, M., McKenzie, E.H.C., Hyde, K. D. (2014b). Confusion surrounding *Didymosphaeria*—phylogenetic and morphological evidence suggest *Didymosphaeriaceae* is not a distinct family. *Phytotaxa*. 176(1): 102-119.
 8. Arredondo-Santoyo M, Vázquez-Garcidueñas MS, Vázquez-Marrufo G. (2018). Identification and characterization of the biotechnological potential of a wild strain of *Paraconiothyrium* sp. *Biotechnology Progress*. Aceptado. 20 Abril, 2018. doi:10.1002/btpr.2653.
 9. Aulakh, P., Leon, J., & Gonzales Zamora, J. A. (2016). *Paraconiothyrium cyclothyroides* pneumonia: report of a unique case. *In American Thoracic Society International Conference. D48Lung infection case reports I: fungal infections: A7147*. San Francisco, CA, May 13-18.
 10. Ashrafi, S. D., Rezaei, S., Forootanfar, H., Mahvi, A. H., Faramarzi, M. A. (2013). The enzymatic decolorization and detoxification of synthetic dyes by the laccase from a soil-isolated ascomycete, *Paraconiothyrium variabile*.

- International Biodeterioration and Biodegradation*. 85: 173-181.
11. Almeida, C., El Aouad, N., Martín, J., Pérez-Victoria, I., Gonzalez-Menendez, V., Platas, G., Cruz, M., Monteiro, M. C., de Pedro N, Bills, G. F., Vicente, F., Genilloud, O., Reyes, F. (2014). Graminin B, a furanone from the fungus *Paraconiothyrium* sp. *Journal of Antibiotics*. 67(5): 421-423.
 12. Balajee, S. A., Sigler, L., Brandt, M. E. (2007). DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. *Medical Mycology*. 45(6): 475-490.
 13. Boonmee, S., D'souza, M. J., Luo, Z., Pinruan, U., Tanaka, K., Su, H., Bhat, D. J., McKenzie, E. H. C., Jones, E. B. G., Taylor, J. E., Phillips, A. J., Hirayama, K., Eungwanichayapant, P. D., Hyde, K. D. (2016). *Dictyosporiaceae* fam. nov. *Fungal Diversity*. 80(1): 457-482.
 14. Booth, C. (1968). *Didymosphaeria igniaria* sp. nov., the perfect state of *Periconia igniaria*. *Transactions of the British Mycological Society*. 51: 803–805.
 15. Bottoni, P., & Caroli, S. (2018). Presence of residues and metabolites of pharmaceuticals in environmental compartments, food commodities and workplaces: a review spanning the three-year period 2014–2016. *Microchemical Journal*. 136: 2-24.
 16. Budziszewska, J., Szypuła, W., Wilk, M., & Wrzosek, M. (2011). *Paraconiothyrium babiogorensis* sp. nov., a new endophyte from fir club moss *Huperzia selago* (*Huperziaceae*). *Mycotaxon*. 115(1): 457-468.
 17. Cahyani, V. R., Murase, J., Ishibashi, E., Asakawa, S., & Kimura, M. (2009). Phylogenetic positions of Mn²⁺-oxidizing bacteria and fungi isolated from Mn nodules in rice field subsoils. *Biology and Fertility of Soils*. 45(4): 337-346.
 18. Chen, S., Zhang, Y., Zhao, C., Ren, F., Liu, X., & Che, Y. (2014). Hawaiiinolides E–G, cytotoxic cassane and cleistanthane diterpenoids from the entomogenous fungus *Paraconiothyrium hawaiiense*. *Fitoterapia*. 99: 236-242.

19. Cloete, M., Fourie, P. H., Ulrike, D. A. M. M., Crous, P. W., Mostert, L. (2011). Fungi associated with die-back symptoms of apple and pear trees, a possible inoculum source of grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*. 50(4): S176-S190.
20. Colombier, M. A., Alanio, A., Denis, B., Melica, G., Garcia-Hermoso, D., Levy, B., Peraldi, M. N., Glotz D., Bretagne S., Gallien, S. (2015). Dual invasive infection with *Phaeoacremonium parasiticum* and *Paraconiothyrium cyclothyrioides* in a renal transplant recipient: case report and comprehensive review of the literature of *Phaeoacremonium phaeohyphomycosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 53(7): 2084-2094.
21. Combès, A., Ndoye, I., Bance, C., Bruzaud, J., Djediat, C., Dupont, J., Nay, B., Prado, S. (2012). Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variable* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. *PLoS One*. 7(10): e47313. doi:10.1371/journal.pone.0047313.
22. Crous PW, Groenewald JZ. 2006. *Microdiplodia hawaiiensis*. Fungal Planet No. 7.
23. Crous, P. W., Wingfield, M. J., Burgess, T. I., Hardy, G. S. J., Barber, P. A., Alvarado, et al. (2017). Fungal planet description sheets: 558–624. *Persoonia*. 38: 240–384.
24. Damm, U., Verkley, G. J. M., Crous, P. W., Fourie, P. H., Haegi, A., & Riccioni, L. (2008). Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. *Persoonia*. 20(1): 9–17.
25. de Carvalho, P. L. N., Amaral, P. O., Ruiz, A. L. T. G., de Alencar, S. M., Pfenning, L. H., de Carvalho, J. E., Rosalen, P. L., & Ikegaki, M. (2012). *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1: antioxidant and antiproliferative activities of endophytic fungus associated with *Rheedia brasiliensis* plant. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*. 1(3): 172-176.
26. de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Aveskamp, M. M., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). Redisposition of Phoma-like anamorphs in *Pleosporales*. *Studies in Mycology*. 75: 1-36.

27. Dooley, D. P., Beckius, M. L., Jeffery, B. S., McAllister, C. K., Radentz, W. H., Feldman, A. R., Rinaldi, M. G., Bailey, S. R., Keeling, J. H. (1989). Phaeohyphomycotic cutaneous disease caused by *Pleurophoma* in a cardiac transplant patient. *Journal of Infectious Diseases*. 159(3): 503-507.
28. Faramarzi, M. A., & Forootanfar, H. (2011). Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles produced by laccase from *Paraconiothyrium variabile*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 87(1): 23-27.
29. Forootanfar, H., Faramarzi, M.A., Shahverdi, A.R., Tabatabaei Yazdi M. (2011) Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Bioresource Technology*. 102: 1808–1814.
30. Forootanfar, H., Movahednia, M. M., Yaghmaei, S., Tabatabaei-Sameni, M., Rastegar, H., Sadighi, A., & Faramarzi, M. A. (2012a). Removal of chlorophenolic derivatives by soil isolated ascomycete of *Paraconiothyrium variabile* and studying the role of its extracellular laccase. *Journal of Hazardous Materials*. 209–210: 199–203.
31. Forootanfar, H., Moezzi, A., Aghaie-Khozani, M., Mahmoudjanlou, Y., Ameri, A., Niknejad, F., & Faramarzi, M. A. (2012b). Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*. 9(1): 27.
32. Forootanfar, H., Rezaei, S., Zeinvand-Lorestani, H., Tahmasbi, H., Mogharabi, M., Ameri, A., & Faramarzi, M. A. (2016). Studies on the laccase-mediated decolorization, kinetic, and microtoxicity of some synthetic azo dyes. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 14(1): 7. doi: 10.1186/s40201-016-0248-9.
33. Gao, H., Wang, Y., Zhang, W., Wang, W., & Mu, Z. (2011). Isolation, identification and application in lignin degradation of an ascomycete GHJ-4. *African Journal of Biotechnology*. 10(20), 4166–4174.
34. Gordon, R. A., Sutton, D. A., Thompson, E. H., Shrikanth, V., Verkley, G. J., Stielow, J. B., Mays R., Oleske, D., Morrison, L. K., Lapolla, W. J., Galfione,

- S., Tying, S., Samathanam C.A., Fu, J., Wickes B.L., Mulanovich, V., Wanger, A., and Arias C.A. (2012). Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Paraconiothyrium cyclothyrioides*. *Journal of Clinical Microbiology*. 50(11): 3795-3798.
35. Guo, Z., Ren, F., Che, Y., Liu, G., & Liu, L. (2015). New Bergamotane sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. *Molecules*. 20(8): 14611-14620.
36. Guégan, S., Garcia-Hermoso, D., Sitbon, K., Ahmed, S., Moguelet, P., Dromer, F., Lortholary, O., et al. (2016). Ten-year experience of cutaneous and/or subcutaneous infections due to coelomycetes in France. *Open Forum Infectious Diseases*. 3(2): ofw106. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw106>
37. Han, M., Liu, T., Cai, X., Chen, K., Liu, C., Brian, K., Xue, Y., and Gu, Y. (2012). A new endophytic *Paraconiothyrium brasiliens* LT161 shows potential in producing antifungal metabolites against phytopathogens. *African Journal of Microbiology Research*. 6(50): 7572-7578.
38. Hyde KD, Jones EBG, Liu JK, Ariyawansa H et al. (2013) Families of *Dothideomycetes*. *Fungal Diversity*. 63:1–313.
39. Jeyaprakasam, N. K., Razak, M. F. A., Ahmad, N. A. B., Santhanam, J. (2016). Determining the pathogenic potential of non-sporulating molds isolated from cutaneous specimens. *Mycopathologia*. 181(5-6): 397-403.
40. Khan, A.L., Hamayun M., Hussain, J., Kang, S.M, and Lee I.J. (2012). The newly isolated endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. LK1 produces ascotoxin. *Molecules*. 17:1103-1112.
41. Kim, S. H., Vujanovic, V. (2016). Relationship between mycoparasites lifestyles and biocontrol behaviors against *Fusarium* spp. and mycotoxins production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(12): 5257-5272.
42. Langenfeld, A., Prado, S., Nay, B., Cruaud, C., Lacoste, S., Bury, E., Hachette, F., Hosoya, T., Dupont, J. (2013). Geographic locality greatly influences fungal endophyte communities in *Cephalotaxus harringtonia*. *Fungal Biology*. 117(2): 124-136.

43. Lee, H. J., Jeong, S. H., & Chung, Y. J. (2018). Wood injury characteristics of fungi isolated from printing woodblocks of the Tripitaka Koreana in the Haeinsa Temple at Hapcheon, Republic of Korea. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 131: 29-39.
44. Ligoxigakis, E. K., Papaioannou, I. A., Markakis, E. A., & Typas, M. A. (2013). First report of leaf spot of *Phoenix theophrasti* caused by *Paraconiothyrium variabile* in Greece. *Plant Disease*. 97(9): 1250-1250.
45. Liu, L., Gao, H., Chen, X., Cai, X., Yang, L., Guo, L., Yao, X., & Che, Y. (2010a). Brasilamides A–D: sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. *European Journal of Organic Chemistry*. 2010(17): 3302-3306.
46. Liu, L., Chen, X., Li, D., Zhang, Y., Li, L., Guo, L., Cao, Y., & Che, Y. (2015a). Bisabolane sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. *Journal of Natural Products*. 78(4): 746-753.
47. Liu, C. X., Wang, L., Chen, J. F., Guo, Z. Y., Tu, X., Deng, Z. S., & Zou, K. (2015b). Paraconfuranones A–H, eight new furanone analogs from the insect-associated fungus *Paraconiothyrium brasiliense* MZ-1. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 53(4): 317-322.
48. Liu, J. K., Hyde, K. D., Jones, E. G., Ariyawansa, H. A., Bhat, D. J., Boonmee, S., et al. (2015c). Fungal diversity notes 1–110: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal species. *Fungal Diversity*. 72(1): 1-197.
49. Liu, C.X., Yu, X.Q., Guo, Z.Y., He, H.B., Tu, X., Deng, Z.S., and Zou, K. 2016. Structural elucidation and NMR spectral assignments of paraconfuranones I–M from the insect-associated fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 54: 916–921.
50. Mirzadeh, S. S., Khezri, S. M., Rezaei, S., Forootanfar, H., Mahvi, A. H., & Faramarzi, M. A. (2014). Decolorization of two synthetic dyes using the purified laccase of *Paraconiothyrium variabile* immobilized on porous silica beads. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 12(1): 6.

51. Miyata, N., Tani, Y., Sakata, M., & Iwahori, K. (2007). Microbial manganese oxide formation and interaction with toxic metal ions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 104(1): 1-8.
52. Mogharabi, M., Nassiri-Koopaei, N., Bozorgi-Koushalshahi, M., Nafissi-Varcheh, N., Bagherzadeh, G., & Faramarzi, M. A. (2012). Immobilization of laccase in alginate-gelatin mixed gel and decolorization of synthetic dyes. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2012: ID 823830, doi:10.1155/2012/823830.
53. Mohamed, I. E., Kehraus, S., Krick, A., König, G. M., Kelter, G., Maier, A., Fiebig H. H., Kalesse M., Malek N. P., & Gross, H. (2010). Mode of action of epoxyphomalins A and B and characterization of related metabolites from the marine-derived fungus *Paraconiothyrium* sp. *Journal of Natural Products*. 73(12): 2053-2056.
54. Nakano, H., Kiryu, T., Kiso, T., & Murakami, H. (2006). Lactobionic acid and its biocatalytic production. *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*. 211(10): 874.
55. Nicoletti, R., De Filippis, A., & Buommino, E. (2013). Antagonistic aptitude and antiproliferative properties on tumor cells of fungal endophytes from the Astroni Nature Reserve, Italy. *African Journal of Microbiology Research*. 7(31): 4073-4083.
56. Ostadhadi-Dehkordi, S., Tabatabaei-Sameni, M., Forootanfar, H., Kolahdouz, S., Ghazi-Khansari, M., & Faramarzi, M. A. (2012). Degradation of some benzodiazepines by a laccase-mediated system in aqueous solution. *Bioresource Technology*. 125: 344-347.
57. Revankar, S. G., Baddley, J. W., Chen, S. C. A., Kauffman, C. A., Slavin, M., Vazquez, J. A., Seas, C., Morris, M.I., Nguyen, M.H., Shoham, S., Thompson III, G. R. et al. (2017). A Mycoses Study Group international prospective study of phaeohyphomycosis: an analysis of 99 proven/probable cases. *Open Forum Infectious Diseases*. 4(4): ofx200, <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx200>.

58. Rezaei, S., Tahmasbi, H., Mogharabi, M., Ameri, A., Forootanfar, H., Khoshayand, M. R., & Faramarzi, M. A. (2015). Laccase-catalyzed decolorization and detoxification of Acid Blue 92: statistical optimization, microtoxicity, kinetics, and energetics. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 13(1): 31. doi: 10.1186/s40201-015-0183-1.
59. Rosenfeld, C. E., Kenyon, J. A., James, B. R., & Santelli, C. M. (2017). Selenium (IV, VI) reduction and tolerance by fungi in an oxic environment. *Geobiology*. 15(3): 441-452.
60. Rowlands, M. A., Shaw, J., Haddock, L. J., & Maharaj, A. S. (2016). Glaucoma drainage device complicated by fungal *Paraconiothyrium* endophthalmitis. *Vision Pan-America, The Pan-American Journal of Ophthalmology*. 15(2): 63-64.
61. Sadeghi, S., Fooladi, E., & Malekaneh, M. (2015). A new amperometric biosensor based on Fe₃O₄/polyaniline/laccase/chitosan biocomposite-modified carbon paste electrode for determination of catechol in tea leaves. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 175(3): 1603-1616.
62. Sasaki, K., Matsuda, M., Hirajima, T., Takano, K., & Konno, H. (2006). Immobilization of Mn (II) ions by a Mn-oxidizing fungus *Paraconiothyrium* sp.-like strain at neutral pHs. *Materials Transactions*. 47(10): 2457-2461.
63. Sasaki, K., Matsuda, M., Urata, T., Hirajima, T., & Konno, H. (2008). Sorption of Co²⁺ ions on the biogenic Mn oxide produced by a Mn-oxidizing fungus, *Paraconiothyrium* sp. WL-2. *Materials Transactions*. 49(3): 605-611.
64. Sasaki, K., Yu, Q., Momoki, T., Kaseyama, T. (2014). Adsorption characteristics of Cs⁺ on biogenic birnessite. *Applied Clay Science*. 101: 23-29.
65. Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 23(5): 3984-3999.
66. Shiono, Y., Kikuchi, M., Koseki, T., Murayama, T., Kwon, E., Aburai, N., & Kimura, K. I. (2011). Isopimarane diterpene glycosides, isolated from

- endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. MY-42. *Phytochemistry*. 72(11): 1400-1405.
67. Somjaipeng, S., Medina, A., Kwaśna, H., Ortiz, J. O., Magan, N. (2015). Isolation, identification, and ecology of growth and taxol production by an endophytic strain of *Paraconiothyrium variabile* from English yew trees (*Taxus baccata*). *Fungal Biology*. 119(11): 1022-1031.
68. Somjaipeng, S., Medina, A., & Magan, N. (2016). Environmental stress and elicitors enhance taxol production by endophytic strains of *Paraconiothyrium variabile* and *Epicoccum nigrum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 90: 69-75.
69. Tahmasbi, H., Khoshayand, M. R., Bozorgi-Koushalshahi, M., Heidary, M., Ghazi-Khansari, M., & Faramarzi, M. A. (2016). Biocatalytic conversion and detoxification of imipramine by the laccase-mediated system. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 108: 1-8.
70. Takano, K., Itoh, Y., Ogino, T., Kurosawa, K., & Sasaki, K. (2006). Phylogenetic analysis of manganese-oxidizing fungi isolated from manganese-rich aquatic environments in Hokkaido, Japan. *Limnology*. 7(3): 219-223.
71. Valenzuela-Lopez, N., Sutton, D. A., Cano-Lira, J. F., Paredes, K., Wiederhold, N., Guarro, J., & Stchigel, A. M. (2017). Coelomycetous fungi in the clinical setting: Morphological convergence and cryptic diversity. *Journal of Clinical Microbiology*. 55(2):552-567.
72. Verkley, G. J. M., Da Silva, M., Wicklow, D. T., & Crous, P. W. (2004). *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Studies in Mycology*. 50: 323–335.
73. Verkley, G. J. M., Dukik, K., Renfurm, R., Göker, M., & Stielow, J. B. (2014). Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in *Montagnulaceae* (Ascomycota). *Persoonia*. 32: 35-51.

74. Weile W., Zhimei M., Shujun Z., Qi Y., Chunjiu R., Kai Z., Juan Y., & Huiju G. (2011). Optimization of fermentation conditions of *Paraconiothyrium variable* GHJ-4 for laccase production by response surface methodology. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*. 17 (3): 321-325. doi: 10.3724/SP.J.1145.2011.00321.
75. Whipps, J. M., Sreenivasaprasad, S., Muthumeenakshi, S., Rogers, C. W., & Challen, M. P. (2008). Use of *Coniothyrium minitans* as a biocontrol agent and some molecular aspects of sclerotial mycoparasitism. *European Journal of Plant Pathology*. 121(3): 323-330.
76. Wijayawardene NN, Crous PW, Kirk PM, Hawksworth DL, Boonmee S, Braun U, Chomnunti P, Dai DQ, D'souza MJ, Diederich P, Dissanayake A, Doilom M, Hongsanan S, Jones EBG, Groenewald JZ, Jayawardena R, Lawrey JD, Liu JK, Lücking R, Madrid H, Manamgoda DS, Muggia L, Nelsen MP, Phookamsak R, Suetrong S, Tanaka K, Thambugala KM, Wikee S, Zhang Y, Aptroot A, Ariyawansa HA, Bahkali AH, Bhat JD, Gueidan C, De Hoog GS, Knudsen K, McKenzie EHC, Miller AN, Mortimer PE, Wanasinghe DN, Phillips AJL, Raja HA, Slippers B, Shivas RS, Taylor JE, Wang Y, Woudenberg JHC, Piątek M, Cai L, Jaklitsch WM, Hyde KD (2014c) Naming and outline of Dothideomycetes–2014 including proposals for the protection or suppression of generic names. *Fungal Diversity*. 69(69):1–55.
77. Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Wanasinghe, D. N., Papizadeh, M., Goonasekara, I. D., Camporesi, et al. (2016). Taxonomy and phylogeny of dematiaceous coelomycetes. *Fungal Diversity*. 77(1): 1-316.
78. Yu, Q., Sasaki, K., Tanaka, K., Ohnuki, T., & Hirajima, T. (2012). Structural factors of biogenic birnessite produced by fungus *Paraconiothyrium* sp. WL-2 strain affecting sorption of Co^{2+} . *Chemical Geology*. 310, 106-113.
79. Yu, Q., Sasaki, K., & Hirajima, T. (2013). Bio-templated synthesis of lithium manganese oxide microtubes and their application in Li^+ recovery. *Journal of Hazardous Materials*. 262: 38-47.
80. Yu, Q., Sasaki, K. (2014). In situ X-ray diffraction investigation of the evolution

- of a nanocrystalline lithium-ion sieve from biogenic manganese oxide. *Hydrometallurgy*. 150: 253-258.
81. Yu, Q., Sasaki, K. (2016). Microwave-assisted hydrothermal synthesis of nanocrystalline lithium-ion sieve from biogenic manganese oxide, its characterization and lithium sorption studies. *Hydrometallurgy*. 165: 118-124.
 82. Zeiner, C. A., Purvine, S. O., Zink, E. M., Paša-Tolić, L., Chaput, D. L., Haridas, S., et al. (2016). Comparative analysis of secretome profiles of manganese (II)-oxidizing Ascomycete fungi. *PLoS ONE*. 11(7): e0157844. doi:10.1371/journal.pone.0157844.
 83. Zeiner, C. A., Purvine, S. O., Zink, E. M., Paša-Tolić, L., Chaput, D. L., Wu, S., Santelli, C. M., Hansel, C. M. (2017). Quantitative iTRAQ-based secretome analysis reveals species-specific and temporal shifts in carbon utilization strategies among manganese (II)-oxidizing Ascomycete fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 106: 61-75.
 84. Zhang Y, Crous PW, Schoch CL, Hyde KD (2012) Pleosporales. *Fungal Diversity*. 52:1–225.
 85. Zhou, Y., Zhang, Y., Li, J., Meng, X., Zhao, J., He, W., & Zhou, L. (2011). Antibacterial and antioxidant activities of the endophytic fungi from medicinal herb *Trillium tschonoskii*. *African Journal of Microbiology Research*. 5(27): 4917-4921.

III. JUSTIFICACIÓN

El estudio y caracterización bioquímica, genética y fisiológica de cepas de especies fúngicas de grupos taxonómicos escasamente estudiados, como el género *Didymosphaeria*, genera información sobre su biología básica que contribuye a tener un mejor entendimiento de su papel ecológico en los ecosistemas de donde provienen, al mismo tiempo que permiten evaluar su potencial biotecnológico.

El análisis del potencial biotecnológico de cepas silvestres de especies fúngicas puede contribuir a generar productos y procesos de alto valor agregado.

IV. HIPÓTESIS

La cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. (sin.= *Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*) secreta las tres enzimas ligninolíticas principales, las cuales están asociadas al potencial biotecnológico de dicha cepa.

V. OBJETIVOS

V. 1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la producción de las tres principales enzimas ligninolíticas de la cepa CMU-196 del hongo *Didymosphaeria* sp. (sin.=*Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*) y evaluar el potencial biotecnológico asociado a la producción de dichas enzimas.

V. 2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar y tipificar a la cepa CMU-196.
2. Evaluar la actividad enzimática extracelular de Lac, LiP y MnP en la cepa CMU-196.
3. Identificar y caracterizar *in silico* los genes y las proteínas correspondientes de las enzimas ligninolíticas de interés en la cepa CMU-196.

4. Realizar una caracterización parcial del potencial biotecnológico de la cepa CMU-196 en relación a su capacidad ligninolítica.
5. Caracterizar a la enzima extracelular ligninolítica producida de manera mayoritaria por la cepa CMU-196.

VI. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se presentan en cuatro capítulos:

VI. 1. Capítulo I. Identification and characterization of the biotechnological potential of a wild strain of *Paraconiothyrium* sp.

VI. 2. Capítulo II. Análisis experimental y bioinformático del complejo de enzimas ligninolíticas en *Didymosphaeria* sp.

VI. 3. Capítulo III. Producción de lacasa extracelular del hongo ascomicete *Didymosphaeria* sp. (sin.=*Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*) en presencia de rastrojo de maíz y digestibilidad ruminal *in vitro* del tratamiento fúngico de dicho sustrato.

VI. 4. Capítulo IV. Purificación y caracterización de la lacasa de *Didymosphaeria* sp. (sin.=*Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*).

Se incluye además un anexo correspondiente a un artículo de divulgación:

Anexo I. Pared celular de las plantas: función, estructura y aplicaciones.

VI.1 CAPÍTULO I.

“Identification and characterization of the biotechnological potential of a wild strain of *Paraconiothyrium* sp.”

Artículo de investigación científica,
publicado en la revista *Biotechnology Progress*

21 de abril de 2018

Identification and Characterization of the Biotechnological Potential of a Wild Strain of *Paraconiothyrium* sp

Marina Arredondo-Santoyo

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México

Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas

División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas Dr. Ignacio Chávez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México

Gerardo Vázquez-Marrufo 

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México

DOI 10.1002/btpr.2653

Published online 00 Month 2018 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

The isolation and characterization of fungal strains from poorly described taxa allows undercover attributes of their basic biology useful for biotechnology. Here, a wild fungal strain (CMU-196) from recently described Paraconiothyrium genus was analyzed. CMU-196 was identified as Paraconiothyrium brasiliense by phylogenetic analysis of the rDNA internal transcribed spacer region (ITS). CMU-196 metabolized 57 out of 95 substrates of the Biolog FF microplates. Efficient assimilation of dextrans and glycogen indicates that CMU-196 is a good producer of amylolytic enzymes. It showed a remarkably assimilation of α -D-lactose, substrate described as inducer of cellulolytic activity but poorly assimilated by several fungi. Metabolically active mycelium of the strain decolorized broth supplemented with direct blue 71, Chicago sky blue and remazol brilliant blue R dyes. The former two dyes were also well removed from broth by mycelium inactivated by autoclaving. Both mycelia had low efficiency for removing fuchsin acid from broth and for decolorizing wastewater from the paper industry. CMU-196 strain showed extracellular laccase activity when potato dextrose broth was supplemented with Cu^{+2} , reaching a maximum activity of $46.8 (\pm 0.33) \text{ U L}^{-1}$. Studied strain antagonized phytopathogenic Colletotrichum spp. fungi and Phytophthora spp. oomycetes in vitro, but is less effective towards Fusarium spp. fungi. CMU-196 antagonism includes overgrowing the mycelia of phytopathogens and growth inhibition, probably by hydrosoluble extracellular metabolites. The biotechnological potential of strain CMU-196 here described warrants further studies to have a more detailed knowledge of the mechanisms associated with its metabolic versatility, capacity for environmental detoxification, extracellular laccase production, and antagonism against phytopathogens. © 2018 American Institute of Chemical Engineers Biotechnol. Prog., 000:000–000, 2018

Keywords: Paraconiothyrium brasiliense, laccase, metabolism, bioremediation, antagonism

Introduction

The genus *Paraconiothyrium* is a recently described taxon of fungi belonging to Ascomycota originally including the new species *P. estuarinum*, *P. brasiliense*, *P. cyclothyrioides*, and *P. fungicola*.¹ Phylogenetic analysis of rDNA regions revealed that the genus *Paraconiothyrium* is in the group Pleosporales and might be clearly differentiated from other Coelomycetes genera such as *Leptosphaeria* and *Helminthosporium*. New species of *Paraconiothyrium* described after the original introduction of the genus include *P. africanum* and *P. variabile*.² Originally described mainly as

endophytes³ or phytopathogens,⁴ species in the genus *Paraconiothyrium* have displayed a broad lifestyle variation, including saprophytism in soil² and estuaries,^{1,5} mycoparasitism,^{1,6} association with the digestive tract of insects,⁷ and opportunistic pathogenesis in humans.⁸

Studies conducted in the species of the recently described genus *Paraconiothyrium* have shown their ample biotechnological potential, including antimicrobial activity of mycelium extracts⁹ and the production of antioxidants and antiproliferative agents of psoriasis-related cells, the latter two induced by ethyl acetate.¹⁰ Substances with pharmacological activity have been isolated from the genus and characterized as furanones,^{7,11} diterpenoids,^{12,13} sesquiterpenes,^{14,15} and epoxyphomalins,⁵ among other types of compounds. Interestingly, the production of the anticancer agent Taxol by *P. variabile* has

Correspondence concerning this article should be addressed to G. Vázquez-Marrufo at gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx.

Table 1. Data of Wild Isolates of Phytopathogenic Microorganisms

Key	Species	Crop/Infected Plant	Provenance in Mexico
COLMM7	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	Mahogany (<i>Swietenia</i> sp.)	Tecomán, Colima
MICMM21	<i>Fusarium mexicanum</i>	Mango (<i>Mangifera indica</i>)	Buenavista Tomatlán, Michoacan
CCJT-1	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Morelia, Michoacan
-	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	New Zealand flax (<i>Phormium tenax</i>)	Morelia, Michoacan
-	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Avocado (<i>Persea americana</i>)	Atécuaro, Michoacan
CH-11	<i>Phytophthora capsici</i>	Chili pepper (<i>Capsicum annuum</i>)	Cuitzillo, Michoacan

also been reported.^{16,17} In addition to the pharmacological potential for human health, both *P. brasiliense*¹⁸ and *P. variable*¹⁹ produce efficient antifungal metabolites *in vitro* that are effective against phytopathogens, and *P. hawaiiense* is entomopathogenic,¹³ suggesting the potential use of the genus for biocontrol of pests affecting economically important crops. Regarding the secretion of extracellular ligninolytic enzymes, Forootanfar and collaborators²⁰ purified and characterized an extracellular laccase from *P. variable* that is highly capable for the removal of chlorophenolic derivatives²¹ and that also effectively decolorizes synthetic dyes.^{22,23} However, to date, such ligninolytic activity has not been reported from any other species of *Paraconiothyrium*.

Studies of the biochemical and physiological characterization of properly identified taxonomically wild strains of fungi contribute to improving the understanding of their ecological roles in ecosystems, at the same time contributing to the evaluation of their biotechnological potential. The latter knowledge is particularly important in species of recently described taxa, such as the genus *Paraconiothyrium*, of which many basic biology aspects are unknown. Given the known diversity of lifestyles and the recent documentation of biotechnological and agronomic relevance as well as sources of pharmaceutical compounds useful for human health, it is important to characterize novel *Paraconiothyrium* strains. In this respect, we performed a taxonomic identification of a wild strain of *Paraconiothyrium*, assessed its metabolic versatility, and assayed its biotechnological potential for environmental detoxification and biological control.

Materials and Methods

Studied strain

Strain CMU 196 was isolated in 2005 from a soil sample adjacent to basidiocarps of an unidentified species in a forest dominated by pine and oak trees (*Pinus* and *Quercus* species) in the Atécuaro region (Michoacan, Mexico: 19°34'26" N - 101°13'36" W). It was deposited in the culture collection (CMU) of the Laboratory of Biotechnology and Conservation of Microorganisms of the University of Michoacan.

Dr. Sylvia Fernández Pavia and Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado of the Institute of Agricultural and Forestry Research (IIAF, UMSNH) provided the strains of phytopathogenic microorganisms used in antagonism and inhibition assays, including four species of fungi and two species of oomycetes (Table 1).

Culture media and production of inocula

Potato dextrose agar medium (PDA, Difco BD, Diagnostics) was used for culture and maintenance of vegetative mycelium and for production of inocula. Inocula were taken with a 6 mm borer from the margins of colonies in log phase growing in PDA medium at 24°C. Potato dextrose broth medium (PDB, Difco BD, Diagnostics) was used in the

assessment of growth kinetics in liquid medium, to determine the enzymatic activity of extracellular laccase, and in decolorization assays. Media were sterilized in an autoclave at 1 kg cm⁻² for 15 min.

DNA extraction, PCR assays, and sequencing

Genomic DNA was extracted from an actively growing mycelium cultured in PDA. The harvested mycelium was placed in 2 mL microfuge tubes filled to 1/4 of the volume with Lysing Matrix C (MP Biomedicals, USA) to which 500 µL of lysis buffer (0.5% SDS, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, and 200 mM Tris-HCl at pH 8.5) was added. Cell lysis was performed in a FastPrep-24 homogenizer (MP Biomedicals, USA) at a speed of 4 m s⁻¹ for 40 s, with subsequent centrifugation at 1,500 g and recovery of the supernatant. The sample was treated with 0.5 U µL⁻¹ of PureLink RNase A (Invitrogen, USA) at 37°C for 1 h, after which DNA was extracted with phenol-chloroform (1:1 v/v), precipitated with one volume of cold isopropanol, once more centrifuged recovering the resulting pellet, washed in sterile deionized water, and resuspended in 25 µL of 100 mM Tris-HCl at pH 8.5. The integrity of the extracted DNA was corroborated in 1% agarose gels stained with SYBER Green (Invitrogen, USA).

The oligonucleotide pair ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS-4 (5'-TCCTCGCTTATTGATATGC-3')²⁴ was used for amplifying the internal transcribed spacer regions 1 and 2 (as well as the 5.8S rRNA subunit between them [ITS1-5.8S-ITS2]) of the nuclear ribosomal unit. The reaction mix used for PCR amplification contained the following: 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0; 1.5 mM MgCl₂; 0.2 mM of each dNTP, 1 mM of each oligonucleotide, 0.5 U of recombinant *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA), and a total of 25 ng of template DNA, adjusting the final volume to 25 µL with sterile deionized water. Polymerase chain reactions (PCRs) were performed with an initial denaturing cycle of 3 min at 95°C, 35 alignment cycles at 55°C for 30 s, a 2 min extension cycle at 72°C, and a final extension cycle of 10 min at 72°C. PCR products were analyzed in 2% agarose gels stained with SYBER Green (Invitrogen, USA). The amplified product (552 bp) was purified and sequenced by Elim Biopharmaceuticals (Hayward CA). The obtained sequence was deposited into GenBank with accession number MF490293.

Phylogenetic analysis

The sequence of the ITS region (ITS1-5.8S-ITS2) of strain CMU-196 was analyzed in the NCBI GenBank database using the BLASTN algorithm. Sequences in the database having a similarity equal to or greater than 95% of the studied sequence were selected for the phylogenetic analysis, and environmental sequences or those with undetermined bases were discarded. The ITS sequences of

Helminthosporium velutinum and *H. solani* were used as the outgroup and sequences of *Paraphaeosphaeria sporulosa*, formerly classified within *Paracanoniathyrium*, were also included in the analysis. Details on the multiple alignment using the software SATé,²⁵ its optimization using MES-QUITE v. 3.10,²⁶ and grouping pattern construction using maximum parsimony (MP) in the PAUP 4.0a150²⁷ package were previously described in Damián-Robles et al.²⁸ This last analysis was conducted by means of a heuristic search with the TBR branch swapping option, excluding gaps and uninformative characters, which resulted in a final matrix with 552 characters. The phylogenetic analysis using Bayesian inference (BI) in the software MrBayes v.3.2²⁹ was also previously described.²⁸

Culture in liquid media

Liquid media cultures were used to determine the growth rates of the strain, evaluating the basal and induced levels of extracellular enzymatic activity of laccase, and for quantitative determination of dye decolorization; 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of PDB medium were inoculated with 6 cylindrical inoculum plugs obtained as previously described. Inoculated media were cultured at 24°C with agitation at 120 rpm. Laccase activity was induced by addition of CuSO₄ at 150 μM. The growth kinetics was constructed by determining the dry weight of the mycelium every 24 h for 15 days in the abovementioned culture conditions.

Metabolic versatility

Strain CMU-196 was incubated as previously described over a sweet cellophane membrane on PDA medium for 8 days at 24°C. The mycelium was recovered without agar by removing the cellophane membrane with the attached biomass and processed as previously described for inoculum preparation,³⁰ with minor modifications. Briefly, the harvested mycelium was transferred to a borosilicate test tube containing 16 mL of sterile Phytigel solution (0.25% Phytigel, 0.03% Tween 40, H₂O_{dd}) and macerated manually with a plastic grinder to obtain a homogeneous suspension. The suspension was adjusted to a transmittance value of 75 (±2) at a wavelength of 590 nm, which was measured in a turbidimeter provided by the supplier (Biolog, Hayward, CA). Next, 100 μL of the mycelium suspension was added to each well of a Biolog FF MicroPlate (Biolog, Inc., Hayward, CA), and the plate was incubated in darkness at 24°C. Absorbance was read at 750 nm in a Biolog MicroStation Reader (Biolog, Hayward, CA) to measure mycelial growth.

Decolorization of synthetic dyes and wastewater from the paper industry

Liquid cultures in PDB were independently supplemented with the synthetic dyes acid fuchsin (AF), remazol brilliant blue R (RBBR), Chicago sky blue (CSB), and direct blue 71 (DB71) at a concentration of 150 mg L⁻¹.³¹ For analyzing decolorization of wastewater from the paper industry (black liquor), a sample of black liquor was collected directly from the pumping sump of a local paper production plant, 50 mL of the black liquor was placed in 250 mL Erlenmeyer flasks, and 2% (w/v) glucose was added to promote the growth of strain CMU-196. Synthetic dyes and the black liquor used in

assays were previously sterilized by filtration through a 0.45 μm Millipore® membrane.

For assessing global decolorization by the fungus, assays were run with both active mycelium and with mycelium inactivated by sterilization. For assays using active mycelium, the Erlenmeyer flasks were inoculated as previously described, and growth kinetics were obtained. To determine the contribution to the process of decolorization of biosorption by the fungal biomass, 6 inoculum plugs obtained as previously described were added to a liquid medium culture that was incubated for 5 days at 24°C with agitation at 120 rpm to reach an average log phase of growth, after which the cultures were inactivated at 121°C (1 kg cm⁻²) for 15 min, filtered to eliminate the culture medium, and the resulting mycelium washed with sterile deionized water. After processing, the mycelium was added to Erlenmeyer flasks with culture medium supplemented with the substances of interest and reincubated at 24°C with agitation at 120 rpm. Assays of active mycelium were incubated for 10 days, while assays of inactivated mycelium were incubated for 3 days.

Percentages of decolorization were determined in 1 mL aliquots taken every 24 h by measuring the decrease in absorbance at the wavelengths specific for each tested synthetic dye (540 nm for AF, 592 nm for RBBR, 610 nm for CSB, and 585 nm for DB71). Degradation of phenolic compounds in black liquor was determined spectrophotometrically at 280 nm. Percentages of decolorization were calculated by the formula: decolorization (%) = [(A_i - A_f/A_i) × 100], where A_i is the absorbance of the initial reaction mix and A_f is the absorbance after the incubation period.²³

Determination of extracellular laccase activity

Extracellular laccase activity was determined in both basal and CuSO₄-induced cultures. In both culture conditions, 1.5-mL aliquots were taken every 24 h for 15 days, and mycelium remains were eliminated by centrifugation at 750g for 5 min. Extracellular laccase activity was determined by measuring the oxidation of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS) at 420 nm.³² The reaction mix contained 50 mM McIlvaine pH 4.0 buffer, 1 mM ABTS, and 100 μL of the aqueous phase recovered from the centrifuged culture medium. Samples were incubated at 30°C for 20 min, and the reaction was stopped by the addition of 0.5% (v/v) aqueous solution of trichloroacetic acid. The formation of the cationic radical was determined by measuring the increase in absorption at 420 nm (ε₄₂₀ = 36,000 M⁻¹ cm⁻¹). Enzyme activities were expressed in units (U), defined as micromoles of product formed from substrate per minute (μmol/min).

Assays of antagonism and inhibition of phytopathogenic microorganisms

The antagonistic capacity of strain CMU-196 was evaluated according to Cherif.³³ Each experiment consisted of inoculating one extreme of a 90 mm Petri plate with a 6 mm disc of actively growing mycelium of strain CMU-196 that, due to the slow growth of the strain, was cultured for 5 days at 24°C, allowing for the development of a large enough colony. Once that stage was reached, the opposite extreme of Petri plates was inoculated with a 6 mm disc taken from the margins of actively growing colonies of the tested

phytopathogenic fungi and oomycetes (Table 1). Strains were inoculated at a distance of 6 cm from each other and incubated in darkness at 24°C. Percentage of inhibition was determined by the formula:³⁴ inhibition (%) = $[(D1 - D2)/D1 \times 100]$, where *D1* is the diameter of the colony of the phytopathogenic microorganism in PDA free of antagonist and *D2* is the diameter of the colony of the same phytopathogenic microorganism growing in the presence of strain CMU-196.

The cellophane paper method³⁵ was used for the inhibition assays, which consisted of cutting 90-mm-diameter cellophane paper circles that were washed in distilled water and sterilized at 121°C (1 kg cm⁻²) for 15 min. The sterilized cellophane paper discs were placed on top of Petri plates containing PDA medium. The center of the cellophane paper discs was inoculated with a 6-mm-diameter cylindrical inoculum taken from the margins of actively growing colonies of strain CMU-196, and the plates were incubated at 24°C. Once the mycelium covered one-half of the culture medium surface, the cellophane paper discs with the adhered fungal colonies were removed from the plates. Using the same culture medium in which strain CMU-196 was previously cultured, independent experiments were performed by inoculating each one of the species of phytopathogenic microorganisms as described above, incubating the plates at 24°C, and measuring the radial growth of the colonies every 24 h. Likewise, and using the same culture medium, control plates in which strain CMU-196 had not previously grown were inoculated with the phytopathogenic microorganisms. The experiments ended when the mycelium of the phytopathogenic microorganisms had covered the entire surface of the culture medium in the control Petri plates. The percentage of inhibition of phytopathogen mycelial growth was determined by the formula previously described for antagonism assays.³⁴ Here, *D1* is the diameter of the phytopathogenic microorganism growing in PDA free of inhibitors, and *D2* is the diameter of the colony of the same microorganism growing in Petri plates containing PDA medium in which strain CMU-196 was previously grown on a cellophane paper disc.

All aforementioned assays were run in triplicate, the resulting data were averaged, and the standard error of the results was calculated. Data were compared by analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparisons test. The results are reported as the mean ± standard error (S.E.). *P* values of < 0.05 were considered significant.

Results

Phylogenetic analysis of strain CMU-196

BLASTN analysis of the 552 bp sequence of the ITS region of strain CMU-196 showed a 99% identity with the ITS sequences of several geographic isolates of *Paraconiothyrium brasiliense* deposited in the NCBI GenBank and identities above 80% with other sequences of *Paraconiothyrium* spp. available in GenBank. The resulting phylogenetic tree shows the species of *Paraconiothyrium* grouping in different branches with high support from both phylogenetic reconstruction criteria applied to the analysis (Figure 1). The tree was rooted using as an outgroup the ITS sequences of *Helminthosporium velutinum* and *H. solani*. In general, whenever several sequences of conspecific geographic isolates were included, the isolates grouped together within the same terminal branch. Such was the case of the terminal

branch grouping the ITS sequences of geographic isolates of *P. brasiliense*, within which CMU-196 was included (Figure 1). Exceptions were isolates of *P. estuarinum* that did not form a well-defined terminal branch, although they grouped adjacently. The tree branches with good bootstrap/posterior probability values grouped the ITS sequences of strains formerly classified outside *Paraconiothyrium* together with ITS sequences of well-defined species of the genus. Such was the case of the branches grouping the pairs *Coniothyrium fuckelii*/*P. fuckelii* (98.1/0.98) and *Microdiplodia hawaiiensis*/*P. hawaiiensis* (98.8/1). However, the ITS sequences of *Paraphaeosphaeria sporulosa*, formerly classified within *Paraconiothyrium* were grouped inside the genus together with *P. fungicola* strains. Finally, ITS sequences of *P. nelloi* formed a unique terminal branch that was separated from the ITS sequences of the remaining species of the genus (Figure 1).

Metabolic versatility

Strain CMU-196 showed ample metabolic versatility, efficiently metabolizing 57 substrates beginning on day 3 of culture, which included polymeric compounds α-cyclodextrin, β-cyclodextrin, dextrin, glycogen, and Tween 80, as well as uridine. Additionally, the studied strain efficiently used a large number of carbohydrates such as arbutin, D-arabinose, D-arabitol, D-cellobiose, D-raffinose, L-arabinose, maltitol, maltose, and turanose; the amino acids L-asparagine and L-glutamic acid; the amine D-glucosamine; the carboxylic acids D-gluconic acid and D-malic acid; and adenosine, amygdalin, and glycerol, represented in dark gray in Table 2. A total of 13 substrates were moderately assimilated by strain CMU-196, including succinamic acid, L-alanine, L-ornithine, L-threonine, D-ribose, *m*-inositol, L-lactic acid, and salicin (Table 2).

Decolorization of media supplemented with synthetic dyes

Figure 2A shows the patterns of decolorization of broth medium supplemented with synthetic dyes by metabolically active mycelium of strain CMU-196. Broths containing synthetic dyes DB71 and RBBR were completely decolorized (100%), with the initial absorbance reducing to zero at 4 and 5 days of culture, respectively. Decolorization of CSB medium was 96% at day 7 of culture. AF medium was decolorized beginning on day 3 of culture, showing a gradual decolorization of the original absorbance until reaching 63% at day 10 of culture.

When inactivated mycelium was used, media decolorization for all tested synthetic dyes began between the first and second day of incubation (Figure 2B), after which the absorbance values remained practically unchanged until the end of the experiments. The efficiency of decolorization by inactivated mycelium of AF and RBBR was less than the same in the presence of actively growing mycelium; in the first instance, decolorization reached a final value of 13%, and in the second case, decolorization reached a value of 59%. Inactivated mycelium efficiently removed the synthetic dyes CSB and DB71 from the aqueous solution, with the decolorization reaching a final value of 95%.

Decolorization of wastewater from the paper industry

The final decolorization percentages of black liquor recorded for actively growing and inactivated mycelium were similar, with values of 13 and 11%, respectively; however, the

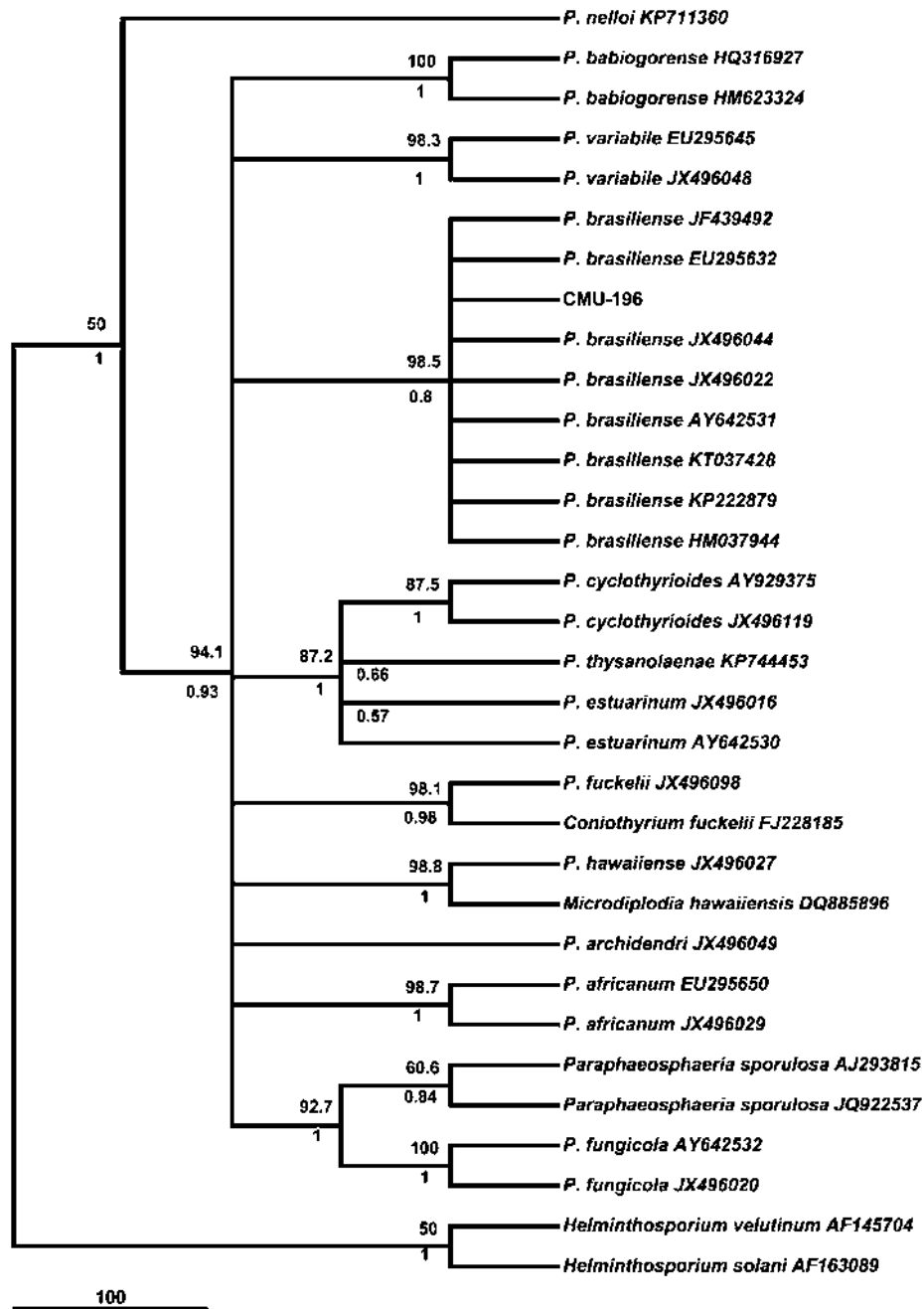


Figure 1. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the ribosomal ITS region of strain CMU-196.

Sequences selected from the NCBI GenBank appear with their corresponding accession number. The tree was generated with maximum parsimony (MP) and Bayesian inference (BI) but only the MP tree is shown because the BI tree is congruent with the same grouping pattern. In each node the bootstrap (1000 iterations) values above 50 and the Bayesian probability values above 0.5 are shown. Sequences of *H. velutinum* and *H. solani* were used as outgroup.

decolorization profiles were different in each case (Figure 3). In the presence of metabolically active mycelium, the absorbance gradually decreased from the first to the tenth day of

incubation, while inactivated mycelium caused the absorbance to decrease from the first to the third day of incubation, when the decolorization percentage was 11%.

6

Table 2. Assimilation Efficiency of Carbon and Nitrogen Sources by Strain CMU-196*

Amino/Amides	Amino Acids	Carbohydrates	Carboxylic Acids	Miscellaneous	Polymers
D-Glucosamine Glucuronamide	L-Asparagine L-Glutamic Acid L-Ornithine	Adonitol D-Arabinol D-Mannitol D-Fructose D-Melibiose D-Raffinose L-Arabinose L-Sorbitose Maltitol Sedoheptulosan D-Glucose	γ-Hydroxy-butyric Acid D-Gluconic Acid D-Glucuronic Acid D-Malic Acid D-Saccharic Acid L-Malic Acid Quinic Acid β-Hydroxy-butyric Acid α-Keto-glutaric Acid Fumaric Acid	Adenosine Amygdalin Adenosine-5'-Monophosphate D-Lactic Acid Methyl Ester Glucose-1-Phosphate Glycerol Salicin Uridine Bromosuccinic Acid Succinic Acid Mono-Methyl Ester	α-Cyclodextrin β-Cyclodextrin Dextrin Glycogen Tween 80
2-Amino ethanol Alaninamide Putrescine Succinamic acid	Glycyl-L-Glutamic Acid L-Alanine L-Alanyl-Glycine L-Proline L-Pyroglutamic Acid L-Threonine γ-Amino-butyric Acid	L-Alaninol D-Arabinose D-Fructose D-Melibiose D-Raffinose L-Arabinose L-Sorbitose Maltitol N-Acetyl-D-Galactosamine Sedoheptulosan α-D-Glucose β-Methyl-D-Glucoside D-Xylose β-Methyl-D-Glucoside Gentobiose Sucrose	L-Lactic Acid N-Acetyl-L-glutamic Acid Succinic Acid 2-Keto-D-Gluconic Acid D-Galacturonic Acid p-Hydroxyphenylacetic Acid Sebacic Acid		
	L-Aspartic Acid L-Phenylalanine L-Serine				

*Carbon and nitrogen sources are clustered by chemical group and the cell color represent ranges of absorbance at 750 nm: dark grey ($0.74 \leq A_{750} \leq 0.974$), high mycelium growth; light grey ($0.45 \leq A_{750} \leq 0.74$), intermediate mycelium growth; white ($0 \leq A_{750} \leq 0.45$), low mycelium growth.

Biotechnol. Prog., 2018, Vol. 00, No. 00

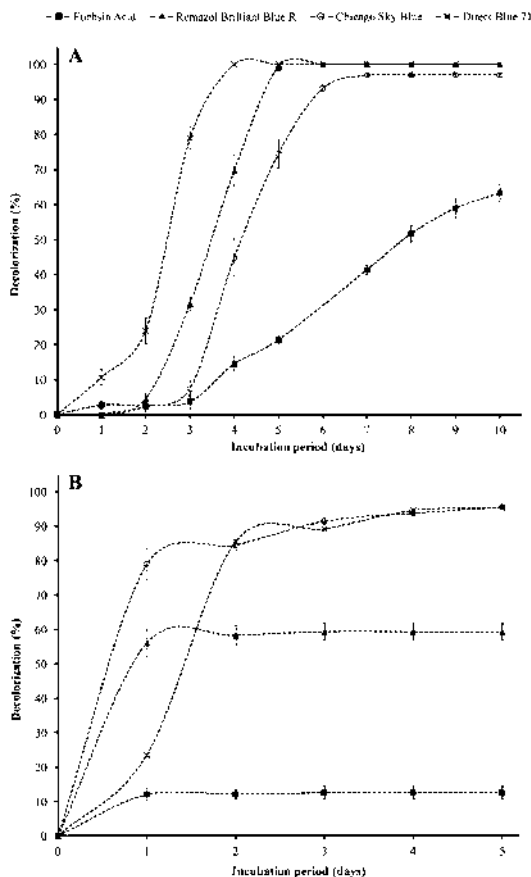


Figure 2. Decolorization of aqueous solutions of synthetic dyes by strain CMU-196.

Shown are the decolorization profiles by metabolically active mycelium (A) and by mycelium inactivated by autoclaving (B). The results are reported as the mean \pm standard error (S.E.).

Biomass production and determination of extracellular laccase activity

The amounts of biomass produced in basal liquid medium and in liquid medium supplemented with CuSO_4 were similar for every sampling interval and until the end of the incubation period, and we observed no significant differences in growth rates in either culture condition; in both cases, the log phase was reached after 3 days of incubation (Figure 4). The total biomass on the last day of incubation was 88 mg in basal culture medium and 80 mg in culture medium containing CuSO_4 . Extracellular laccase activity in basal culture conditions was practically undetected throughout the incubation period, but in the presence of CuSO_4 , extracellular laccase activity was apparent from day two of incubation and persisted along the incubation period, peaking to $46.8 (\pm 0.33) \text{ U L}^{-1}$ at the end of the log growth phase on day 5 (Figure 4). The maximum value recorded of extracellular laccase activity was 46 times higher than the basal culture. After reaching a maximum, the extracellular laccase activity gradually decreased to a value of $7.6 (\pm 0.79) \text{ U L}^{-1}$ at day 10 of incubation.

In vitro analysis of the antagonism capacity of CMU-196 against phytopathogenic microorganisms

The results of antagonism assays in dual culture were varied (Figure 5). Antagonism against *F. mexicanum* showed an inhibition percentage of 36.6%, making this phytopathogen the most resistant to CMU-196 (Figure 6A). The percentage inhibition against *F. pseudocircinatum* was 52.5%. In confrontation with *C. gloeosporioides* an inhibition percentage of 68.7% was obtained, whereas against *C. coccodes*, the observed inhibition was 57.1%. The highest level of

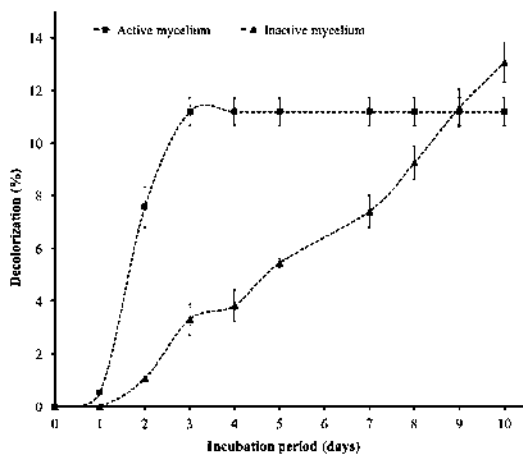


Figure 3. Decolorization of wastewater from the paper industry by strain CMU-196.

Shown are the decolorization profiles by metabolically active mycelium (A) and by mycelium inactivated by autoclaving (B). The results are reported as the mean \pm standard error (S.E.).

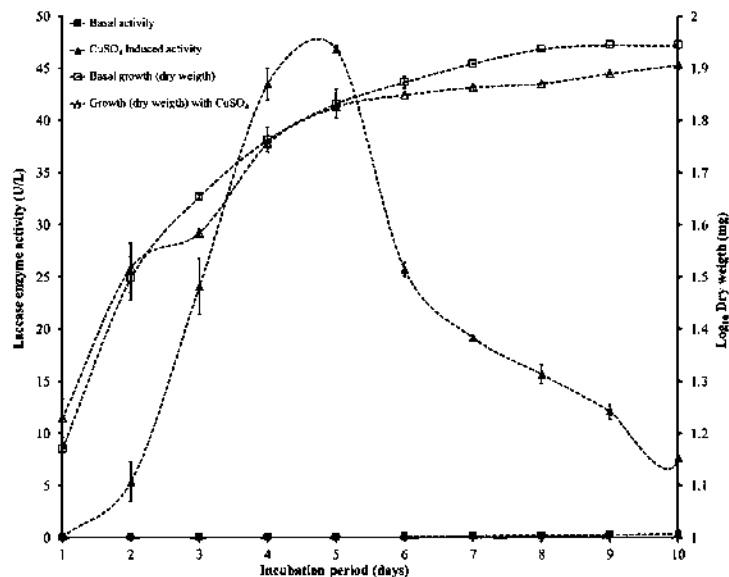


Figure 4. Growth kinetics and extracellular laccase activity of strain CMU-196.

Shown are the fungal biomass and extracellular laccase activity in basal culture conditions in PDB medium and in PDB medium supplemented with CuSO₄. The results are reported as the mean \pm standard error (S.E.).

antagonistic efficiency was against both species of oomycetes tested, *P. cinnamomi* and *P. capsici* (Figure 5), with inhibition percentages of 91.1 and 70%, respectively (Figure 6A).

Variabile results were also found in assays in which the mycelium of the tested phytopathogenic species was cultured in a medium previously incubated with strain CMU-196 (Figure 5). For *F. mexicanum*, the inhibition was 56.66% at day 5 after inoculation, and at day 10, the inhibition persisted at a level of 45.04% (Figure 6B). The inhibition observed with *F. pseudocircinatum* after 5 days was 38.09%, but at day 10, the phytopathogen increased its growth, and the inhibition decreased to 14.49%. Inhibition of *C. gloeosporioides* was 62.59% at day 5 and 47.23% after the 10 days of incubation, whereas for *C. coccodes*, the inhibition percentages were close to the previous values at both incubation times. As in the confrontation assays, the inhibition of both tested species of *Phytophthora* remained above 75% at days 5 and 10 for both species.

Discussion

The phylogenetic analysis of strain CMU-196 indicated that it belongs to *P. brasiliense*, robustly grouping with the different geographic isolates of the species deposited in the NCBI GenBank. Choosing *H. velutinum* and *H. solani* as the outgroup was adequate because both species are Pleosporales closely related to the genus *Paraconiothyrium* and because, in previous phylogenetic studies describing new species of the genus, they branch in adjacent clades.^{2,36}

In general, based on the high bootstrap values and posterior probability of internal and terminal branches of the phylogenetic tree, the ITS region appears to be a good marker for typing wild isolates of *Paraconiothyrium* and properly differentiates between most of the species in the genus

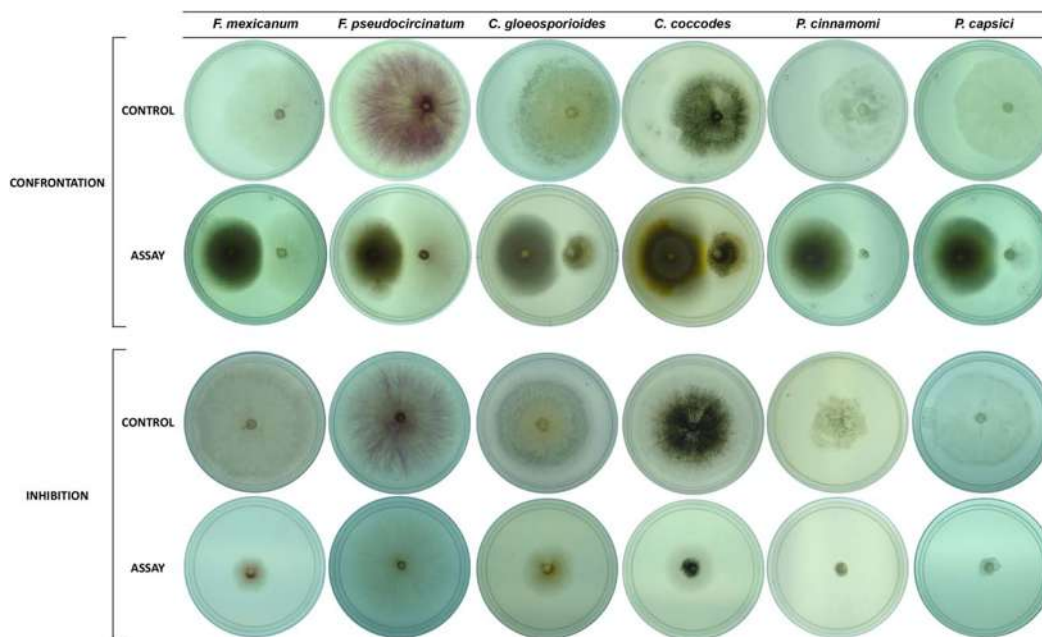


Figure 5. Antagonism and growth inhibition of phytopathogenic fungi and oomycetes by strain CMU-196.

In confrontation assays, the left side of plates was inoculated with strain CMU-196 and the right side with the tested phytopathogen specified in each column. The CMU-196 strain was not inoculated in the control plates. See Materials and Methods for details.

available in the GenBank. Accessions submitted to the GenBank database before description of the genus *Paraconiothyrium*—assigned to other taxa such as *Microdiplodia hawaiiensis* and *Coniothyrium fuckelii*—also group with accessions later identified as species of *Paraconiothyrium*. However, the grouping of *Paraphaeosphaeria sporulosa* with *P. fungicola* here obtained clearly shows the need to use more loci when the goals are to obtain detailed phylogenetic relationships among *Paraconiothyrium* species and a clear differentiation from other closely related genera. In the case of strain CMU-196, its robust identification within *P. brasiliense* made it unnecessary to use additional genomic sequences to type it.

The analysis in Biolog FF plates, also known as phenotypic microarray analysis, is adequate for identifying the metabolic capabilities of fungi.³⁷ Strain CMU-196 displayed an ample metabolic capacity to assimilate compounds from diverse chemical groups. Such information about the capacity for using different C and N sources is relevant for better understanding of the metabolism and physiology of strains in the genus *Paraconiothyrium* in relation to their life styles and for biotechnological perspectives in view of optimizing their production of potentially useful enzymes and secondary metabolites. In the latter case, the production of secondary metabolites by *P. brasiliense*¹⁵ makes it important to know its capacity for using different substrates because the different C and N sources and the concentration of glucose have a remarkable influence.³⁸

Some of the substrates efficiently metabolized by strain CMU-196 are of biotechnological importance, such as uridine and α -D-lactose, both being related because the former is essential for metabolizing the second compound after

breaking of the disaccharide and because the latter is a carbohydrate used for expressing cellulases that very few fungi are capable of efficiently assimilating.³⁹ Other substrates efficiently used for growth by strain CMU-196 were α -cyclodextrin, β -cyclodextrin, dextrin, and glycogen which are complex carbohydrates degraded by amylolytic enzymes,^{40,41} indicating that *P. brasiliense* is a good source of such enzymatic activity. Additionally, it has been demonstrated that in the basidiomycete fungi *Ustilago maydis*, Tween 80 is a substrate for the enzyme esterase Uml2,⁴² and putative orthologous genes have been identified in other fungi. Thus, it is possible that a similar or the same enzyme activity is present in strain CMU-196 of *P. brasiliense*. Interestingly, Tween 80 has been identified as a laccase inducer in basidiomycetes⁴³ and ascomycetes.^{44,45} Thus, both the possible presence of lipase Uml2-like enzyme and the induction of extracellular laccase activity by Tween 80 are issues of interest for further studies in strain CMU-196, owing to its optimal growth in this substrate. Finally, among C and N sources used efficiently by strain CMU-196, some have been described as good laccase inducers in fungi, including L-glutamic acid^{43,46} and L-asparagine.⁴⁶ Because of their positive effect on the growth of strain CMU-196, such substrates might be evaluated further in order to assess their effect on extracellular laccase activity.

Metabolically active mycelium of strain CMU-196 was able to efficiently decolorize a medium supplemented with synthetic dyes from the azo (CSB and DB71) and anthraquinone (RBBR) groups that we tested, but the medium with dye AF of the triphenylmethane group was recalcitrant to decolorization by the strain. The efficiency of removal of dyes from aqueous solutions by metabolically active

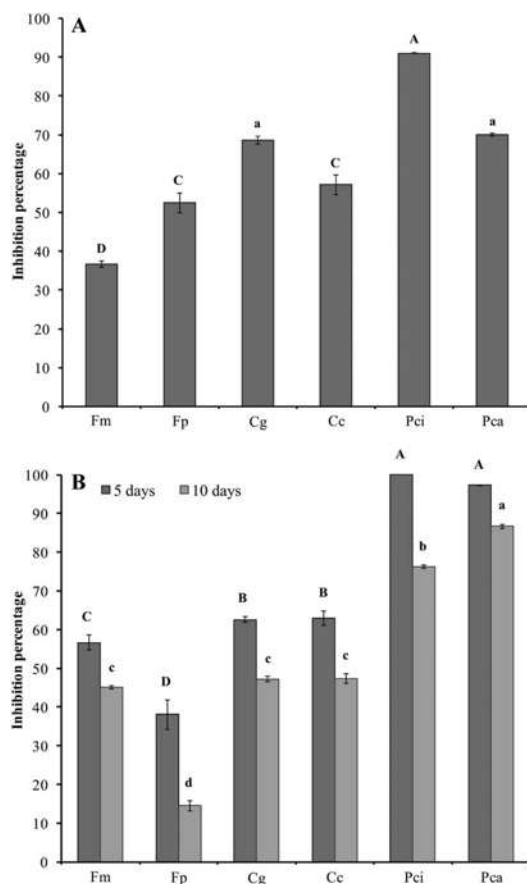


Figure 6. Inhibition and growth of phytopathogenic fungi and oomycetes in confrontation with strain CMU-196.

Shown are the values of percentage inhibition from the antagonism assays (A) and from the inhibition assays by the cellophane paper method (B) at days 5 and 10 of incubation. Key: Fm, *F. mexicanum*; Fp, *F. pseudocircinatum*; Cg, *C. gloeosporioides*; Cc, *C. coccodes*; Pci, *P. cinnamomi*; Pca, *P. capsici*. The results are reported as the mean \pm standard error (S.E.). ANOVA with Tukey's multiple comparisons test was used. Different letters represent significant difference ($p < 0.05$).

mycelium depends on several incubation factors, including type of C and N sources, pH, temperature, and incubation time.^{47,48} Although, in our work, no efforts were made to optimize the incubation conditions for decolorization by strain CMU-196, we observed considerably high levels of decolorization of all tested synthetic dyes. It is possible that the efficiency of color removal by the studied strain could be optimized by modification of the culture conditions, thereby reducing the time needed for decolorization and increasing the efficiency of decolorization of AF.

Removal of synthetic dyes from aqueous solutions by metabolically active mycelium has been mainly attributed to the activity of the extracellular ligninolytic enzymes, mainly laccase, manganese peroxidase, and lignin peroxidase,⁴⁸ which are induced by phenolic compounds including dyes in the azo group.⁴⁹ In the case of the genus *Paraconiothyrium*, decolorization capacity has been previously evaluated in *P. variable* only, establishing that a crude extract of

extracellular laccase of this species efficiently decolorized dyes from the triphenylmethane group, but in the case of the anthraquinone group dye RBBR, the decolorization percentage was below 50%, and there were lower percentages for dyes in the azo group. Contrastingly, the laccase purified from *P. variable* preferentially decolorized azo dyes in comparison to anthraquinone dyes at different levels of efficiency.²³ The differences between assays using crude extracts and those using the purified enzyme could be due to the presence in the former case of other oxidative enzymatic activities⁴⁸ and the Fenton oxidizing mechanism,⁵⁰ which was not evaluated in the abovementioned studies. Given we showed that the extracellular laccase activity of strain CMU-196 is induced by Cu^{+2} , it is necessary to conduct future evaluations in order to determine if crude extracts or purified laccase of *P. brasiliense* can be as efficient and selective for decolorization as those of *P. variable*. Another question needing further investigations is whether the observed differences in decolorization efficiency of dyes from different chemical groups by *P. variable* and *P. brasiliense* (CMU-196) are due to differences in the capacity of the laccases produced by each species for processing the same phenolic structures.

The inactivated mycelium of CMU-196 efficiently removes only the azo dyes from broth, with AF again being the least effectively removed dye. While the mechanism of detoxification of aqueous or residual waters polluted with dyes by biosorption has been evaluated for different species of filamentous fungi, particularly for the Ascomycetes,⁴⁸ until now, biosorption had not been previously studied in any species of *Paraconiothyrium*. We consider biosorption to be a physicochemical process (independent of metabolism) that consists of the removal of substances (dyes in our case) by some kind of biological material,⁵¹ which in this case, is mycelium that is metabolically inactivated by autoclaving. The inactivated mycelium of CMU-196 displayed maximum removal from solution of three of the tested synthetic dyes, with two reaching that level after 24 h of treatment and, in the case of CSB, after 48 h. Taking into account the differences in experimental designs applied in each study and considering we did not attempt to optimize the biosorption process, the percentages of decolorization of dyes and the time needed for their removal that we observed in strain CMU-196 match previous results obtained using several species of fungi and dyes, sometimes even being better.⁴⁸ It has been proposed that autoclaving a mycelium might enhance its biosorption capacity because of an increased number of binding sites for dyes, especially functional groups from the cell wall and the plasma membrane.⁴⁸ In particular, carboxyl, amino, and phosphate groups and the fatty fractions of autoclaved mycelia have been postulated to be involved in biosorption together with electrostatic interactions for removing different dyes from aqueous solution.⁴⁸ However, no studies are available of the polymers present in the cell wall of the species of *Paraconiothyrium* that allow precisely establishing the possible functional groups involved in dye removal from solutions. In filamentous ascomycetes, whose cell wall has been analyzed in detail, the main polymers found are chitin, β - and α -1,3-glucans and integral membrane proteins,⁵² which could provide the functional groups involved in the biosorption process and should also be present in *P. brasiliense* and participate in the biosorption process we observed.

Although final percentages of decolorization of CSB and DB71 dyes were similar between active and inactive mycelium, the decolorization profiles were clearly different. The maximal decolorization level of the inactive mycelium was attained after ~2 days of incubation for both dyes, whereas for the active mycelium, the maximal decolorization level was attained after 3 days for DB71 and after 6 days for CSB. This faster maximal dye removal of inactive mycelium compared to active mycelium might reflect that, because of the autoclaving process, the abovementioned probable binding sites might not have been exposed in the active mycelium as they were in the inactive mycelium. Otherwise, the decolorization profile in active mycelium might be indicative of the time the CMU-196 strain takes to synthesize and secrete enzymes responsible for dye degradation. This same explanation might apply to differences in decolorization profiles among active and inactive mycelium for wastewater discussed below. Wastewater released from pulping and bleaching plants from the paper industry contains a high number of polluting organochlorine compounds, including phenols, aldehydes, acids, and ketones, because of which research on methods for decontamination by chemical, physical, and biological processes has been conducted.⁵³ The white rot fungi have been more thoroughly studied in this context, although color removal values of up to 80% have been achieved with ascomycetes from the genera *Trichoderma*, *Penicillium*, and *Aspergillus* in treatment periods of 2 to 5 days.⁵³ The low percentages of color and phenolic compound removal from black liquor by live mycelium of strain CMU-196 that we observed might be due to the low growth rate of the strain in the medium with black liquor (data not shown) and the presence in the treated wastewater of pollutants. Studies of growth kinetics of the strain in different dilutions of black liquor are needed to identify the concentration for optimal growth of the fungus providing efficient decolorization and detoxification of paper industry wastewaters. In the case of the inactivated mycelium, it is possible that the low pH of the tested wastewater could have modified the charges of functional groups inhibiting the interaction of the mycelium with the pollutants and their removal, but other factors, such as ionic force, also deserve further consideration.⁴⁷ Further studies are needed concerning different conditions of pH and treatment of strain CMU-196 mycelium in order to increase its efficiency for biosorption of pollutants present in paper industry wastewaters.

We observed absence of extracellular laccase activity in strain CMU-196 in basal PDB medium, but in the same medium supplemented with CuSO_4 , the activity was up to $46.8 (\pm 0.33) \text{ U L}^{-1}$ on day 5. In general, ascomycetes have low levels of laccase activity compared with those of white rot basidiomycetes. Several reported high extracellular laccase activity levels within ascomycetes were measured in induced conditions where along with CuSO_4 or independently, other supplements were added to the broth culture.^{54,55} Despite these findings, laccase activity of strain CMU-196 in the presence of CuSO_4 is similar or higher than those reported for other ascomycetes in induced cultures with CuSO_4 and/or phenolic compounds.^{56–58} In some cases, high laccase activity in ascomycetes were measured only after induction and prolonged (more than 10 days) incubation times, and the growth kinetics of the studied strains were not documented.^{59,60} Furthermore, in several ascomycetes, laccase activity has not been detected, even in induced medium.^{59,61}

The only species of the genus *Paraconiothyrium* previously reported to produce extracellular laccase is *P. variable*.^{20,62} Both previous studies used complex culture media and reported extracellular laccase activities on day 9–10 of incubation of up to ten times higher than that we observed in *P. brasiliense*. In one of these studies, the growth medium was also supplemented with vitamins and bran,⁶² and the quantity of inoculum added to the liquid medium was not described. In the other work, the high levels of laccase activity were recorded after adding both CuSO_4 and xylitol to the broth after 3 days of incubation.²⁰ Thus, further studies are needed in which strain CMU-196 is cultured under the same conditions previously used for *P. variable* in order to determine if *P. brasiliense* CMU-196 is capable of reaching similar levels of laccase activity.

The strains used in the description of *P. variable* as a new taxon were associated with necrotic wood tissue of different tree species,² while the holotype of *P. brasiliense* was isolated from the fruit of a coffee tree.¹ Later, reports documented strains from both species as endophytes in different plant species,^{16,63,64} and in another study made in the same geographical region, *P. brasiliense* and *P. variable* were described as pathogens associated with wood necrosis in pear and apple trees, respectively.⁴ Because diverse functions have been assigned to fungal extracellular laccase,⁶⁵ it is interesting to make future comparative studies of this enzymatic activity in *P. brasiliense*, *P. variable*, and other species in the same genus. Recent bioinformatics studies have found structural differences between genes and proteins of extracellular laccase from species in the ascomycetes genera *Fusarium*⁶⁶ and *Fonsecaea*.⁶⁷ Interspecific differences among species in the same genus have been related to different functionalities of extracellular laccases, possibly related to the lifestyle of each species.^{66,67} Therefore, besides the biotechnological relevance of fungal extracellular laccases, the structural and functional comparison of this enzyme in *P. brasiliense* CMU-196, *P. variable*,²⁰ and other species of the genus would also provide valuable information about the lifestyles of these recently described taxa.

Analysis of the antagonistic capacity by strain CMU-196 included *F. mexicanum*, which has not been confronted with any biocontrol organism before and is associated with mango malformation in Mexico.⁶⁸ In both the inhibition and the antagonistic assays, the phytopathogenic strains most susceptible to strain CMU-196 were the two species of *Phytophthora*, and the more resistant were the fungi in the genus *Fusarium*, in particular, *F. mexicanum*. The capability for antagonism of *P. brasiliense* *in vitro* was previously evaluated against the phytopathogenic fungi *Alternaria panax*⁶³ and *Rhizoctonia solani*.⁶⁴ Additionally, Han and collaborators⁶⁹ reported that extracts of the extracellular medium in which *P. brasiliense* had been cultured inhibited the growth of several phytopathogenic fungi, such as *Fusarium oxysporum*, *F. graminearum*, and *Cryphonectria parasitica*, among others, and of the oomycete *Phytophthora capsici*. Therefore, the use of culture extracts of strain CMU-196 deserves future consideration.

Overall, the results of this study indicate that strain CMU-196 uses a mixture of antagonism mechanisms, including the attack at distance by production of antifungal metabolites and direct contact attack for lysing the cells of phytopathogens. While secretion of extracellular hydrolytic enzymes by *P. brasiliense* has been scarcely studied, some reports have

shown the capacity of the species for producing furanones^{7,11} and sesquiterpenes.^{14,15} Thus, detailed studies are needed of the production of enzymes and secondary metabolites by CMU-196 during *in vitro* antagonism assays, in order to understand the biochemical and molecular processes used by *P. brasiliense* for attacking phytopathogenic microorganisms. These data would provide basic physiological and ecological knowledge, increasing at same time the probabilities of generating biocontrol products for successful performance in the field.

Acknowledgments

Thanks are given to CONACYT for the graduate scholarship granted to MAS (No. 226634). This project received support from the CIC-UMSNH within the 2018 research program.

Literature Cited

- Verkley GJM, Da Silva M, Wicklow DT, Crous PW. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Stud Mycol.* 2004;50:323–335.
- Damm U, Verkley GJM, Crous PW, Fourie PH, Haegi A, Riccioni L. Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. *Persoonia.* 2008;20:9–17.
- Zheng YK, Qiao XG, Miao CP, Liu K, Chen YW, Xu LH, Zhao LX. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Ann Microbiol.* 2016;66:529–542.
- Cloete M, Fourie PH, Damm U, Crous PW, Mostert L. Fungi associated with die-back symptoms of apple and pear trees, a possible inoculum source of grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathol Mediterr.* 2011;50:176–190.
- Mohamed IE, Kehraus S, Krick A, König GM, Kelter G, Maier A, Fiebig HH, Kalesse M, Malek NP, Gross H. Mode of action of epoxyphenolins A and B and characterization of related metabolites from the marine-derived fungus *Paraconiothyrium* sp. *J Nat Prod.* 2010;73:2053–2056.
- Whippis JM, Gerlagh M. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycol Res.* 1992;96:897–907.
- Liu CX, Wang L, Chen JF, Guo ZY, Tu X, Deng ZS, Zou K. Paraconifuranones A-H, eight new furanone analogs from the insect-associated fungus *Paraconiothyrium brasiliense* MZ-1. *Magn Reson Chem.* 2015;53:317–322.
- Colombier MA, Alanio A, Denis B, Melica G, Garcia-Hermoso D, Levy B, Peraldi MN, Glotz D, Bretagne S, Gallien S. Dual invasive infection with *Phaeoacremonium parasiticum* and *Paraconiothyrium cyclothyrioides* in a renal transplant recipient: case report and comprehensive review of the literature of *Phaeoacremonium phaeoophycomycosis*. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2084–2094.
- Zhou Y, Zhang Y, Li J, Meng X, Zhao J, He W, Zhou L. Antibacterial and antioxidant activities of the endophytic fungi from medicinal herb *Trillium tschonoskii*. *Afr J Microbiol Res.* 2011;5:4917–4921.
- De Carvalho PLN, Amaral PO, Ruiz ALTG, de Alencar SM, Pfenning LH, de Carvalho JE, Rosalen PL, Ikegaki M. *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1: antioxidant and antiproliferative activities of endophytic fungus associated with *Rheedia brasiliensis* plant. *Int J Biotech Well Indus.* 2012;1:172–176.
- Almeida C, El Aouad N, Martín J, Pérez-Victoria I, González-Menéndez V, Platas G, de la Cruz M, Monteiro MC, de Pedro N, Bills GF, Vicente F, Genilloud O, Reyes F, Graminin B, a furanone from the fungus *Paraconiothyrium* sp. *J Antibiot.* 2014;67:421–423.
- Shiono Y, Kikuchi M, Koseki T, Murayama T, Kwon E, Aburai N, Kimura K. Isopimarane diterpene glycosides, isolated from endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. MY-42. *Phytochemistry.* 2011;72:1400–1405.
- Chen S, Zhang Y, Zhao C, Ren F, Liu X, Che Y. Hawaiiinolides E-G, cytotoxic cassane and cleistanthane diterpenoids from the entomogenous fungus *Paraconiothyrium hawaiiense*. *Fitoterapia.* 2014;99:236–242.
- Guo Z, Ren F, Che Y, Liu G, Liu L. New Bergamotane sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. *Molecules.* 2015;20:14611–14620.
- Liu L, Chen X, Li D, Zhang Y, Li L, Guo L, Cao Y, Che Y. Bisabolane sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. *J Nat Prod.* 2015;78:746–753.
- Somjaipeeng S, Medina A, Kwaśna H, Ordaz Ortiz J, Magan N. Isolation, identification, and ecology of growth and taxol production by an endophytic strain of *Paraconiothyrium variabile* from English yew trees (*Taxus baccata*). *Fungal Biol.* 2015;119:1022–1031.
- Somjaipeeng S, Medina A, Magan N. Environmental stress and elicitors enhance taxol production by endophytic strains of *Paraconiothyrium variabile* and *Epicoccum nigrum*. *Enzyme Microb Technol.* 2016;90:69–75.
- Liu C, Liu T, Yuan F, Gu Y. Isolating endophytic fungi from evergreen plants and determining their antifungal activities. *Afr J Microbiol Res.* 2010;4:2243–2248.
- Combés A, Ndoye I, Bance C, Bruzaud J, Djediat C, Dupont J, Nay B, Prado S. Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variabile* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. *PLoS One.* 2012;7:e47313. doi:10.1371/journal.pone.0047313.
- Forootanfar H, Faramarzi MA, Shahverdi AR, Yazdi MT. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Bioresour Technol.* 2011;102:1808–1814.
- Forootanfar H, Movahednia MM, Yaghmaei S, Tabatabaei-Sameni M, Rastegar H, Sadighi A, Faramarzi MA. Removal of chlorophenolic derivatives by soil isolated ascomycete of *Paraconiothyrium variabile* and studying the role of its extracellular laccase. *J Hazard Mater.* 2012;209/210:199–203.
- Aghaie-Khouzani M, Forootanfar H, Moshfegh M, Khoshayand MR, Faramarzi MA. Decolorization of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Biochem Eng J.* 2012;60:9–15.
- Ashrafi SD, Rezaei S, Forootanfar H, Mahvi AH, Faramarzi MA. The enzymatic decolorization and detoxification of synthetic dyes by the laccase from a soil-isolated ascomycete, *Paraconiothyrium variabile*. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2013;85:173–181.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, California: Academic Press; 1990:315–322.
- Liu K, Raghavan S, Nelesen S, Linder CR, Warnow T. Rapid and accurate large-scale coestimation of sequence alignments and phylogenetic trees. *Science.* 2009;324:1561–1564.
- Maddison WP, Maddison DR. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 3.10. Available at: <http://mesquiteproject.org>. 2016. Accessed February 5, 2017.
- Swofford DL. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA; 2003.
- Damián-Robles RM, Castro-Montoya AJ, Saucedo-Luna J, Vázquez-Garcidueñas MS, Arredondo-Santoyo M, Vázquez-Marrugo G. Characterization of ligninolytic enzyme production in white-rot wild fungal strains suitable for kraft pulp bleaching. *3 Biotech.* 2017;7:319.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.* 2012;61:539–542.
- Pawlik A, Janusz G, Dębska I, Siwulski M, Frąc M, Rogalski J. Genetic and metabolic intraspecific biodiversity of *Ganoderma lucidum*. *BioMed Res Int.* 2015;2015:1. doi:10.1155/2015/726149
- Svobodová K, Majcherczyk A, Novotný Č, Kües U. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the

- decolorization of synthetic dyes. *Bioresour Technol.* 2008;99:463–471.
32. Nagai M, Sato T, Watanabe H, Saito K, Kawata M, Enei H. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;60:327–335.
 33. Chérif M. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology.* 1990;80:1406.
 34. Worasatit N, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Rowland C. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of rhizoctonia root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycol Res.* 1994;98:1357–1363.
 35. Dennis C, Webster J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Trans Br Mycol Soc.* 1971;57:25–39.
 36. Budziszewska J, Szypuła W, Wilk M, Wrzosek M. *Paraconiothyrium babiogorensis* sp. nov., a new endophyte from fir club moss *Huperzia selago* (*Huperziaceae*). *Mycotaxon.* 2011;115:457–468.
 37. Pinzari F, Ceci A, Abu-Samra N, Canfora L, Maggi O, Persiani A. Phenotype MicroArray™ system in the study of fungal functional diversity and catabolic versatility. *Res Microbiol.* 2016;167:710–722.
 38. Macheleidt J, Mattern DJ, Fischer J, Netzker T, Weber J, Schroeckh V, Valiante V, Brakhage AA. Regulation and role of fungal secondary metabolites. *Annu Rev Genet.* 2016;50:371–392.
 39. Seiboth B, Pakdaman BS, Hartl L, Kubicek CP. Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. *Fungal Biol Rev.* 2007;21:42–48.
 40. Hamilton LM, Kelly CT, Fogarty WM. Review: cyclodextrins and their interaction with amylolytic enzymes. *Enzyme Microb Technol* 2000;26:561–567.
 41. Janeček Š, Svensson B, MacGregor EA. Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals. *Enzyme Microb Technol.* 2011;49:429–440.
 42. Buerth C, Kovacic F, Stock J, Terfrüchte M, Wilhelm S, Jaeger KE, Feldbrügge M, Schipper K, Ernst JF, Tielker D. Uml2 is a novel CalB-type lipase of *Ustilago maydis* with phospholipase A activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98:4963–4973.
 43. Sharma KK, Kapoor M, Kuhad RC. *In vivo* enzymatic digestion, *in vitro* xylanase digestion, metabolic analogues, surfactants and polyethylene glycol ameliorate laccase production from *Ganoderma* sp. kk-02. *Leti Appl Microbiol.* 2005;41:24–31.
 44. Dekker RF, Barbosa AM, Giese EC, Godoy SD, Covizzi LG. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *Int Microbiol.* 2007;10:177–185.
 45. Kristanti RA, Hadibarata T. Biodegradation and identification of transformation products of fluorene by Ascomycete fungi. *Water Air Soil Pollut.* 2015;226:406. doi: 0.1007/s11270-015-2674-1.
 46. Levin L, Malignani E, Ramos AM. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresour Technol.* 2010;101:4554–4563.
 47. Kaushik P, Malik A. Fungal dye decolorization: recent advances and future potential. *Environ Int.* 2009;35:127–141.
 48. Srinivasan A, Viraraghavan T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. *J Environ Manage* 2010;91:1915–1929.
 49. Solís M, Solís A, Pérez HI, Manjarrez N, Flores M. Microbial decoloration of azo dyes: a review. *Process Biochem.* 2012;47:1723–1748.
 50. Arantes V, Jellison J, Goodell B. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;94:323–338.
 51. Fomina M, Gadd GM. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresour Technol.* 2014;160:3–14.
 52. Klis FM, Ram AFJ, De Groot PWJ. *A Molecular and Genomic View of the Fungal Cell Wall: Biology of the Fungal Cell.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007:97–120.
 53. Bajpai P. *Bleach Plant Effluents from the Pulp and Paper Industry.* Heidelberg: Springer International Publishing; 2013.
 54. Junghanns C, Moeder M, Krauss G, Martin C, Schlosser D. Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology.* 2005;151:45–57.
 55. Podieablonskaia EV, Kolomytseva MP, Myasoedova NM, Baskunov BP, Chernykh AM, Classen T, Pietruszka J, Golovleva LA. *Myrothecium verrucaria* F-3851, a producer of laccases transforming phenolic compounds at neutral and alkaline conditions. *Microbiology.* 2017;86:370–376.
 56. Kluczek-Turpeinen B, Steffen KT, Tuomela M, Hatakka A, Hofrichter M. Modification of humic acids by the compost-dwelling deuteromycete *Paecilomyces inflatus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;66:443–449.
 57. Kellner H, Luis P, Buscot F. Diversity of laccase-like multicopper oxidase genes in Morchellaceae: identification of genes potentially involved in extracellular activities related to plant litter decay. *FEMS Microbiol Ecol.* 2007;61:153–163.
 58. Fillat U, Martín-Sampedro R, Macaya-Sanz D, Martín JA, Ibarra D, Martínez MJ, Eugenio ME. Screening of eucalyptus wood endophytes for laccase activity. *Process Biochem.* 2016;51:589–598.
 59. Daâssi D, Zouari-Mechichi H, Belbahri L, Barriuso J, Martínez MJ, Nasri M, Mechichi T. Phylogenetic and metabolic diversity of Tunisian forest wood-degrading fungi: a wealth of novelties and opportunities for biotechnology. *3 Biotech.* 2016;6:46. doi: 10.1007/s13205-015-0356-8.
 60. Liers C, Ullrich R, Pecyna M, Schlosser D, Hofrichter M. Production, purification and partial enzymatic and molecular characterization of a laccase from the wood-rotting ascomycete *Xylaria polymorpha*. *Enzyme Microb Technol.* 2007;41:785–793.
 61. Lopez MJ, Vargas-García MC, Suárez-Estrella F, Nichols NN, Dien BS, Moreno J. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme Microb Technol.* 2007;40:794–800.
 62. Gao H, Wang Y, Zhang W, Wang W, Mu Z. Isolation, identification and application in lignin degradation of an ascomycete GHJ-4. *Afr J Biotechnol.* 2011;10:4166–4174.
 63. Paul NC, Kim WK, Woo SK, Park MS, Yu SH. Fungal endophytes in roots of *Aralia* species and their antifungal activity. *Plant Pathol J.* 2007;23:287–294.
 64. Nicoletti R, De Filippis A, Buommino E. Antagonistic aptitude and antiproliferative properties on tumor cells of fungal endophytes from the Astroni Nature Reserve, Italy. *Afr J Microbiol Res.* 2013;7:4073–4083.
 65. Dwivedi UN, Singh P, Pandey VP, Kumar A. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J Mol Catal B Enzym.* 2011;68:117–128.
 66. Kwiatos N, Rynajllo M, Bielecki S. Diversity of laccase-coding genes in *Fusarium oxysporum* genomes. *Front Microbiol.* 2015;6:933. doi: 10.3389/fmicb.2015.00933.
 67. Ferreira-Moreno L, Feng P, Weiss VA, Vicente VA, Stielow JB, de Hoog S. Phylogenomic analyses reveal the diversity of laccase-coding genes in *Fonsecaea* genomes. *PLoS One.* 2017;12:e0171291. doi:10.1371/journal.pone.0171291.
 68. Otero-Colina G, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía S, Maymon M, Ploetz RC, Aoki T, O'Donnell K, Freeman S. Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. *Phytopathology.* 2010;100:1176–1184.
 69. Han M, Liu T, Cai X, Chen K, Liu C, Brian K, Xue Y, Gu Y. A new endophytic *Paraconiothyrium brasiliense* LT161 shows potential in producing antifungal metabolites against phytopathogens. *Afr J Microbiol Res.* 2012;6:7572–7578.

Manuscript received July 18, 2017, and revision received Apr. 21, 2018.

VI.2 CAPÍTULO II.

“Análisis experimental y bioinformático del complejo de enzimas ligninolíticas en *Didymosphaeria* sp.”

**Análisis experimental y bioinformático del complejo de enzimas ligninolíticas
en *Didymosphaeria* sp.**

Marina Arredondo-Santoyo¹, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas², Gerardo Vázquez-Marrufo¹

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Col. La Palma, Tarímbaro, Michoacán CP 58262

²División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Ave. Rafael Carrillo esq. Dr. Salvador González Herrejón, Col. Cuauhtémoc, Morelia, Michoacán CP 58020

***Autor para correspondencia:**

Dr. Gerardo Vázquez-Marrufo
Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro
Col. La Palma
Tarímbaro, Michoacán CP 58262
Tel/Fax: +52 01 443 2 95 80 29
E-mail: gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx

RESUMEN

Los hongos depolimerizan la lignina produciendo enzimas oxidativas extracelulares que incluyen a la lacasa (LAC), la manganeso peroxidasa (MnP) y la lignin peroxidasa (LiP). La producción de las tres enzimas ha sido reportada en ascomicetes. Se analizó la capacidad de la cepa CMU-196 del hongo ascomicete *Didymosphaeria* sp. (sin.=*Paraconiothyrium brasiliense*) para producir MnP y LiP extracelular y se intentó secuenciar los genes codificantes de dichas actividades enzimáticas y la lacasa extracelular (LAC). La máxima actividad de LiP fue de 25.66 U/mL en medio caldo de papa (PDB), después de seis días de incubación. La adición de Cu_2SO_4 150 μM (18.17 U/mL), extracto acuoso de rastrojo de maíz al 10% v/v (10.34 U/mL) o rastrojo de maíz molido al 2% p/v (9.96 U/mL), disminuye dicha actividad significativamente. La máxima actividad extracelular de MnP se registró al adicionar rastrojo de maíz molido al medio PDB, obteniéndose un valor de 83.72 U/mL hacia el quinto día de incubación. La adición de Cu_2SO_4 (48.13 U/mL) y extracto de rastrojo (41.47 U/mL) genera valores de actividad significativamente superiores al del control en medio PDB (9.51 U/mL). Empleando los pares de iniciadores Cu1AF/Cu3R, LipF/LipR y MnpF/MnpR para amplificar los genes de LAC, LiP y MnP, respectivamente, se obtuvo un único producto de amplificación del tamaño esperado en cada caso. No obstante, no fue posible determinar la presencia de genes de LiP o MnP a partir de los productos de amplificación obtenidos. Por otro lado, se obtuvo una secuencia de 1868 pb de la de un gen de lacasa de la cepa CMU-196. La comparación Blast-n mostró identidad del 98% con el gen *lac* de *D. variabile* ambos genes tienen una región codificante de 1716 pb comparándose con la lacasa de *P. sporulosum* la cual es de 1755 pb. La traducción *in silico* generó secuencias de 571 aa en ambas especies con un peso molecular estimado de 62.84 (*D. variabile*) y 62.88 kDa (CMU-196). Se determinó la presencia del péptido señal de 18 aminoácidos, seis sitios posibles de N-glicosilación para las lacasas de *Didymosphaeria* sp. y *D. variabile* y de 17 para *P. sporulosum* así como un *pl* de 4.2 para las tres lacasas. Un alineamiento múltiple que incluyó secuencias de lacasas cristalizadas en

ascomicetes permitió identificar las cuatro secuencias consenso L1 a L4 y la puerta SDS en el extremo C-terminal, por lo que las tres proteínas representan lacasas *sensu stricto*. Las relaciones filogenéticas de las lacasas de las especies analizadas muestran cercanía con enzimas de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma* spp.

Palabras clave: *Didymosphaeria* sp., enzimas ligninolíticas, rastrojo de maíz, análisis bioinformático, filogenia

Introducción

La degradación de lignina de la pared celular vegetal es un proceso complejo en el que se ha involucrado a distintas oxidadas y peroxidasas extracelulares (Janusz et al., 2017). El proceso de delignificación de biomasa vegetal y las actividades enzimáticas involucradas ha sido estudiado principalmente en el grupo de basidiomicetes de pudrición blanca. Entre las principales enzimas asociadas a la degradación de lignina se encuentran la lacasa (LAC), la lignin peroxidasa (LiP), la manganeso peroxidasa (MnP) y, más recientemente, a la peroxidasa versátil (PV) (Janusz et al., 2017). La PV se describió inicialmente en *Pleurotus ostreatus* (Camarero et al., 1999) y su presencia a la fecha está limitada a pocas especies de basidiomicetes (Hammel y Cullen, 2008; Manavalan et al., 2015).

Debido a que distintos grupos taxonómicos dentro de los ascomicetes han sido asociados a la delignificación de biomasa vegetal (Bucher et al., 2004; Shary et al., 2007; Simonis et al., 2008), diversos estudios han evaluado la actividad de las principales enzimas ligninolíticas en dicho grupo taxonómico, incluidas las actividades de LAC, MnP y LiP. Dentro de ascomicetes, se ha documentado la actividad extracelular de LiP en *Chrysonilia sitophila* (teleomorfo=*Neurospora sitophila*), en el que se encontraron tres isoenzimas (Ferrer et al., 1992), así como en cultivos líquidos y en fermentación en sustrato sólido en *Coniochaeta ligniaria* y otras especies de ascomicetes relacionadas (Lopez et al., 2007). La actividad de MnP ha sido reportada en un mayor número de especies de ascomicetes,

incluyendo *Sordaria fimicola*, *Halosarpheia ratnagiriensis* (Raghukumar, 2000) y *C. ligniaria* (Lopez et al., 2007), así como las levaduras *Debaryomyces polymorphus* y *Candida tropicalis* (Yang et al., 2003). La actividad extracelular de MnP y LiP ha sido reportada en *Paraconiothyrium variable* (Gao et al., 2011). Estudios recientes han expandido considerablemente la lista de especies de hongos ascomicetes que presentan actividad extracelular de LiP y MnP. Así, Aranda et al. (2017) reportaron la actividad de MnP en *Aspergillus flavus*, *Penicillium oxalicum*, *Fusarium equiseti*, *Cladophora luteo-olivacea*, *Cladosporium macrocarpum*, *Davidiella tassiana*, *Lecythophora hoffmannii* y *Pseudallescheria boydii*, además de dos cepas de ascomicetes no identificadas a nivel de especie. Por su parte, Kornilłowicz-Kowalska y Rybczyn´ska (2015) reportan ambas actividades en *Haematonectria haematococca* (= *Fusarium solani*), *Clonostachrys rosea* f. *catenulata* (= *Gliocladium catenulatum*), *Phaeostalagmus cyclosporus*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., entre otras.

Nosotros hemos evaluado la producción de LAC extracelular en la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. (sin.=*Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*) (Arredondo-Santoyo et al., 2018). Debido a que se ha documentado la actividad de MnP y LiP en *P. variable* (Gao et al., 2011), es interesante identificar la producción de dichas enzimas en taxa estrechamente relacionados como lo es el género *Didymosphaeria*. El interés del presente trabajo fue evaluar si la cepa CMU-196 presenta actividad de MnP y LiP en cultivos basales e inducidos. Además para complementar nuestro estudio anterior (Arredondo-Santoyo et al., 2018), se buscó caracterizar los genes de LAC, MnP y LiP, y realizar in análisis bioinformático de las posibles proteínas codificadas.

Materiales y métodos

Cepa de estudio

Se empleó la cepa CMU-196 inicialmente descrita como *Paraconiothyrium brasiliense* (Arredondo-Santoyo et al., 2018), que debe ser considerada como *Didymosphaeria* sp. (Ariyawansa et al., 2014), depositada en el Cepario

Michoacano Universitario (CMU) del Laboratorio de Biotecnología y Conservación de Microorganismos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Arredondo-Santoyo *et al.*, 2018).

Medios de cultivo y obtención de inóculos

El medio Agar Papa y Dextrosa (PDA, Difco™ BD, Diagnostics) se empleó para el cultivo y mantenimiento del micelio vegetativo y la obtención de inóculos. Los inóculos se obtuvieron del borde de la colonia en la fase logarítmica de crecimiento con un sacabocados de 6 mm de diámetro a partir de colonias creciendo en medio PDA a 24 °C. El medio caldo de papa (PDB, Difco™, BD Diagnostics) se utilizó para elaborar las cinéticas de crecimiento en medio líquido y determinar las actividades enzimáticas extracelulares de lignin peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP). Los medios se esterilizaron en autoclave a 15 lb/in² durante 15 min.

Cultivos en medio líquido

Los cultivos en medio líquido se emplearon para determinar el crecimiento de la cepa y evaluar el nivel de actividad enzimática de LiP y MnP, tanto basal como inducida. Para la actividad basal, matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio PDB se inocularon con 6 inóculos cilíndricos de 6 mm de diámetro obtenidos de la manera previamente descrita. El medio así inoculado se incubó a 24 °C agitando a 120 rpm. Se analizó la inducción de la actividades enzimáticas de LiP y MnP suplementando el medio PDB basal de manera independiente con 150 µM de CuSO₄, rastrojo de maíz molido (2% p/v) y extracto acuoso del mismo (10% v/v). El rastrojo de maíz molido (RM) se obtuvo de un proveedor local, fragmentándose en un pulverizador a 300 rpm durante 2 min, para homogenizar el tamaño de partícula la muestra fue tamizada en una malla con tamaño de poro de ≤1 mm. El extracto de rastrojo (ER) se obtuvo hirviendo 200 g de la biomasa vegetal en 100 mL de agua destilada durante 1 h, reemplazando continuamente el agua evaporada para mantener el volumen inicial de líquido. El extracto líquido

obtenido se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pasó a través de una gasa para eliminar los residuos sólidos de rastrojo, esterilizándose finalmente en autoclave a 15 lb/in² durante 15 min.

Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento se elaboró midiendo la tasa de crecimiento (mg/día) cada 24 h por un periodo de nueve días en las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas. El micelio se cosechó filtrando el contenido de cada matraz a través de un papel filtro grado 41 (Whatman, UK) puesto a peso constante. La biomasa obtenida se lavó con agua destilada, el papel filtro con el micelio se secó a 60 °C por 24 h, se colocó en un desecador y se pesó. El peso seco del micelio se determinó por la diferencia de peso al restar el peso del papel.

Determinación de la actividades extracelulares de lignin peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP)

Durante nueve días se tomaron alícuotas de 1.5 mL cada 24 h del medio líquido extracelular de cada condición de cultivo y se centrifugó a 750 x g durante 5 min para eliminar restos de micelio. La actividad enzimática de LiP se determinó cuantificando la oxidación de alcohol veratrílico a veratraldehído de acuerdo a Tien y Kirk 1988, con 80 µL de H₂O₂ 5 mM como iniciador y 500 µL de la fase cuosa del medio de cultivo. La actividad de la enzima MnP se determinó cuantificando la formación del complejo de tartrato de manganeso en presencia de 2,6-dimetoxifenol 10 mM según Wariishi *et al.* (1992), con 80 µL de H₂O₂ 5 mM como iniciador de la reacción enzimática y 500 µL del sobrenadante del medio de cultivo. La formación del radical catiónico se determinó midiendo el incremento en la absorbancia a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) para LiP y a 460 nm ($\epsilon_{460} = 27\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) para MnP. Los valores de actividad fueron expresados en unidades de actividad enzimática (U) la cual expresa la cantidad de sustrato convertido por unidad de tiempo, tomando en cuenta el volumen de reacción.

Extracción de ADN, ensayos de PCR y secuenciación

El ADN genómico de la cepa CMU-196 se obtuvo a partir del micelio en crecimiento activo en medio PDA empleando el método descrito por Arredondo-Santoyo *et al.* (2018). Se amplificaron mediante PCR fragmentos de los genes que codifican para LAC, LiP y MnP empleando los iniciadores Cu1AF/Cu3R (Kellner *et al.*, 2007), LipF/LipR (Reddy y D'Souza, 1998) y MnpF/MnpR (Bogan *et al.*, 1996), respectivamente. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se desarrolló con un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, alineamiento a 55 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 2 min, al término de los ciclos se aplicó una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de amplificación obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 2% (p/v) teñidos con SYBER Green (Invitrogen, USA). Los productos de amplificación Cu1AF/Cu3R de 1200pb, LipF/LipR de 850pb y MnpF/MnpR de 650pb fueron purificados y secuenciados por Elim Biopharm (Hayward CA, USA).

*Obtención de la secuencia del gen de lacasa de *Didymosphaeria* sp.*

El gen completo de *Didymosphaeria* sp. (sin.=*P. brasiliense sensu lato*) se obtuvo realizando varios pasos de amplificación mediante PCR, ensamblando los fragmentos obtenidos en cada paso. En el primer paso, el ADN genómico de la cepa de estudio se utilizó como templado para la amplificación parcial del gen con los oligonucleótidos Cu1AF/Cu3R (D'Souza *et al.*, 1996). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µL. La concentración de la mezcla de reacción fue: 10 mM de Buffer Tris-HCl pH 8.0; 2.5 mM de MgCl₂; 0.2 mM de cada dNTP; 0.2 mM de oligonucleótido; 0.5 U de *Taq* DNA polimerasa recombinante (Invitrogen, USA); 25 ng/µL de ADN; el volumen final se ajustó con H₂O destilada desionizada. Las reacciones de PCR se realizaron mediante el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 7 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1 min 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 1.5% (p/v) y teñidos con SYBER safe (Invitrogen, USA).

El producto de amplificación se clonó en el vector 4.0 TOPO® TA utilizando el kit TOPO® TA Cloning® (Invitrogen™, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. El producto obtenido fue secuenciado por Elim Biopharm (Hayward CA, USA), obteniéndose un fragmento inicial de 876 pb que sirvió para diseñar pares de oligos usando el paquete OligoZnalyzer 3.1 del servidor en línea Integrad DNA technologies (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), con el objetivo de amplificar los extremos 5' y 3' faltantes para obtener la secuencia completa del gen (Figura 1), la secuencia de los oligos diseñados se muestra en la Tabla 1. Los fragmentos restantes fueron amplificados, clonados y secuenciados de la manera anteriormente descrita, la estructura completa del gen se ensambló realizando manualmente corroborando posiciones mediante alineamientos generados en Clustal X V2.0.11.

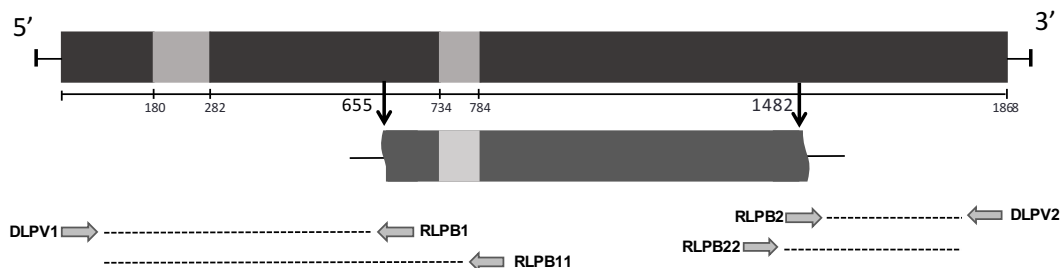


Figura 1. Diseño de oligos para la amplificación completa del gen *lac* de *Didymosphaeria* sp.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *lac*

Fragmento	Oligo	Secuencia	Temperatura de alineamiento	Tamaño del fragmento (pb)
5' →	DLPV1	ATG CGT TCT GGC TTT TTC TTC GG	58 °C	729
	RLPB1	CCG TTG ATG ATG ATT CCT CCA AAG AT		
	RLPB11	GGA TTC AGC GGT AAT GTA GAG TTC G		
← 3'	RLPV2	TTA TAC ACC AGA ATC CTC CTG CTC	57 °C	606
	DLPB2	TAC CTC AAC AGC ACG ACC AT		
	DLPB22	AAC ATC GTG CCC TAC CTC TCC		

Análisis de las secuencias de nucleótidos

Se recuperó la secuencia de nucleótidos del gen de lacasa extracelular de *D. variable* (*sin=P. variable*) depositada en GenBank con número de acceso

JF828580, así como la lacasa de *P. sporulosom* a partir del genoma depositado en JGI fungal genomics resource MycoCosm con código de acceso Parsp1 (Zeiner et al., 2016). Las secuencias de nucleótidos obtenidas de las amplificaciones y ensamblajes de la estructura genética de la cepa CMU-196 así como de las obtenidas de bases de datos de las otras dos especies fueron sometidas a un análisis comparativo para la identificación y diferenciación de intrones y exones en cada uno de los genes de lacasa de las tres especies.

Análisis bioinformático

Con la secuencia completa de los genes *lac* de las tres especies de interés, se realizó la traducción *in silico* a secuencia de aminoácidos utilizando el programa Translate del servidor ExPASy (<http://web.expasy.org>). Posteriormente se analizaron las características estructurales en las secuencias de aa, empleando los programas en línea del mismo servidor; el programa SignalP versión 4.0 fue utilizado para determinar la presencia y posición del péptido señal de secreción, el programa NetNGlyc 1.0 se utilizó para determinar los sitios de N-glicosilación (Asn-XXX-Ser/Thr), y el pI/Mw Tool para determinar el punto isoeléctrico y el peso molecular estimado.

Con las secuencias putativas de aminoácidos obtenidas se generó un alineamiento múltiple empleando el software SATé (Liu et al., 2009) incluyendo en el análisis las secuencias de aminoácidos de lacasas cristalizadas de las especies *Aspergillus niger* (5lwx.1) *Melanocarpus albomyces* (4088173) y *Thielavia arenaria* (333361328) obtenidas de UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>). El alineamiento múltiple obtenido se editó empleando el paquete GENDOC para destacar los motivos y regiones relevantes de las proteínas putativas.

Reconstrucción filogenética

Se utilizó la base de datos de lacasas generada por Cázares-García et al. (2013), a la cual se añadieron las lacasas de *Didymosphaeria variable*, *Didymosphaeria* sp. (CMU-196) y *Paraconiothyrium sporulosum*. Se realizó el alineamiento de las

secuencias empleando el servidor MAFFT con los parámetros por default (Kato et al., 2017) y se optimizó utilizando GUIDANCE2 empleando 100 árboles alternativos (Sela et al., 2015). Se obtuvo un GUIDANCE2 alignment score de 0.855406, optimizado removiendo columnas debajo de 0.93 de confianza. El alineamiento obtenido se utilizó para obtener modelo evolutivo empleando el software ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Los árboles filogenéticos se generaron empleando el modelo WAG+F+R6 para calcular las distancias genéticas. El árbol generado mediante el criterio de ML se construyó empleando el paquete IQ-TREE (Nguyen et al., 2015; Trifinopoulos et al., 2016) obteniendo los valores de SH-aLRT support (%)/ aBayes support/ultrafast bootstrap (UFBoot) support para cada bifurcación (Hoang et al., 2018), después de 1000 iteraciones. La edición del árbol filogenético obtenido se realizó empleando el software MrEnt (Zuccon y Zuccon, 2014).

Resultados

Actividades extracelulares de LiP y MnP

Los resultados de actividad extracelular de LiP y MnP basales e inducidas así como las cinéticas de crecimiento se esquematizan en la figura 1. En relación con la actividad extracelular de LiP (Fig. 2, panel A) se observa que no presentó inducción en los medios suplementados con Cu^{+2} o rastrojo, presentándose la máxima actividad de 25.66 U/ml en condiciones basales hacia el día 6 de incubación. Los medios suplementados con CuSO_4 , extracto de rastrojo y rastrojo molido, presentaron actividades máximas de 18.17 U/mL (día 9), 10.34 U/mL (día 7) y 9.96 U/mL (día 8), respectivamente. La actividad extracelular de MnP se encuentra esquematizada en el panel B de la figura 2, en el cual se puede observar que los tres inductores empleados incrementan los valores de actividad con respecto a la basal, alcanzando un valor máximo de 9.51 U/mL el día 9, los valores máximos de actividad obtenidos con rastrojo molido, CuSO_4 y extracto de rastrojo fueron de 83.72 U/mL (día 5), 48.13 U/mL (día 9) y 41.47 U/mL (día 9), respectivamente.

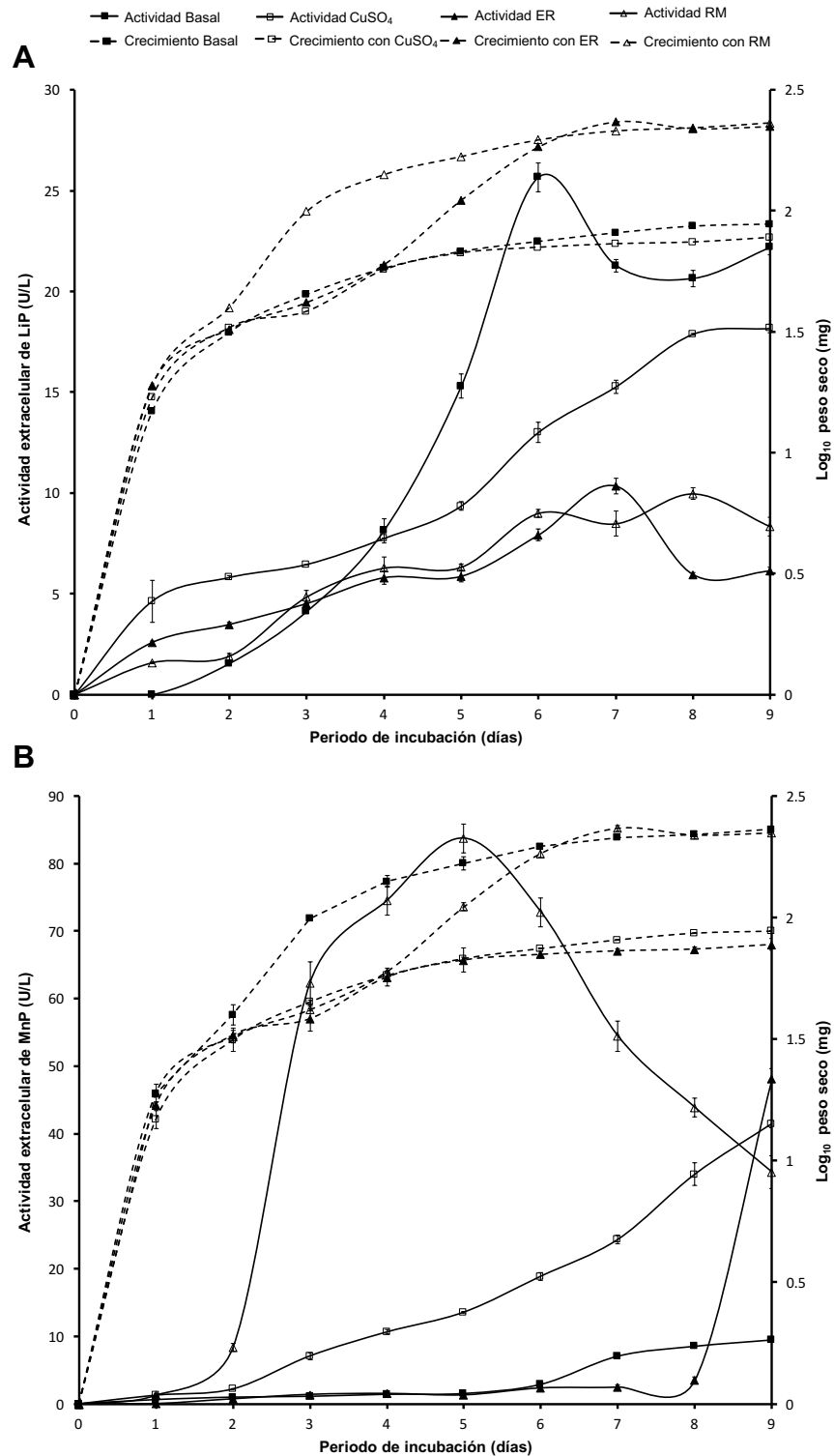


Figura 2. Cinéticas de crecimiento y actividades extracelulares de LiP y MnP de *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense sensu lato*) basales e inducidas. Panel A; actividad de LiP, panel B; actividad de MnP. Clave: ER; extracto de rastrojo, RM; rastrojo molido.

Con respecto a los ensayos de PCR, se obtuvieron bandas de amplificación de tamaño esperado para el fragmento de los genes LAC (aprox. 1200pb), LiP (aprox. 850 pb) y de MnP (aprox. 650 pb) lo cual sugiere la presencia de por lo menos un gen para cada una de las enzimas estudiadas (Fig. 3). Los productos secuenciados para LiP y MnP no mostraron identidad con ninguno de los genes esperados, intentos posteriores de amplificación y purificación no permitieron la obtención de secuencias de los genes de interés (datos no mostrados).

Con el producto de amplificación LAC se obtuvo un fragmento de 876 pb del gen. La secuencia obtenida fue analizada en la base de datos de NCBI GenBank mediante el algoritmo BLASTn, mostrando una identidad del 98% con respecto al gen *lac* de la cepa GHJ-4 de *P. variable* (JF82858) de 1868 pb, la cual sirvió como templado para diseñar oligos y determinar la secuencia completa del gen (los resultados se tallan en los apartados posteriores).

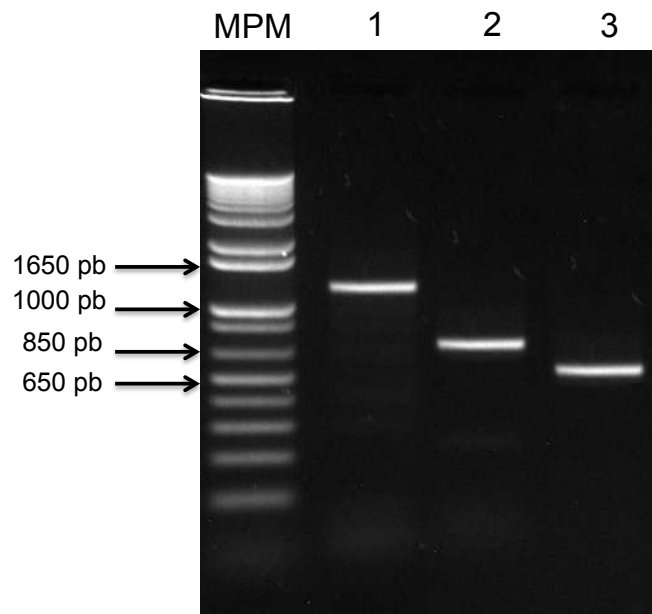


Figura 3. Patrones de amplificación mediante PCR. Carril 1; producto de amplificación de LAC (Cu1AF/Cu3R), carril 2; producto de amplificación de LiP (LiPF/LiPR), carril 2; producto de amplificación de MnP (MnPF/MnPR). Gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con SYBR® Safe. MPM; marcador de peso molecular, 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen, USA).

Construcción de secuencia del GEN lac

Se construyó la secuencia completa de 1868 pb del gen de lacasa de *P. brasiliense* la cual presenta una identidad del 98% (1839/1868) con respecto al gen *lac* de la cepa GHJ-4 de *P. variable*. En la figura 4 se esquematizan las estructuras del gen *lac* de las 3 especies; tanto para las especies *Didymosphaeria* (sin.=*P. brasiliense sensu lato*) (Fig. 4, panel A) y *Didymosphaeria variable* (Fig. 4, panel B) los genes tienen una amplitud de 1868 pb, una región codificante de 1716 pb, un intrón de 102 pb en la posición 180 y otro de 50 pb en la posición 734, sin embargo para la especie de *P. sporulosum* (Fig. 4, panel C) la amplitud es de 1941 pb con una región codificante de 1755 pb y aunque también cuenta con dos intrones estos tienen amplitud de 134 pb y 52 pb en las posiciones 229 y 815.

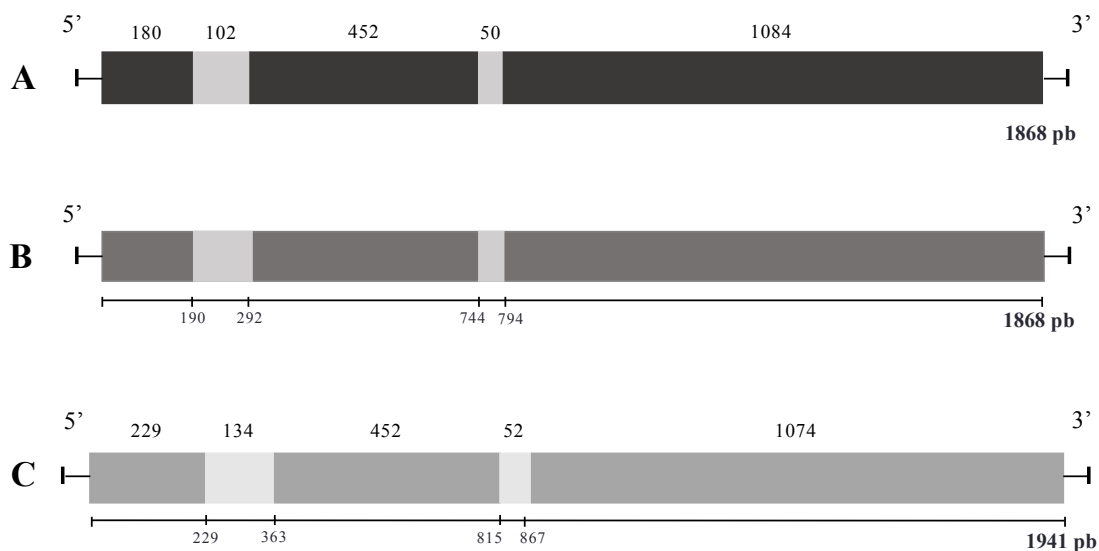


Figura 4. Estructura del gen *lac* de *Didymosphaeria* spp. y *Paraconiothyrium sporulosum*. Panel A; estructura del gen *lac* de la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. (sin.=*P. brasiliense sensu lato*), panel B; estructura del gen *lac* de *D. variable*, panel C; estructura del gen *lac* de *P. sporulosum*.

Características estructurales de lacasas

Una vez realizada la traducción *in silico* se obtuvieron secuencias de 571 amino ácidos para las lacasas de *Didymosphaeria* sp. y *D. variable* y de 584 para *P. sporulosum*, estimándose un peso molecular de 62.84 kDa, 62.88 kDa y 63.73 kDa

respectivamente (Tabla 2). La lacasa de *Didymosphaeria* sp. y *D. variable* presenta un péptido señal de secreción de 18 aminoácidos y seis sitios potenciales de N-glicosilación en las posiciones 96, 125, 137, 237, 278 y 406, mientras que para *P. sporulosum* el péptido señal es de 17 aminoácidos y aunque también presenta seis sitios potenciales de N-glicosilación estos se encuentran en las posiciones 109, 138, 150, 250, 263 y 291, estimándose un pI 4.2 para las tres lacasas analizadas.

Tabla 2. Características estructurales de las lacasas de *Didymosphaeria* spp. *Paraconiothyrium sporulosum*.

Cepa	<i>Didymosphaeria</i> sp.	<i>D. variable</i>	<i>P. sporulosum</i>
Longitud	571	571	584
Péptido señal^a	ASA-HP / 1-18	ASA-HP / 1-18	ASA-HP / 1-17
N- Glicosilación	N96, N125, N137, N237,	N96, N125, N137, N237,	N109, N138, N150, N250
Asn-X-Ser/Thr^a	N278, N406	N278, N406	N263, N291
MW (kDa)^b	62.88	62.84	63.73
pI^c	4.20	4.20	4.20

^aIndica la localización del péptido señal; ^bMW, masa molecular estimada; ^cpI, punto isoeléctrico predicho.

Motivos conservados en lacasas

En la figura 5, se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las lacasas de las cepas analizadas, así como de las enzimas de referencia. En general, puede apreciarse que las dos lacasas de estudio presentan todas las características estructurales de una lacasa extracelular. Se reconocen la presencia de las cuatro secuencias consenso L1-L4, que poseen una longitud de entre 8 y 24 aminoácidos y se distribuyen a lo largo de la cadena polipeptídica; se observa también la presencia de la puerta SDS y el extremo C-terminal, que son características distintivas en las lacasas de ascomicetes.

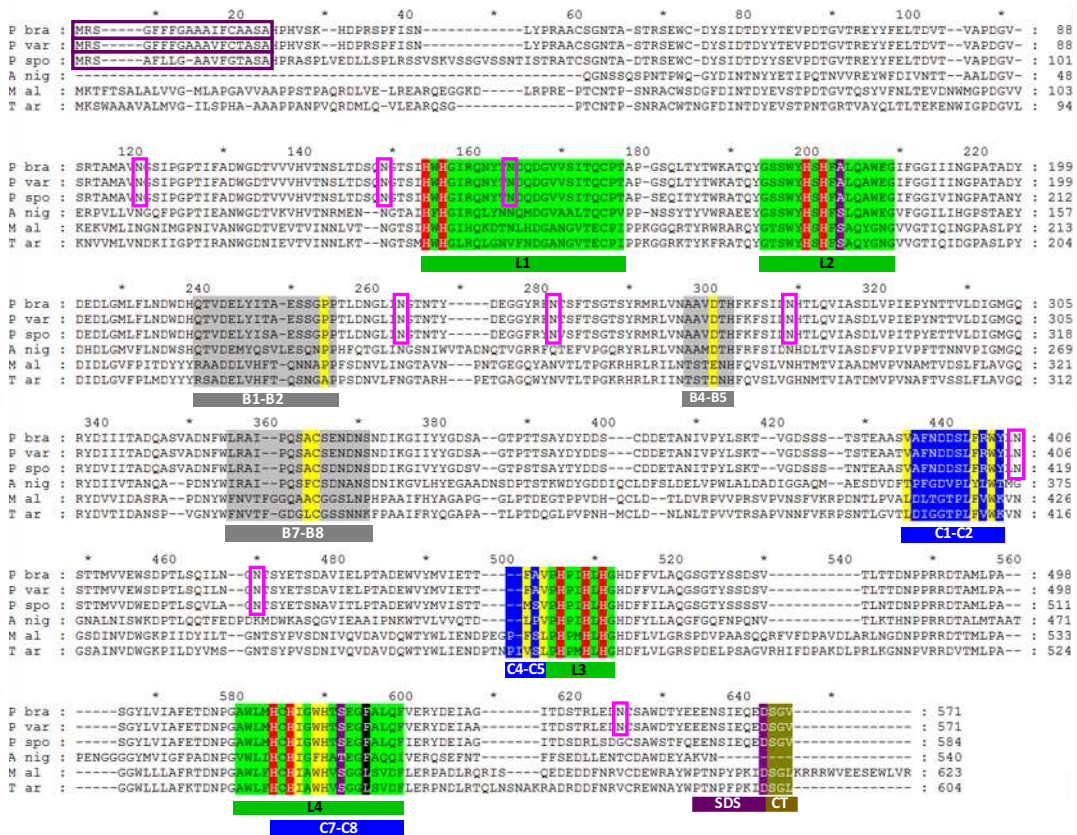


Figura 5. Alineamiento de secuencias de lacasas de *Didymosphaeria* spp. *Paraconiothyrium sporulosum*. Alineamiento construido con SATÉ. A la izquierda del alineamiento se indica el código asignado a cada una de las secuencias de lacasa: Pbra (*Didymosphaeria* (sin.=*P. brasiliense* sensu lato), Pvar (*P. variabile*), Pspo (*P. sporulosum*), Anig (*Aspergillus niger*), Mal (*Melanocarpus albonyces*), Tar (*Thielavia arenaria*). Los péptidos señal están delineados en cajas de color morado y los sitios de N-Glicosilación en rosa. Los residuos conservados implicados en el enlace de cobre están en rojo, y las regiones L1 – L4 completas se indican con una línea verde en la parte inferior. Los aminoácidos sombreadas en amarillo indican residuos en contacto con el sustrato. Los residuos que forman la puerta SDS están sombreados en color morado, y el aminoácido sombreado en negro clasifican las lacasas como clase 1 (Met), clase 2 (Leu) o 3 (Phe). El C-terminal conservado se indica en color café claro.

Filogenia

El análisis filogenético realizado muestra la separación en ramas terminales de lacasas de basidiomicetos y ascomicetos con un valor de UFBoot del 100%, dentro de las de ascomicetes las lacasas de las especies analizadas se agrupan en una sola rama terminal que se separa con un valor UFBoot de 100% mostrando relaciones filogenéticas con enzimas de especies de saprófitos y fitopatógenos (Figura 6). Las lacasas de *Didymosphaeria* spp. muestra una estrecha relación

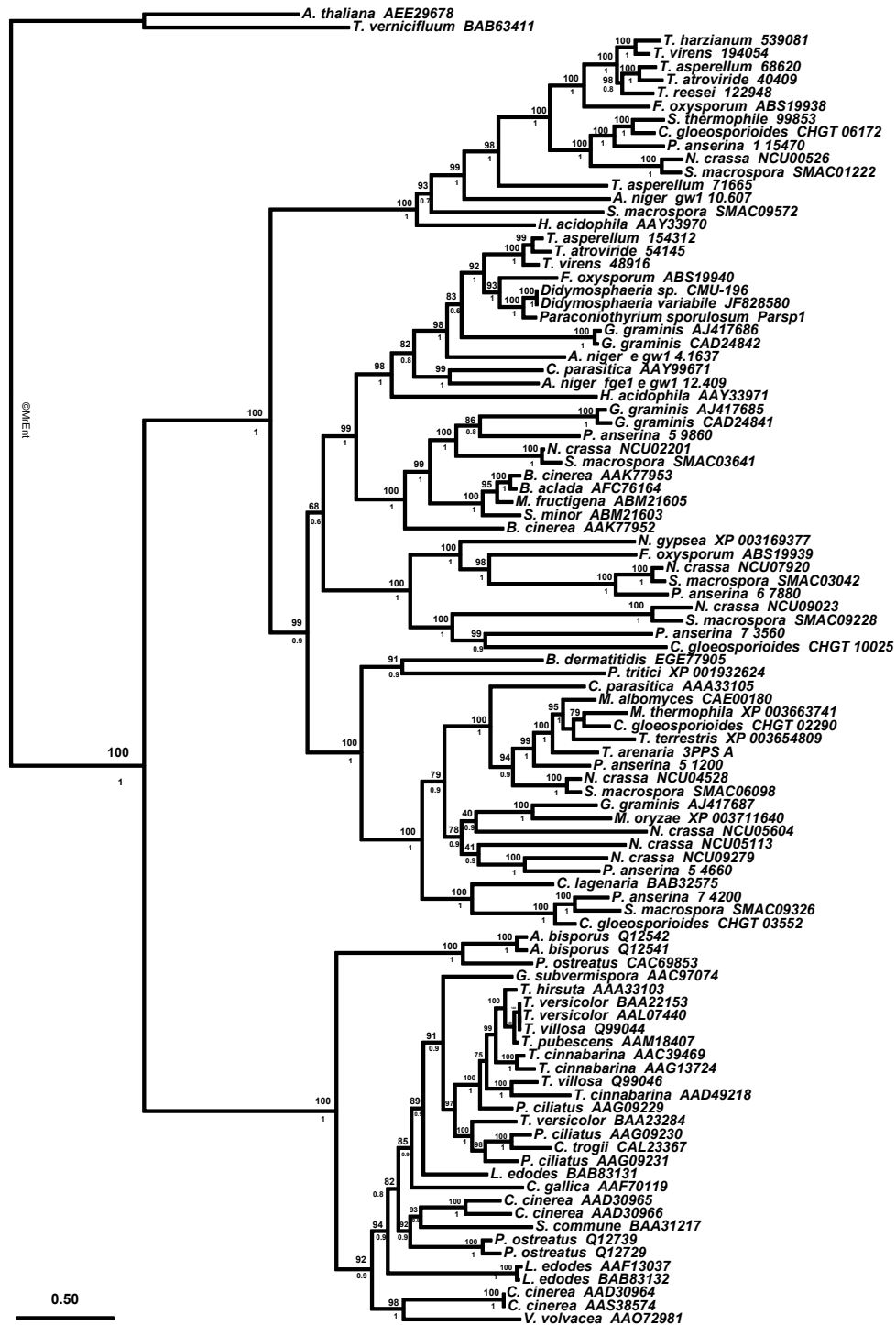


Figura 6. Análisis filogenético de lacasas *Didymosphaeria* spp. y *Paraconiothyrium sporulosum*. La reconstrucción filogenética se obtuvo mediante el criterio de Máxima Similitud (*Maximum Likelihood*, ML) empleando el servidor IQ-TREE, como se especifica en Materiales y Métodos. Encima y debajo de cada bifurcación se muestran los valores de UFBoot y aBayes obtenidos con 1000 iteraciones.

con las enzimas de *Paraconiothyium sporulosum* y del ascomicete fitopatógono *Fusarium oxysporum*, formando una rama terminal. La rama terminal que agrupa las lacasas de estas especies está asociada a una rama que incluye las enzimas de especies de *Trichoderma*. En general, se obtuvieron altos valores de soporte estadístico de las bifurcaciones internas y las ramas externas, tanto del parámetro UFBoot como el de aBayes (Figura 6).

Discusión

Previamente nosotros demostramos la actividad de lacasa extracelular en la cepa CMU-196 y su inducción con Cu^{+2} (Arredondo-Santoyo et al., 2018), y la discusión sobre los resultados de dicha actividad se realizó en dicho manuscrito. En el presente trabajo se determinó la actividad extracelular de MnP y LiP en la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp., tanto de manera basal como inducida con Cu^{+2} y rastrojo de maíz. Las actividades extracelulares de LiP y MnP detectadas en ascomicetes se han asociado a diversos procesos oxidativos y de degradación. En *C. sitophila* las actividades de las tres isoenzimas de LiP reportadas se han relacionado con la degradación de lignosulfonatos (Rodríguez et al., 1997). En el caso de *C. ligniaria* las actividades extracelulares de LiP y MnP se han asociado a la delignificación hasta del 40% de biomasa de planta de pimienta (López et al., 2007). En *P. oxalicum* la actividad de MnP se ha asociado parcialmente con la degradación de antraceno y otros compuestos policíclicos hidrocarbonados; sin embargo, los altos niveles de actividad enzimática de otras de las especies de ascomicetes analizadas no correlacionan con la degradación de dichas sustancias orgánicas (Aranda et al., 2017).

En este trabajo no fue posible obtener las secuencias de los genes de LiP y MnP de *Didymosphaeria* sp. a partir de los productos de amplificación obtenidos mediante PCR. El análisis del genoma de los ascomicetos *Aspergillus niger*, *Cryphonectria parasítica*, *Trichoderma reesei*, *Stagonospora nodorum* y la levadura *Pichia stipitis* reveló que salvó un gen en *C. parasítica* y cinco en *T. reesei*, el resto de especies no presentó la presencia genes de Peroxidasas clase

II (Floudas et al., 2012). Dentro del grupo de las peroxidasas tipo II se encuentran la LiP, la MnP y la peroxidasa versátil (VP), enzimas relacionadas con actividad ligninolítica, pero también se ha incluido a una “peroxidasa genérica”, que se describe como una enzima no ligninolítica con bajo potencial redox (Floudas et al., 2012). En el secretoma de *T. reesei* en presencia de fibra de celulosa, rastrojo de maíz y aserrín, se detectó la presencia de distintas oxidasas extracelulares e intracelulares relacionadas con la degradación de lignina y sus productos de digestión, pero no se encontró a ninguna LiP o MnP (Adav et al., 2012). Así, es probable que los cinco genes de peroxidasas encontrados en *T. reesei* y el único gen de *C. parasitica* no pertenezcan a LiP o MnP, directamente relacionadas con la degradación de lignina. Aún más, al analizar el secretoma de cepas de los ascomicetes *Alternaria alternata*, *Paraconiothyrium sporulosum*, *Stagonospora* sp. y *Pyrenochaeta* sp. se encontró al menos un ligninasa no identificada o una hemo peroxidasa en cada de las especies, sin embargo, no se encontró una LiP, MnP o peroxidasa versátil (VP) en ninguna de las cepas de estudio, aunque si se encontraron lacasas (Zeiner et al., 2016). En el presente trabajo, al consultar el genoma de *Paraconiothyrium sporulosum* se encontró la anotación o registro de 25 genes codificantes de peroxidasas, de los cuales tres codifican posiblemente para catalasas, y la mayoría asociada a funciones intracelulares. Otras dos regiones del genoma sin anotación posiblemente codifican para DyP (*Dye decolourising peroxidase*). Sin embargo, no existe ninguna región del genoma de *P. sporulosum* en la que esté anotado un gen o se relacione una secuencia con LiP o MnP.

De manera interesante, recientemente se reportó el secretoma de *Coniochaeta* sp. encontrándose diversas enzimas CAZ, pero ninguna de las tres enzimas ligninolíticas LiP, MnP y LAC (Ravindran et al., 2012). No obstante, los autores miden actividad de LiP y MnP en el sobrenadante de la cepa cultivada en presencia de rastrojo de maíz, atribuyendo la falta de correlación con el secretoma analizado mediante LC-MS/MS al hecho de que posiblemente las enzimas estaban ahí pero no presentaban homología con las depositadas en las bases de

datos. Por otro lado, se ha reportado la falta de reproducibilidad en la obtención de altos niveles de LiP en *C. sitophila* (Rodríguez et al., 1997).

Aunque se ha determinado la actividad extracelular de LiP y MnP en diferentes especies de ascomicetes, la evidencia genómica, proteómica y bioquímica generada en este grupo, y particularmente en *P. sporulosum*, de un género estrechamente relacionado con *Didymosphaeria*, sugiere que varios taxa de ascomicetes y en *Didymosphaeria* sp. no poseen genes de LiP o MnP. Se ha establecido que el origen evolutivo de las peroxidasas clase II, que incluyen a la LiP y MnP, está asociado al ancestro común más reciente de los Auriculariales y otros Agaricomycetes, mucho tiempo después de la separación entre Ascomycota y Basidiomycota (Floudas et al., 2012); la duplicación de genes de LiP y MnP ocurrió específicamente en linajes de basidiomicetes y el origen de genes activos solo se documenta en este grupo de hongos (Zhou et al., 2014). Aún más, todos los estudios genómicos recientes demuestran que los genes de LiP y MnP solo se encuentran en basidiomicetes (Ruiz-Dueñas et al. 2013; Riley et al. 2014; Nagy et al. 2016), y la evolución de dichas actividades ocurrió dentro de los Poliporales (Ayuso-Fernández et al., 2017). Por lo anterior, es posible afirmar que las mediciones extracelulares de estas actividades enzimáticas reportadas en ascomicetes, incluido el presente trabajo, son artefactos originados por la presencia de otras enzimas oxidativas o mecanismos químicos, no dependientes de actividad enzimática. Es por eso que no fue posible caracterizar los genes de MnP y LiP en el presente trabajo. Los posibles mecanismos que originan falsas lecturas positivas de MnP y LiP extracelular en ascomicetes estarían por ser dilucidados, pero podrían originarse por la presencia de otras enzimas oxidativas extracelulares (Nelsen et al. 2016).

En congruencia con nuestro trabajo de purificación y caracterización de la LAC extracelular de *Didymosphaeria* sp., y en contraste con los resultados de LiP y MnP, si fue posible obtener la secuencia del gen de LAC de la cepa CMU-196. La estrategia de secuenciación utilizada incluyó el diseño de iniciadores para ensayos de PCR basados en la secuencia de los genes respectivos de *D.*

variabile y *P. sporulosum*. El hecho de obtener un solo producto de amplificación y de encontrar una secuencia de lacasa en el genoma reportado de *P. sporulosum*, sugiere que en ambos géneros existe solo una LAC extracelular en las especies estudiadas, algo reportado en ascomicetos (Cázares-García et al., 2013), aunque existen algunos géneros dentro de este taxón que presentan varias isoenzimas (Tamayo-Ramos et al., 2011; Wu et al., 2015). Trabajos previos en ascomicetos muestran que cuando existe una lacasa extracelular, comúnmente se presenta también por lo menos una isoenzima intracelular (Cázares-García et al., 2013). Por lo anterior, es posible sugerir que tanto *Didymosphaeria* spp. como *P. sporulosum* presenten un gen de lacasa intracelular, algo que debe de explorarse a futuro con mayor detalle. De manera interesante, tanto la estructura del gen como la secuencia de aminoácidos obtenida *in silico* de la LAC de *P. sporulosum* muestra diferencias con las de *Didymosphaeria* spp., que se reflejan en su separación en el análisis filogenético. Esto es congruente con el criterio de considera a *P. brasiliense* y *P. variable* fuera del género *Paraconiothyrium*, y considerarlos dentro de *Didymosphaeria* (Ariyawansa et al., 2014), esto es, la filogenia de la LAC extracelular es congruente con la de las especies, algo no necesariamente esperado (Hoegger et al., 2007; Cázares-García et al., 2013). Por otra parte, la LAC extracelular de la cepa CMU-196 presenta todos los motivos de una lacasa *sensu stricto* dentro de los ascomicetos (Cázares-García et al., 2013), por lo que se descarta la posibilidad de que sea otra enzima de la familia de la Multi Cobre Oxidasas (MCO).

Las lacasas de *Didymosphaeria* spp. y *P. sporulosum* se agrupan con una isoforma de *Fusarium oxysporum*, especie fitopatógena que presenta distintas *formae speciales* (f. sp.) que en conjunto atacan a más de 100 diferentes especies vegetales (Dean et al., 2012). No obstante, existen cepas de *F. oxysporum* no fitopatógenas que son antagonistas eficientes de las variantes patógenas (Fravel et al., 2003). Además, la rama de las lacasas de las especies de interés y la de *F. oxysporum* se agrupan con isoenzimas extracelulares de especies del género *Trichoderma*. De las especies presentes en esa rama, se considera que tanto *T.*

atroviride como *T. virens* conservan el carácter ancestral de estilo de vida micoparasítico en el género (Kubicek et al., 2011), y *T. asperellum* ha mostrado ser también un micoparásito eficiente (El-Komy et al., 2017; Rosamana et al., 2015; Wu et al., 2017). Nosotros hemos aportado evidencia *in vitro* que muestra que la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. es un antagonista eficiente de hongos y oomicetes fitopatógenos (Arredondo-Santoyo et al., 2018). Esto es interesante, ya que se ha documentado que la lacasa extracelular de *T. virens* participa en el proceso de micoparasitismo hacia esclerocios de *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Catalano et al., 2011). Por todo lo anterior, es interesante plantear la hipótesis sobre si la rama que incluye las lacasas de *Trichoderma* spp. *F. oxysporum* y de las cepas aquí analizadas representa una afinidad funcional en dicha enzima, que juega un papel en el micoparasitismo. Esta hipótesis debe de ser explorada en estudios posteriores.

Referencias

1. Adav, S. S., Chao, L. T., Sze, S. K. 2012. Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. *Molecular and Cellular Proteomics*. mcp-M111. doi:10.1074/mcp.M111.012419.
2. Ariyawansa, H.A., Tanaka, K., Thambugala, K.M., Phookamsak, R., Tian, Q., Camporesi, E., Hongsanan, S., Monkai, J., Wanasinghe, D.N., Chukeatirote, E., Kang, J.C., Xu, J.C., McKenzie, E.H.C., Jones, E.B.G., Hyde, K.D. (2014). A molecular phylogenetic reappraisal of the Didymosphaeriaceae (= Montagnulaceae). *Fungal Diversity*. 68:69–104.
3. Arredondo-Santoyo, M., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Vázquez-Marrufo, G. 2018. Identification and characterization of the biotechnological potential of a wild strain of *Paraconiothyrium* sp. *Biotechnology Progress*. doi: 10.1002/btpr.2653
4. Ayuso-Fernández, I., Martínez, A. T., Ruiz-Dueñas, F. J. 2017. Experimental recreation of the evolution of lignin-degrading enzymes from the Jurassic to date. *Biotechnology for Biofuels*. 10(1): 67.

5. Bucher, V. V. C., Pointing, S. B., Hyde, K. D., Reddy, C. A. 2004. Production of wood decay enzymes, loss of mass, and lignin solubilization in wood by diverse tropical freshwater fungi. *Microbial Ecology*. 48(3): 331-337.
6. Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., Martínez, Á. 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. *Journal of Biological Chemistry*. 274(15): 10324-10330.
7. Catalano, V., Vergara, M., Hauzenberger, J. R., Seiboth, B., Sarrocco, S., Vannacci, G., Kubicek, C.P., Seidl-Seiboth, V. 2011. Use of 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(1): 13-23.
8. 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.
9. Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis J., Foster, G. D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13(4): 414-430.
10. El-Komy, M. H., Saleh, A. A., Eranthodi, A., Molan, Y. Y. 2015. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *The Plant Pathology Journal*. 31(1): 50-60.
11. Ferrer, I., Esposito, E., Durán, N. 1992. Lignin peroxidase from *Chrysonilia sitophila*: Heat-denaturation kinetics and pH stability. *Enzyme and Microbial Technology*. 14(5): 402-406.
12. Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., et al. 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*. 336(6089): 1715-1719.
13. Fravel, D., Olivain, C., Alabouvette, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*. 157(3): 493-502.

14. Gao, H., Wang, Y., Zhang, W., Wang, W., Mu, Z. 2011. Isolation, identification and application in lignin degradation of an ascomycete GHJ-4. *African Journal of Biotechnology*. 10(20): 4166-4174.
15. Hammel, K. E., Cullen, D. 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*. 11(3): 349-355.
16. Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R., Kües, U. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *The FEBS Journal*. 273(10): 2308-2326.
17. Hoang, D.T, Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q., Vinh, L. S. 2018. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*. 35(2): 518-522.
18. Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdarska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., Paszczyński, A. 2017. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*. 41(6): 941-962.
19. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., and Jermini, L.S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 14:587–589.
20. Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K. D. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*. bbx108doi: 10.1093/bib/bbx108.
21. 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(1):153-63.
22. Kornilowicz-Kowalska, T., Rybczyńska, K. 2015. Screening of microscopic fungi and their enzyme activities for decolorization and biotransformation of some aromatic compounds. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 12(8): 2673-2686.
23. Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., et al. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*. 12(4): 1.

24. Lopez, M. J., del Carmen Vargas-García, M., Suárez-Estrella, F., Nichols, N. N., Dien, B. S., Moreno, J. 2007. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme and Microbial Technology*. 40(4): 794-800.
25. Manavalan, T., Manavalan, A., Heese, K. 2015. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Current Microbiology*. 70(4): 485-498.
26. Nagy, L.G., et al. 2016. Comparative genomics of early-diverging mushroom-forming fungi provides insights into the origins of lignocellulose decay capabilities. *Mol Biol Evol*. 33:959–970.
27. Nelsen, M. P., DiMichele, W. A., Peters, S. E., Boyce, C. K. 2016. Delayed fungal evolution did not cause the Paleozoic peak in coal production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113(9): 2442-2447.
28. Nguyen, L.T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., Minh, B. Q. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 32:268-274.
29. Raghukumar C. 2000. Fungi from marine habitats: an application in biodegradation. *Mycol Res*.104:1222–1226.
30. Ravindran, A., Adav, S. S., Sze, S. K. 2012. Characterization of extracellular lignocellulolytic enzymes of *Coniochaeta* sp. during corn stover bioconversion. *Process Biochemistry*. 47(12): 2440-2448.
31. Reddy CA, D'Souza TM. 1998. Application of PCR in studying lignocellulose degradation by basidiomycetes. *Applications of PCR in mycology*. 205-242
32. Riley, R., et al. 2014. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:9923–9928.
33. Rodríguez, J., Ferraz, A., Nogueira, R. F., Ferrer, I., Esposito, E., Durán, N. 1997. Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 62(2-3): 233.
34. Rosmana, A., Samuels, G. J., Ismaiel, A., Ibrahim, E. S., Chaverri, P., Herawati, Y., Asman, A. 2015. *Trichoderma asperellum*: a dominant endophyte species in

- cacao grown in Sulawesi with potential for controlling vascular streak dieback disease. *Tropical Plant Pathology*. 40(1): 19-25.
35. Ruiz-Dueñas, F.J., et al. 2013. Lignin-degrading peroxidases in Polyporales: an evolutionary survey based on 10 sequenced genomes. *Mycologia*. 105:1428–1444.
 36. Sela, I., Ashkenazy, H., Katoh, K., Pupko, T. 2015. GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. *Nucleic Acids Research*. 43(W1): W7-W14.
 37. Shary, S., Ralph, S. A., Hammel, K. E. 2007. New insights into the ligninolytic capability of a wood decay ascomycete. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(20): 6691-6694.
 38. Simonis, J. L., Raja, H. A., Shearer, C. A. 2008. Extracellular enzymes and soft rot decay: are ascomycetes important degraders in fresh water. *Fungal Diversity*. 31(1): 135-146.
 39. Tamayo-Ramos, J. A., Barends, S., Verhaert, R. M., 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. doi: 10.1186/1475-2859-10-78.
 40. Tien M, Kirk TK (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol*. 161:238–249.
 41. Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., Minh, B. Q. 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*. 44(W1): W232-W235.
 42. Wu, Z., Si, W., Xue, H., Yang, M., Zhao, X. 2015. Molecular characterization and expression profiling of novel laccase isoenzyme genes from *Fusarium solani* X701, a wood-rotting ascomycete. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 104: 123-128.
 43. Wariishi H, Valli K, Gold MH (1992) Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *The Journal of Biological Chemistry* 267:23688–23695.

44. Wu, Q., Sun, R., Ni, M., Yu, J., Li, Y., Yu, C., et al. 2017. Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. *PloS One*. 12(6): e0179957.
45. Yang Q, Yang M, Pritsch K, Yediler A, Hagn A, Schloter M, et al. 2003. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. *Biotechnol Lett*. 25:709–713.
46. Zeiner, C. A., Purvine, S. O., Zink, E. M., Paša-Tolić, L., Chaput, D. L., Haridas, S., Wu, S., LaButti, K., Grigoriev, I.V., Henrissat, B., Santelli, C. M., Hansel, C.M. 2016. Comparative analysis of secretome profiles of manganese (II)-oxidizing Ascomycete fungi. *PloS One*. 11(7): e0157844.
47. Zhou, L. W., Wei, Y. L., Dai, Y. C. 2014. Phylogenetic analysis of ligninolytic peroxidases: preliminary insights into the alternation of white-rot and brown-rot fungi in their lineage. *Mycology*. 5(1): 29-42.
48. Zuccon, A., Zuccon, D. 2014. MrEnt: an editor for publication-quality phylogenetic tree illustrations. *Molecular Ecology Resources*. 14(5): 1090-1094.

VI.3 CAPITULO III.

“Producción de lacasa extracelular del hongo ascomicete *Didymosphaeria* sp. (sin.=*Paraconiothyrium brasiliense* sensu lato) en presencia de rastrojo de maíz y digestibilidad ruminal *in vitro* del tratamiento fúngico de dicho sustrato”

Artículo concluido

Se someterá a la revista *Animal Feed Science and Technology*

Producción de lacasa extracelular del hongo ascomicete *Didymosphaeria* sp. (sin.=*Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*) en presencia de rastrojo de maíz y digestibilidad ruminal *in vitro* del tratamiento fúngico de dicho sustrato

Marina Arredondo-Santoyo¹, José Herrera-Camacho², Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas³ y Gerardo Vázquez-Marrufo^{1*}

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Col. La Palma, Tarímbaro, Michoacán CP 58262

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Col. La Palma, Tarímbaro, Michoacán CP 58262

³División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Ave. Rafael Carrillo esq. Dr. Salvador González Herrejón, Col. Cuauhtémoc, Morelia, Michoacán CP 58020

*Autor para correspondencia:

Dr. Gerardo Vázquez-Marrufo

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro

Col. La Palma

Tarímbaro, Michoacán CP 58262

Tel/Fax: +52 01 443 2 95 80 29

E-mail: gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx

RESUMEN

La lignina es un factor limitante para que los rumiantes digieran eficientemente los polisacáridos de la pared celular del forraje. Los hongos depolimerizan la lignina del complejo de lignocelulosa produciendo enzimas oxidativas extracelulares como la lacasa (LAC). Se evaluó la capacidad de la cepa CMU-196 del hongo ascomicete *Didymosphaeria* sp. (sin.=*Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*) para producir LAC extracelular en presencia de rastrojo de maíz (RM) y delignificar dicho sustrato. El RM se incubó con la cepa de estudio en ensayos de fermentación en sustrato sólido (FSS) a distintos tiempos de incubación, evaluando la digestibilidad ruminal *in vitro* de la biomasa vegetal tratada. La máxima actividad de LAC fue de 262.27 (± 0.58) U/L y se obtuvo el cuarto día de incubación en caldo extracto de papa adicionado con RM molido (2% p/v). En el medio adicionado con extracto acuoso de RM (10% v/v) se encontró una actividad máxima de 39.74 (± 0.24) U/L a los nueve días de incubación. La microscopía electrónica de barrido reveló que la cepa CMU-196 degrada las paredes celulares primarias y secundarias y desestructura significativamente vasos y traqueidas. El rastrojo tratado con la cepa CMU-196 en ensayos de FSS por 2, 4, 6, 8 y 10 semanas aumentan la producción ruminal de gas *in vitro* en una fracción que se considera no digerible a las 18 h. El tratamiento de 2 semanas presenta la mayor producción de gas incrementando en un 14.08% con respecto al RM no tratado. El RM tratado con el hongo por 4 semanas presenta una disminución en el contenido de FDA de 0.455 (± 0.063) a 0.381 (± 0.029). El análisis bromatológico mostró que el porcentaje de humedad se mantuvo constante en todos los casos en un promedio de 98.31% (± 0.53), el porcentaje de proteína total aumenta conforme aumentan las semanas de tratamiento alcanzando un máximo de 3.32% a las 10 semanas, caso contrario con los porcentajes de fibra cruda que disminuyen conforme aumentan las semanas de tratamiento, siendo el de 2 semanas el que presenta el mayor porcentaje de 31.46%. Los resultados muestran que la cepa CMU-196 posee potencial para el pre-tratamiento de rastrojo de maíz para favorecer la digestibilidad de rumiantes.

Palabras clave: Lacasa, *Didymosphaeria* sp., *Paraconiothyrium variabile*, rastrojo de maíz, digestión ruminal.

Introducción

El forraje constituye la parte comestible de las plantas, además del grano, las cuales proveen alimento para animales de pastoreo o pueden ser cosechadas con fines de alimentación de distintos tipos de ganado (Wilkins, 2000). El cultivo forrajero es utilizado comúnmente para describir cultivos de especies vegetales, generalmente plantas anuales y bianuales, las cuales se utilizan para el pastoreo o son cosechadas para utilizarse como alimento animal, como los tallos y tejido foliar remanente de la cosecha del maíz y del sorgo (Wilkins, 2000). Una característica relevante de la mayoría de las plantas forrajeras es el gran porcentaje del peso seco (40-80%) constituido por polímeros complejos asociados a la pared celular, principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina (Sarkar et al., 2009). Los contenidos de cada uno de estos polímeros en la pared celular varían entre las especies de plantas forrajeras, además, la constitución de la pared celular se va modificando durante el proceso de desarrollo de la planta y varía en los distintos tejidos de una planta madura. El contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina reportado en distintas especies de forrajes varía dependiendo del método de determinación (Van Dyk y Pletschke, 2012).

Uno de los factores que influye de manera determinante en la eficiencia de digestión del rastrojo por parte de rumiantes es el contenido de lignina de la pared celular de las plantas empleadas como alimento. Así, en trigo se han reportado contenidos de lignina del 7.7 al 17%, en arroz entre 9.9 y 18% y en distintas herbáceas entre el 10 y el 30% (Van Dyk y Pletschke, 2012). La lignina puede inhibir la hidrólisis de los polisacáridos por distintos mecanismos que incluyen la conformación de una barrera física que dificulta el acceso de celulasas y hemicelulasas a sus sustratos, la adsorción de dichas enzimas a la lignina y la inhibición directa de éstas, entre otros (Van Dyk y Pletschke, 2012). Por lo anterior, la eliminación de lignina del rastrojo se considera un paso necesario en la

optimización del aprovechamiento del forraje por parte de los rumiantes de granja (Grabber, 2005). Los procesos de eliminación de lignina en rastrojo (delignificación) incluyen métodos físicos, químicos y biológicos, así como sus combinaciones (Buranov y Mazza, 2008; Ravindran y Jaiswal, 2016). En la naturaleza la degradación de lignina involucra una gran variedad de enzimas hidrolíticas y oxidativas, pero el tratamiento de rastrojo se ha centrado en la utilización de cuatro de las enzimas oxidativas mejor descritas y de mayor utilización en procesos de delignificación en diversas áreas de la biotecnología. Una de estas enzimas es la oxidoreductasa lacasa (LAC, EC 1.10.3.2), y las otras tres son peroxidasas de Clase II e incluyen a la lignin-peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14), la manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) y la peroxidasa versátil (PV, EC 1.11.1.16), siendo los hongos basidiomicetes de pudrición blanca los principales productores de dichas actividades enzimáticas (Paliwal et al., 2012).

Una cepa fúngica con potencial para el tratamiento de rastrojo destinado a la alimentación de rumiantes de granja debe degradar la lignina sin consumir los polisacáridos, con la finalidad de que estos queden disponibles para la microbiota ruminal (van Kuijk et al., 2015). Aunque la mayoría de estudios de tratamiento de forraje para el mejoramiento de la digestión ruminal se han enfocado en el uso de cepas de distintas especies de basidiomicetos de pudrición blanca (van Kuijk et al., 2015), algunos trabajos reportan el tratamiento de rastrojo con hongos ascomicetos, encontrando resultados interesantes. Por ejemplo, *Fusarium moniliforme* delignifica significativamente el rastrojo de arroz sin consumir la holocelulosa del sustrato, mostrando mejores resultados en ambos parámetros que los obtenidos con *Phanerochaete chrysosporium* (Chang et al., 2012). Además, el tratamiento de cáscara de cacahuate inoculada con *Trichoderma viride* crecido en pulpa de remolacha de azúcar mejoró la degradabilidad *in sacco* y la digestibilidad del material tratado por parte de ovejas (Abo-Donia et al., 2014).

Recientemente nuestro grupo de trabajo demostró la producción de lacasa extracelular en el hongo ascomycete *Paraconiothyrium brasiliense* (Arredondo-

Santoyo et al., 2018), que debido a un reacomodo taxnómico debe de ser nombrado como *Didymosphaeria* sp. (Ariyawansa et al., 2014). En el presente trabajo se analiza la capacidad de la misma cepa *Didymosphaeria* sp. (sin.= *P. brasiliense*) para delignificar rastrojo de maíz (RM), evaluando la producción de lacasa extracelular en presencia de dicho sustrato. Posteriormente se estudió el efecto del tratamiento fúngico del forraje de maíz de sobre la digestibilidad ruminal *in vitro*. Los resultados obtenidos se contrastan con tratamientos fúngicos de biomasa vegetal destinada a la alimentación ruminal y muestran que la cepa CMU-196 es un eficiente mejorador de la digestión del rastrojo de maíz, comparable o aún mejor que los resultados obtenidos con basidiomicetes de pudrición blanca.

Materiales y métodos

Cepa de estudio

Se empleó la cepa CMU-196 inicialmente descrita como *Paraconiothyrium brasiliense* (Arredondo-Santoyo et al., 2018), que debe ser considerada como *Didymosphaeria* sp. (Ariyawansa et al., 2014), depositada en el Cepario Michoacano Universitario (CMU) del Laboratorio de Biotecnología y Conservación de Microorganismos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Arredondo-Santoyo et al., 2018).

Medios de cultivo y obtención de inóculos

El medio Agar Papa y Dextrosa (PDA, Difco™ BD, Diagnostics) se empleó para el cultivo y mantenimiento del micelio vegetativo y la obtención de inóculos. Los inóculos se obtuvieron del borde de la colonia en la fase logarítmica de crecimiento con un sacabocados de 6 mm de diámetro a partir de colonias creciendo en medio PDA a 24 °C. El medio caldo de papa (PDB, Difco™, BD Diagnostics) se utilizó para elaborar las cinéticas de crecimiento en medio líquido y determinar la actividad enzimática de lacasa extracelular (LAC). Los medios se esterilizaron en autoclave a 15 lb/in² durante 15 min.

Procesamiento del rastrojo para los cultivos en medio líquido

Para los cultivos en medio líquido se empleó rastrojo de maíz (*Zea mays*) maíz molido y extracto de rastrojo. El rastrojo de maíz molido (RM) se obtuvo de un proveedor local, el rastrojo seco se fragmentó en un pulverizador a 300 rpm durante 2 min, para homogenizar el tamaño de partícula la muestra fue tamizada en una malla con tamaño de poro de ≤ 1 mm.

El extracto de rastrojo (ER) se obtuvo hirviendo 200 g de la biomasa vegetal en 100 mL de agua destilada durante 1 h, reemplazando continuamente el agua evaporada para mantener el volumen inicial de líquido. El extracto líquido obtenido se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pasó a través de una gasa para eliminar los residuos sólidos de rastrojo, esterilizándose finalmente en autoclave a 15 lb/in² durante 15 min.

Cultivo en medio líquido

Los cultivos líquidos se emplearon para determinar el crecimiento de la cepa y evaluar el nivel de actividad enzimática de LAC tanto basal como inducida con rastrojo. Para la actividad basal, matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio PDB se inocularon con 6 inóculos cilíndricos de 6 mm de diámetro obtenidos de la manera previamente descrita. El medio así inoculado se incubó a 24 °C agitando a 120 rpm. En el caso de los cultivos inducidos, el medio PDB basal se suplementó con rastrojo de maíz molido (2% p/v) o extracto acuoso del mismo (10% v/v), obtenidos de la manera previamente descrita.

Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento se elaboró midiendo la tasa de crecimiento (mg/día) cada 24 h por un periodo de nueve días en las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas. El micelio se cosechó filtrando el contenido de cada matraz a través de un papel filtro grado 41 (Whatman, UK) puesto a peso constante. El micelio se lavó con agua destilada, el papel filtro con el micelio se

secó a 60 °C por 24 h, se colocó en un desecador y se pesó. El peso seco del micelio se determinó por la diferencia de peso al restar el peso del papel.

Determinación de la actividad de lacasa extracelular

La actividad extracelular LAC se midió en los cultivos inducidos con RM y ER. Previamente se documentó que la cepa CMU-196 no presenta actividad de LAC en cultivos basales de PDB durante los primeros diez días de incubación (Arredondo-Santoyo et al., 2018). Durante nueve días se tomaron alícuotas de 1.5 mL cada 24 h del medio líquido extracelular de cada condición de cultivo y se centrifugó a 750 x g durante 5 min para eliminar restos de micelio. La actividad extracelular de LAC se determinó midiendo la oxidación del ABTS a 420 nm (Nagai et al., 2002). La mezcla de reacción estaba compuesta por 50 mM de buffer MacIlvaine pH 4.0, 1mM de ABTS (2, 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) y 100 µL de la fase acuosa del medio de cultivo centrifugado. Las muestras se incubaron a 30 °C durante 20 min y la reacción se detuvo añadiendo 0.5% (v/v) en solución acuosa de ácido tricloroacético. La formación del radical catiónico se determinó midiendo el incremento en la absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$). Los valores de actividad fueron expresados en unidades de actividad enzimática (U), la cual expresa la cantidad de sustrato convertido por unidad de tiempo, tomando en cuenta un volumen de reacción de 1 mL en todos los casos.

Ensayos de fermentación en sustrato sólido

Se colocaron 50 g de rastrojo en bolsas de polipapel de 1 kg y se añadieron 150 mL de H₂O_{dd}. Las bosas de fermentación con la biomasa vegetal se esterilizaron en autoclave a 120 °C y 15 lb/in², repitiendo dos veces el proceso de esterilización. A cada bolsa de fermentación se le adicionaron 10 inóculos de la cepa de interés obtenidos de la manera anteriormente descrita. Los cultivos así preparados y un control de rastrojo de cada condición sin inocular fueron incubados en oscuridad a 24 °C por periodos de 2, 4, 6, 8 y 10 semanas. Al término de cada periodo de

incubación el material de fermentación obtenido se secó a 70 °C por 12 h para su análisis posterior. Los tratamientos fueron realizados en tres ensayos independientes por triplicado. Se emplearon dos controles; el primero denominado WI (sin inocular) corresponde a una muestra preparada de la manera anteriormente descrita pero sin inocular con la cepa de estudio, el cual se esterilizó y se incubó de manera independiente por los mismos periodos de tiempo que los tratamientos con el hongo. El segundo control denominado IS, corresponde a una muestra de rastrojo intacto sin humedecer, ni esterilizar.

Análisis estructural del rastrojo tratado

Para evaluar el proceso de delignificación de rastrojo de maíz por parte de la cepa de estudio se realizó un análisis estructural mediante microscopia electrónica de barrido (MEB). Para este análisis, se colocaron fragmentos de rastrojo sobre un portaobjetos recubierto con papel filtro Watman No.10 fijado en una placa de cultivo sólido PDA. En el centro del portaobjetos se inóculo la cepa de estudio. Las placas así inoculadas se incubaron a 24 °C por un periodo de 4, 6 y 12 semanas humedeciéndose con H_2O_{dde} cada semana; al término de cada periodo de incubación, la biomasa con el micelio se separó del medio de cultivo para secarse a 60 °C por 12 h. Fragmentos de las muestras secas fueron recubiertas con un baño de iones de cobre para ser analizadas mediante Microscopia Electrónica de Barrido empleando un microscopio JEOL JSM-7600F operado a 20-30 KeV.

Análisis bromatológico

A la biomasa recuperada de los ensayos de FSS se le realizó un análisis bromatológico determinando los porcentajes de materia seca (MS), proteína total (PT) y fibra cruda (FC). Para determinar el porcentaje de MS la muestra se secó a 60 °C hasta peso constante, considerando que la pérdida de peso es agua, se utilizó la siguiente formula: % de humedad total = (pérdida de peso/peso de muestra)*100 y % de materia seca parcial = 100 – (% de humedad). Las

determinaciones de PT y FC se realizaron de acuerdo a las normas NMX-F-608-NORMEX-2011 y NMX-F-613-NORMEX 2013, respectivamente.

Fermentación ruminal y producción de gas in vitro

A las muestras de rastrojo tratadas con el hongo en los ensayos de FSS y sus respectivos controles se les realizó el ensayo de fermentación ruminal *in vitro* de acuerdo a la técnica de producción de gas descrita por Theodorou *et al.* (1994). Para ello se colocaron 0.99 g de materia seca (MS) de cada tratamiento en frascos de vidrio de 125 mL y se añadieron 90 mL de saliva artificial y 10 mL de líquido ruminal como agente inoculante. El agente inoculante se obtuvo de dos vacas Holstein adultas, vacías y secas, alimentadas con una dieta compuesta por 80% forraje (ensilado y rastrojo de maíz) y 20% alimento concentrado comercial. Durante el periodo de incubación de la muestra a 39 °C se llevó a cabo la lectura de producción de gas en tiempo real a intervalos de 60 min durante las primeras 10 h, y posteriormente a intervalos de 4 h hasta las 110 h empleando un manómetro digital desmontable (Luton PS, Alemania) con un transductor acoplado a una aguja. De este análisis se realizaron tres ensayos independientes por triplicado para cada uno de los tratamientos determinándose el error estándar.

Análisis de fibra

Para la determinación de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), se analizó la Fibra Detergente Neutro (FDN) en los residuos de la producción de gas *in vitro*, según la técnica descrita por Van Soest *et al.* (1991). Los residuos fibrosos presentes en los frascos de cultivo del ensayo de producción de gas se filtraron a través de una membrana grado 54 (Whatman, UK). Posteriormente se adicionó acetona para eliminar residuos lipídicos de las fibras y se deshidrataron en estufa de aire forzado a 65 °C durante 24 h. Para evaluar la digestibilidad de la fibra detergente neutra (DIVFDN) se agregaron 50 mL de solución FDN y se trató en autoclave a 105 °C por una hora para su posterior deshidratación. El porcentaje de DIVMS se obtuvo por diferencia de peso entre la muestra inicial y la materia seca

del residuo, mientras que para la DIVFDN se calculó teniendo en cuenta el contenido de la FDN de la muestra entre el contenido de FDN de la muestra intacta. Para calcular el porcentaje de la digestibilidad *in vitro* en base de Materia Seca se utilizó la fórmula (%DIVMS): $\%DIVMS = ((0.999 \text{ g MS} - (\text{Peso del residuo} - \text{Peso del blanco})) / 0.999) * 100$.

Análisis estadístico

Los resultados de FDN en cada uno de los tiempos de incubación fueron analizados mediante la prueba de *t de student* considerando como tratamientos el rastrojo tratado (T) y el no tratado ó control (C) considerando un valor de significancia $p \leq 0.05$. Los análisis se realizaron en programa estadístico JMP versión 13.

Resultados

Actividad enzimática y cinética de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento y actividad extracelular de LAC de la cepa CMU-196 en medio suplementado con rastrojo de maíz y extracto acuoso de este se muestran en la figura 1. El extracto de rastrojo inhibe el crecimiento de la cepa de estudio, retrasando la producción de micelio particularmente entre el segundo y el quinto día de incubación, en relación al crecimiento de la cepa en presencia de rastrojo molido. Así, mientras que la fase logarítmica media de crecimiento en rastrojo molido se alcanza hacia el segundo día de incubación, en extracto del sustrato se alcanza hacia el cuarto día (Figura 1). No obstante, ambas cinéticas de crecimiento entran en fase estacionaria en el sexto día de incubación con una producción máxima de biomasa $190.33 (\pm 5.38)$ mg.

En relación con la actividad extracelular de LAC de la cepa CMU-196 en presencia de extracto de rastrojo, ésta no se detecta hasta el quinto día de incubación y se mantiene relativamente estable los siguientes dos días, para mostrar un incremento pequeño pero significativo hacia el último día de medición, con un valor máximo de $39.74 (\pm 0.24)$ U/L en etapa estacionaria (Figura 1). En el

caso del medio suplementado con rastrojo molido, la actividad de LAC muestra un rápido incremento en los primeros días de incubación, alcanzando el máximo de 262.27 (± 1.495) U/L hacia el cuarto día (Figura 1), en la etapa logarítmica tardía del crecimiento. Los valores de las actividades enzimáticas y cinéticas de crecimiento de las condiciones ensayadas en tres puntos de muestreo relevantes se resumen en la tabla 1.

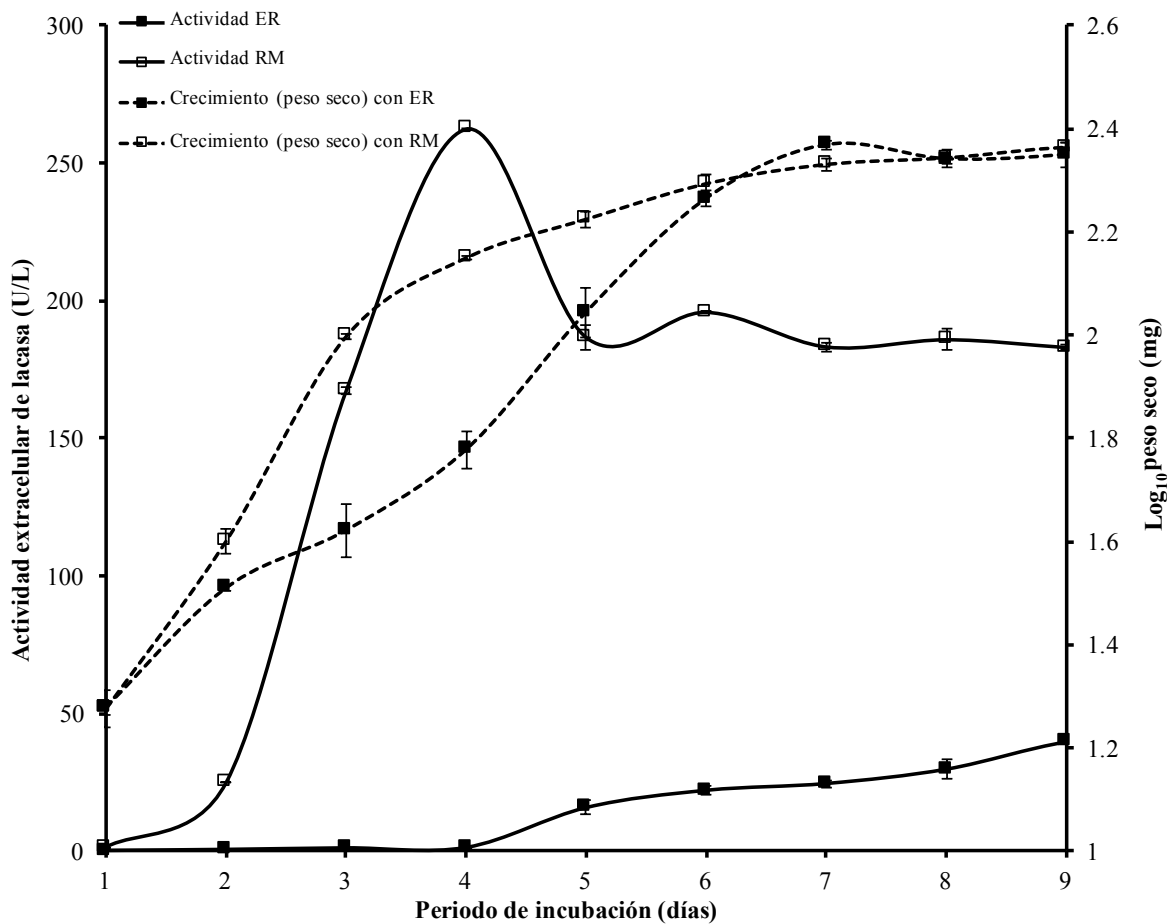


Figura 1. Cinética de crecimiento y actividad extracelular de lacasa de *Didymosphaeria* sp. (sin=*P. brasiliense*) en presencia de rastrojo de maíz. La cepa CMU-196 se inoculó en medio PDB adicionado con extracto de rastrojo 10% (v/v) y con rastrojo molido al 2% (p/v), incubándose a 24 °C y 120 rpm de agitación. Clave: SE; extracto de rastrojo, RM; rastrojo molido.

Tabla 1. Actividad extracelular de lacasa de la cepa CMU-196 en presencia de rastrojo de maíz y extracto de rastrojo.

Periodo de incubación (días)	Actividad de lacasa ER (U/L)	Log ₁₀ peso seco ER (mg)	Actividad de lacasa RM (U/L)	Log ₁₀ peso seco RM (mg)
1	0.0 (±0.0)	1.27 (±0.013)	1.42 (±0.130)	1.27 (±0.036)
4	1.11 (±0.162)	1.77 (±0.036)	262.27 (±1.495)	2.14 (±0.015)
9	39.74 (±0.247)	2.34 (±0.023)	182.91 (±1.066)	2.36 (±0.021)

Clave: (±); error estandar, ER; extracto de rastrojo, RM, rastrojo molido.

*Modificaciones estructurales de rastrojo de maíz tratado con *Didymosphaeria* sp.*

Las microfotografías de MEB muestran como conforme avanza el proceso de fermentación en sustrato sólido, el tejido vascular del rastrojo va experimentando cambios estructurales significativos (Figura 2). Desde las cuatro semanas de incubación se observa una reducción significativa de las paredes primarias y secundarias, causadas por el hongo (Figura 2, Panel B), con respecto al rastrojo control (Figura 2, Panel A). También es evidente ya en ese tiempo de incubación una desestructuración en vasos y traqueidas. A las seis semanas prácticamente se ha perdido toda la estructura del tejido vascular (Figura 2, Paneles C, D) y después 12 semanas de tratamiento únicamente se observan vestigios y fragmentos remanentes de dichos tejidos (Figura 2, Paneles E, F).

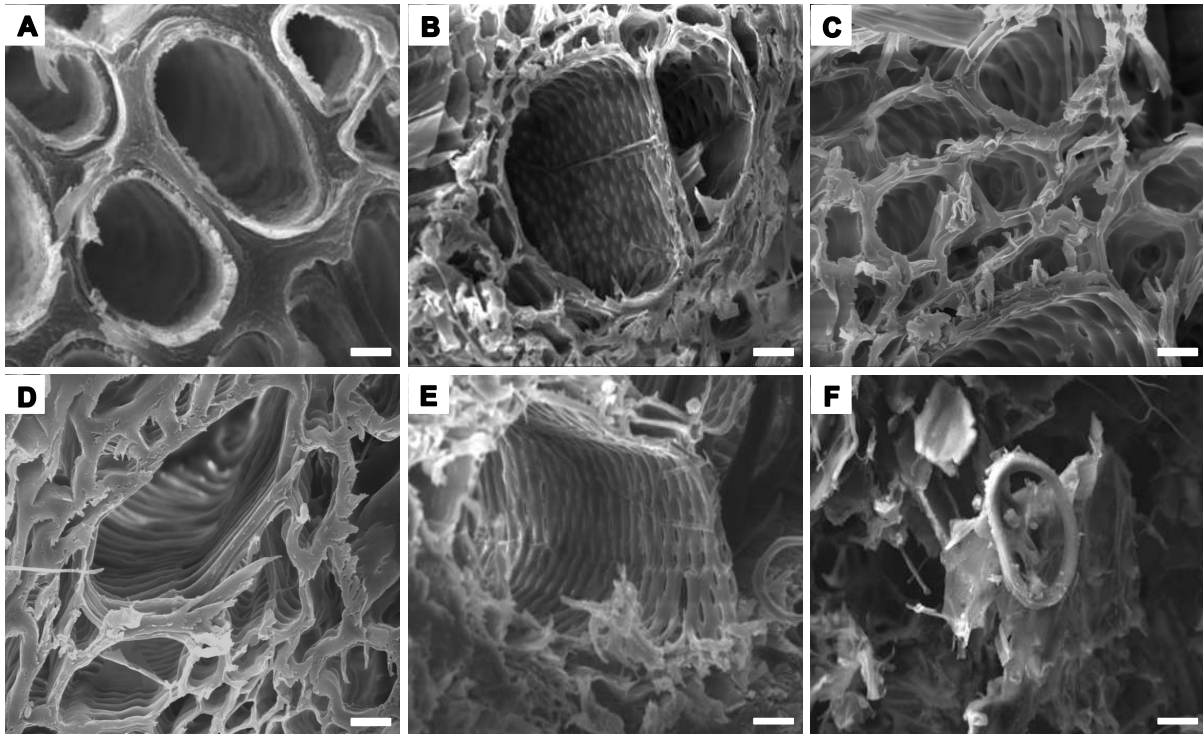


Figura 2. Modificaciones estructurales del rastrojo de maíz tratado con la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. (sin.=*P. brasiliense*). Las micrografías de microscopía electrónica de barrido muestran tejido vascular del rastrojo de maíz obtenido de los ensayos de fermentación en sustrato sólido durante 4 (panel B), 6 (paneles C, D) y 12 (panel E, F) semanas de incubación. Panel A, control sin tratamiento fúngico. Barra=10µm. Para detalles ver Materiales y Métodos.

Análisis bromatológico

En la Tabla 2 se muestra los resultados del análisis bromatológico realizado al rastrojo tratado en ensayos de FSS con la cepa CMU-196 y del rastrojo control sin tratamiento fúngico. Los porcentajes de MS en todos los casos son altos, en los tratamientos de la biomasa con el hongo se encuentran entre el 97% y 99%, siendo el tratamiento de diez semanas el que muestra mayor porcentaje de 99.09%, los porcentajes de los controles WI e IS se encuentran por debajo de los tratamientos con el hongo con respecto a los porcentajes de controles WI (2.73%) y SI (3.41%); sin embargo, los porcentajes de PT aumentan con forme aumenta el periodo de incubación de cada tratamiento, los porcentajes van de 0.83% para el tratamiento de dos semanas hasta 3.32%

para el de diez semanas. En el análisis de FC puede observarse que los controles WI e IS presentan los porcentajes más altos de 33.40% y 34.36%, respectivamente. En los tratamientos con el hongo, conforme aumentan las semanas de incubación los porcentajes de FC disminuyen, yendo de 31.46% después de dos semanas a 27.85% las diez semanas de incubación.

Tabla 2. Análisis bromatológico de los tratamientos de rastrojo con la cepa CMU-196 y controles WI e IS.

Tratamiento	MS (%)	PT (%)	FC (%)
2 semanas	98.31	0.8399	31.4635
4 semanas	97.91	0.7507	31.4485
6 semanas	98.53	1.0919	20.2743
8 semanas	97.72	1.1420	28.8649
10 semanas	99.09	3.3270	27.8594
Control WI	97.57	2.7326	33.4033
Control IS	97.28	3.4105	34.3693

Clave: MS, materia seca; PT, proteína total; FC, fibra cruda.

Fermentación ruminal in vitro

El análisis de producción de gas acumulado debido a la fermentación ruminal *in vitro* muestra un patrón típico de fermentación, observándose que la comunidad microbiana ruminal es viable durante todo el proceso tanto para el rastrojo tratado con el hongo en los ensayos de FSS como para los controles (Figura 1, Panel A). Los resultados obtenidos muestran que todos los tiempos de incubación del rastrojo con la cepa CMU-196 presentan una producción de gas superior a los controles de rastrojo sin tratamiento fúngico, con un valor máximo para el control WI de 180.76 cm³ y para el control IR de 123.49 cm³. El ensayo de FSS de dos semanas de incubación generó una emisión de gas máxima de todos los tiempos de incubación, con un valor de 237.38 cm³. El gráfico de producción de gas acumulado muestra que conforme se incrementa el tiempo de incubación disminuye la producción de gas, generándose valores de 231.20 cm³, 210.04 cm³, 204.05 cm³, 199.27 cm³ para las cuatro, seis, ocho, y diez semanas de incubación, respectivamente.

En todos los puntos de muestreo, la producción de gas acumulado de los ensayos de FSS en los distintos tiempos de incubación con el hongo es superior a la de ambos controles analizados (Figura 1, panel A). La máxima producción de gas acumulado se da en el ensayo de FSS de dos semanas de incubación, con un valor de 237.38 cm³ a las 110 h, mientras para los controles WI e IR dicho valor fue de 180.76 cm³ y 123.51 cm³, respectivamente, en el mismo tiempo de medición (Figura 1, Panel A). Estos valores representan un incremento de 1.92 y 1.31 veces de la producción de gas acumulada en el ensayo de FSS de dos semanas, en relación a los controles WI e IR, respectivamente. La producción de gas en cada punto de muestreo del proceso de fermentación ruminal *in vitro* muestra que en la biomasa vegetal de todos los tiempos de incubación de los ensayos de FSS se presenta la producción de gas *in vitro* desde las primeras cuatro o cinco horas de iniciado el cultivo (Figura 1, Panel B). En contraste, en el caso de la muestra de rastrojo control WI la emisión de gas comienza después de las 18 h y para el control IR inicia hasta las 22 h.

En cada punto de muestreo, el rastrojo proveniente de los ensayos de FSS de todos los tiempos de incubación presenta mayor producción de gas que el control RI. Entre las 18 y 20 h de digestión ruminal la biomasa de maíz proveniente de los ensayos de FSS de todos los tiempos de tratamiento muestra el pico máximo de producción de gas, cuando en los controles apenas está iniciando dicho proceso (Figura 1, Panel B). La máxima producción de gas la genera el rastrojo del ensayo de FSS incubado durante dos semanas con la cepa CMU-196, con 14.08 (±0.001) cm³ a las 18 h. Los máximos de producción de gas de los controles son de 10.37 (±0.36) cm³ y de 6.82 (±0.34) para WI e IR a las 34 horas, respectivamente. Todos los ensayos de FSS disminuyen la producción de gas después de alcanzar su máximo, pero los tratamientos de 2, 4 y 6 semanas vuelven a incrementarse alcanzando un segundo pico a las 82 horas, por encima del control WI.

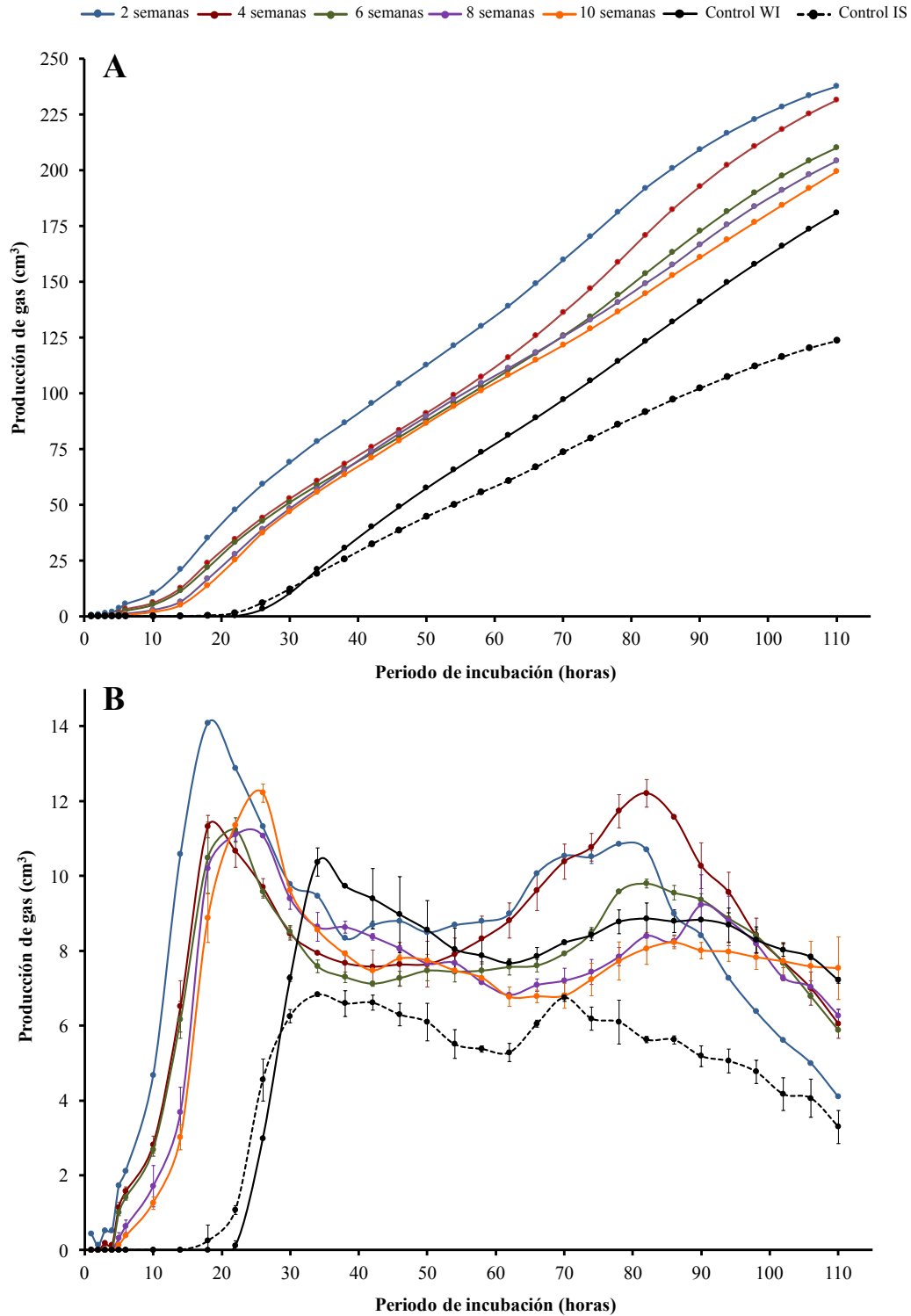


Figura 3. Producción de gas de la fermentación ruminal *in vitro* de rastrojo de maíz tratado con la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. (sin.=*P. brasiliense sensu lato*). Panel A, producción de gas acumulada; Panel B, producción de gas en cada tiempo de muestreo.

Análisis de FDN

En la figura 4 se muestra el porcentaje de DIVMS obtenido en las muestras tratadas y no tratadas con la cepa CMU-196 por periodos de dos, cuatro, seis, ocho y diez semanas. Se observa que en todos los casos la digestibilidad de los controles es superior a la digestibilidad del rastrojo en todos los tiempos de tratamiento, aunque en la mayoría de los casos las diferencias no son significativas. No obstante, el tratamiento de cuatro semanas de incubación con el hongo muestra una mayor digestibilidad (0.455 ± 0.063) con respecto al control no tratado (0.381 ± 0.029), tratamiento que muestra una diferencia significativa con respecto a los demás.

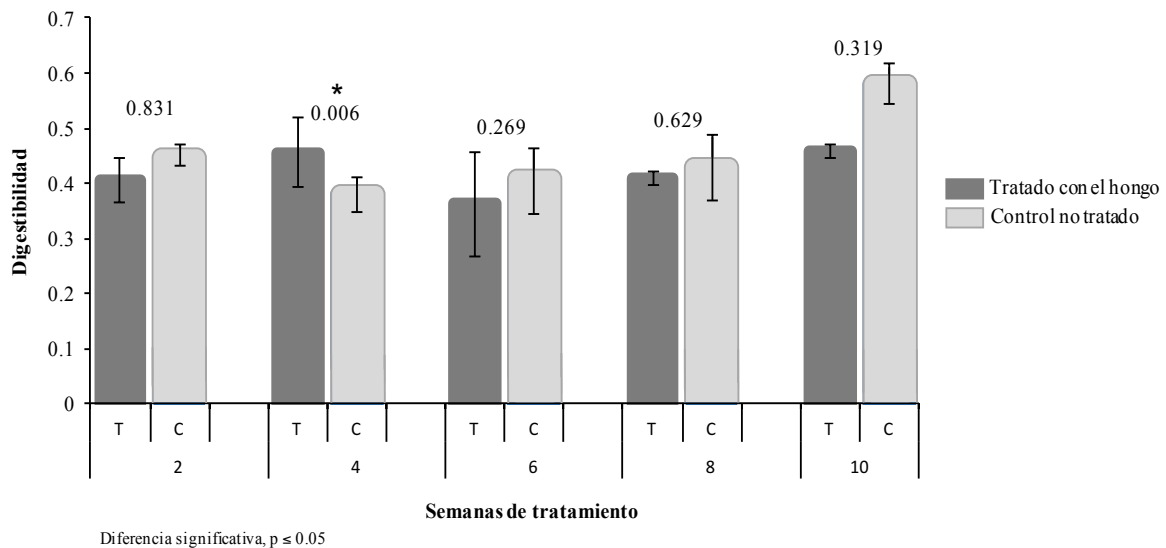


Figura 4. Digestibilidad de FDN de rastrojo de maíz tratado y no tratado con la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. (sin.=*P. brasiliense*).

Discusión

El género *Paraconiothyrium* es de descripción relativamente reciente (Verkley et al., 2004), por lo que las especies que deben considerarse dentro de este se encuentran aún en constante reacomodo, reconociéndose el carácter parafilético del género en diferentes estudios (Verkley et al., 2014; Boonmee et al., 2016; Crous et al., 2017). Las dos especies del género *Paraconiothyrium* en las que se

había reportado la actividad de LAC extracelular, *P. variabile* (Forootanfar et al, 2011; Gao et al., 2011) y *P. brasiliense* (Arredondo-Santoyo et al., 2018), deben ahora quedar asociadas como sinónimos de *Didymosphaeria variabile* y *Didymosphaeria* sp., respectivamente; ante la falta de evidencia morfológica de otras cepas, incluida la cepa CMU-196, únicamente el holotipo de *P. brasiliense* es considerado sinónimo de *Didymosphaeria rubi-ulmifolii* (Ariyawansa et al., 2014). Tomando en consideración esta nueva nomenclatura, en el caso de *D. variabile* se han reportado actividades máximas de lacasa extracelular de 512 U/L (Forootanfar et al, 2011) y 484.72 U/mL (Gao et al., 2011), utilizando medios suplementados con CuSO_4 y xilitol o salvado, vitaminas y MgSO_4 , respectivamente. Aquí se evaluó la actividad enzimática de LAC de la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. (sin.=*P. brasiliense*) en presencia de rastrojo de maíz en cultivo líquido. Nosotros documentamos previamente que la cepa CMU-196 no presenta actividad de LAC extracelular en cultivo líquido de medio PDB, pero en presencia de $150 \mu\text{M}$ de CuSO_4 dicha actividad alcanza un valor máximo de $46.8 (\pm 0.33)$ U/L hacia el quinto día de incubación (Arredondo-Santoyo et al., 2018). En el presente trabajo la actividad máxima de LAC registrada fue de $262.27 (\pm 18.38)$ U/L en medio suplementado con RM en el cuarto día de incubación. Esto es, el rastrojo incrementa en 5.6 veces la actividad de LAC en relación a la máxima actividad generada en presencia de Cu^{+2} en la cepa CMU-196. No obstante, la actividad aquí reportada es aproximadamente 50% más baja la documentada para *D. variabile* (Forootanfar et al, 2011).

Otras especies de ascomicetes reportan altos valores de lacasa extracelular en medios simples suplementados con distintos tipos de biomasa vegetal residual. Por ejemplo, en *Pestalotiopsis* sp. se reporta un valor máximo de 666.3 U/L (± 27.7) en medio suplementado con maltosa y rastrojo de arroz, el cual funciona mejor que los dos sustratos usados de manera independiente (Xiaoyu et al., 2013). Nosotros hemos documentado que la actividad de lacasa extracelular en medio basal de cepas de las especies ascomicetes *Trichoderma atroviride* (1,313.88 U/L), *Trichoderma viride* (763.88 U/L) y *Trichoderma tomentosum*

(799.53 U/L) muestran incrementos de 1,321.5%, 64%, y 47%, respectivamente, en medio suplementado con rastrojo de trigo (Cázares-García et al., 2016). Además del material vegetal, es factible incrementar la actividad de LAC extracelular de ascomicetes empleando distintos suplementos orgánicos. Así, en una cepa de *Coniothyrium* sp., género estrechamente relacionado con *Didymosphaeria*, la actividad extracelular de LAC se incrementa significativamente en medio a base de jugo de tomate (30% v/v) suplementado con el colorante fenólico azul remazol brillante R (RBBR), alcanzando un valor máximo de 3035 (± 111) U/L después de cuatro días de incubación (Junghanns et al., 2008). Aunque la cepa CMU-196 decolora eficientemente medio suplementado con RBBR (Arredondo-Santoyo et al., 2018), lo cual está asociado a la producción de lacasa, dicho colorante no representa un inductor deseable en términos económicos para un medio barato usado en biotecnología con la finalidad de producir lacasa a gran escala. Los mismos problemas de costos estarían asociados a la adición de los compuestos fenólicos empleados en los estudios de *D. variabile* previamente citados. No obstante, la combinación del medio con base en jugo de tomate y CuSO_4 como se ha probado anteriormente para *Coniothyrium* (Junghanns et al., 2008), o de salvado (Gao et al., 2011), junto con el rastrojo aquí empleado y sus combinaciones, constituyen alternativas viables y económicamente rentables para incrementar significativamente la actividad de LAC extracelular de la cepa CMU-196.

Dada la producción de lacasa extracelular de la cepa CMU-196 en presencia de rastrojo en medio líquido, se decidió realizar ensayos de FSS con el mismo sustrato, con la finalidad de evaluar tanto los cambios estructurales y bioquímicos, como la digestibilidad ruminal *in vitro* de la biomasa tratada. Las microfotografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) muestran claramente la capacidad de la cepa CMU-196 para desestructurar significativamente el tejido vascular del rastrojo de maíz, degradando la pared secundaria rica en lignina. Recientemente se han utilizado microfotografías de SEM como evidencia para mostrar los cambios estructurales ocasionados por el tratamiento de rastrojo de maíz en

ensayos FSS con cepas de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus cystidiosus* e *Irpex lacteus*, siendo el tratamiento con ésta última especie el que muestra cambios significativos en la estructura del tejido de la biomasa vegetal con respecto al control (Zuo et al., 2018). Sin embargo, mientras que en el trabajo citado se muestran cortes longitudinales del tejido de maíz, en los que es difícil visualizar el ataque a la pared celular y notar diferencias entre el tejido control y el tratado con el hongo, las microfotografías de cortes transversales mostradas en el presente trabajo dan un reflejo más adecuado de la degradación de paredes del tejido vascular de la planta. Por lo anterior, es deseable que trabajos futuros en los que se documenten cambios estructurales del rastrojo tratado con hongos mediante SEM, obtengan microfotografías de cortes transversales en lugar de vistas longitudinales del tejido.

Los estudios en los que se evalúa el mejoramiento de la digestibilidad ruminal del rastrojo de maíz tratado con hongos son relativamente escasos en relación a los que analizan trigo, y a la fecha se han analizado principalmente especies de basidiomicetes de pudrición blanca (van Kuijk et al., 2015). Se ha reportado el mejoramiento de la digestibilidad *in sacco* del rumen de ovejas del residuo de maíz obtenido del cultivo de *Pleurotus ostreatus*, en comparación con el rastrojo no proveniente de la producción de la seta (Díaz-Godínez y Sánchez, 2002). El mismo tipo de biomasa residual mejora el crecimiento de corderos en comparación con aquellos alimentados con el rastrojo control (Ramírez-Bribiesca et al., 2010). No todos los estudios muestran resultados positivos, el tratamiento de rastrojo de maíz resultante del cultivo para la producción de *Pleurotus djamor* no mejora la digestibilidad ruminal de la biomasa vegetal, aparentemente por el consumo de polisacáridos estructurales (Montañez-Valdez et al., 2015). En el mismo sentido, el tratamiento de rastrojo de maíz con cepas de las especies *Ceriporiopsis subvermispora*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* y *Pleurotus ostreatus*, no mostró ninguna mejora en la digestibilidad ruminal *in vitro* de la biomasa tratada, con respecto al control (Tuyen et al., 2013).

En el caso de la cepa CMU-196, el valor máximo de producción acumulada

de gas se presentó a las dos semanas del tratamiento de la biomasa con el hongo, siendo superior en 23 y 47% a los controles sin tratamiento fúngico WI e IR, respectivamente. El tratamiento de rastrojo de maíz en ensayo de FSS durante 40 días con *Pleurotus sajor caju* y *Pleurotus pulmonarius* presenta una acumulación de gas a las 24 h superior en 33 y 27%, respectivamente, al rastrojo control sin tratamiento fúngico (Akinfemi et al., 2009). Recientemente se ha documentado que el rastrojo de maíz tratado tanto con *Irpex lacteus* como con *P. ostreatus* incrementan significativamente la producción de gas *in vitro* de la microbiota ruminal en comparación con el rastrojo no tratado (Zuo et al., 2018). En este último trabajo, la producción de gas del rastrojo control esterilizado sin tratamiento fúngico fue de 200 mL g⁻¹ de Materia Orgánica (MO) después de 96 h de fermentación ruminal, mientras que para *P. ostreatus* fue apenas arriba del valor del control y para *I. lacteus* alrededor de 280 mL g⁻¹ de MO; aunque estos dos últimos datos fueron obtenidos como valores aproximados de la figura 1 del artículo citado, ya que no son proporcionados directamente por los autores (Zuo et al., 2018). Con el valor aproximado para *I. lacteus*, el incremento en la producción de gas con respecto al control es alrededor de 40%.

Siendo el rastrojo de trigo la biomasa más evaluada para el tratamiento fúngico con fines de alimentación ruminal, es interesante contrastar los resultados del presente trabajo con algunos estudios previos que emplean dicha biomasa. El análisis de la digestibilidad *in vitro* por parte de microorganismos del rumen del rastrojo tratado con hongos muestra resultados contrastantes. El tratamiento de rastrojo de trigo con *Phlebia brevispora* C. *subvermisporea* causa una pérdida de lignina que incrementa significativamente la digestibilidad *in vitro* del material vegetal (Arora y Sharma, 2009), aunque en este caso se utilizó microbiota fecal de búfalo y se midió la pérdida de peso de la materia seca en vez de la producción de gas, por lo que es más difícil hacer comparaciones con los otros estudios. Los tratamientos del mismo sustrato con *Pleurotus ostreatus* y *Trametes gibbosa* mejoran la digestibilidad ruminal *in vitro* de la biomasa, no obstante, la producción de gas no muestra incrementos significativos con el tratamiento fúngico en

relación al control (Jalč et al., 1996). Al analizar el tratamiento de rastrojo de trigo con *Pleurotus tuber-regium*, no se encontraron incrementos en la producción de gas en relación a la biomasa control, ni mejoras en la digestibilidad ruminal *in vitro*, debido a la pérdida de materia orgánica y el consumo de hemicelulosa por parte del hongo (Jalč et al., 1999). Al tratar rastrojo de trigo con cepas de diferentes especies fúngicas se encontró que después de siete semanas de fermentación en sustrato sólido las cepas de las especies de pudrición blanca *Ceriporiopsis subvermispora* (297.0 ml g⁻¹ de materia orgánica, MO), *Pleurotus eryngii* (257.8 ml g⁻¹ de MO) y *Lentinus edodes* (291.5 ml g⁻¹ de MO) generaban mayor producción de gas por fermentación ruminal *in vitro* que el rastrojo control (227.7 ml g⁻¹ OM) sin tratamiento fúngico (Nayan et al., 2018). Estos valores reflejan incrementos en la producción de gas por digestión ruminal *in vitro* de 30, 13, 28% para la biomasa tratada con *C. subvermispora*, *P. eryngii* y *L. edodes*, respectivamente, con respecto al control sin tratamiento fúngico.

Aunque los hongos ascomicetes a los que pertenece la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. no se consideran tan buenos degradadores de lignina como los basidiomicetes de pudrición blanca, pueden modificarla por una vías químicas alternas al uso de enzimas ligninolíticas, entre dichas vías se encuentra el denominado mecanismo Fenton (Arantes et al., 2012). Se ha propuesto que este tipo de modificación puede proporcionar mayor accesibilidad al sustrato a las enzimas hidrolíticas que degradan celulosa y hemicelulosa. Esto puede explicar el hecho de que el tratamiento de rastrojo con la cepa CMU-196 incremente la producción de gas *in vitro* sin una disminución significativa de los valores de FDN. Además, tanto los resultados de producción de gas como los de materia seca indican que el hongo deja carbohidratos y polisacáridos disponibles para la microbiota ruminal.

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. induce la producción de lacasa extracelular en presencia de rastrojo de maíz molido. Dicha actividad enzimática, posiblemente en conjunto con un mecanismo vía Fenton contribuye a la desestructuración de la pared vegetal,

mejorando la digestibilidad ruminal *in vitro* como lo indican las microfotografías de MEB y la producción de gas, respectivamente. En conjunto, los datos anteriores muestran claramente que la cepa CMU-196 genera incrementos en la digestibilidad ruminal semejantes a los reportados previamente para basidiomicetes de pudrición blanca, tanto en el tratamiento de maíz como de trigo. No obstante, es necesario realizar más ensayos que permitan optimizar dicho proceso y realizar ensayos *in vivo* que permitan conocer el efecto del tratamiento fúngico del rastrojo directamente sobre la producción animal.

Referencias

1. Abo-Donia FM, Abdel-Azim SN, Elghandour MM, Salem AZ, Buendía G, Soliman NAM. 2014. Feed intake, nutrient digestibility and ruminal fermentation activities in sheep-fed peanut hulls treated with *Trichoderma viride* or urea. *Trop. Anim. Health Prod.* 46(1): 221-228.
2. Akinfemi, A., Adu, O. A., Adebisi, O. A. 2009. Use of white rot-fungi in upgrading maize straw and, the resulting impact on chemical composition and *in vitro* digestibility. *Livestock Research for Rural Development.* 21(10): Article #162. <http://www.lrrd.org/lrrd21/10/akin21162.htm>
3. Arantes V, Jellison J, Goodell B. 2012. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94: 323-338.
4. Ariyawansa HA, Tanaka K, Thambugala KM, Phookamsak R, Tian Q, Camporesi E, Hongsanan S, Monkai J, Wanasinghe DN, Chukeatirote E, Kang JC, Xu JC, McKenzie EHC, Jones EBG, Hyde KD. 2014. A molecular phylogenetic reappraisal of the *Didymosphaeriaceae* (= *Montagnulaceae*). *Fungal Diversity.* 68:69–104.
5. Arora DS, Sharma RK. 2009. Comparative ligninolytic potential of *Phlebia* species and their role in improvement of *in vitro* digestibility of wheat straw. *J. Anim Feed Sci.* 18: 151-161.

6. Arredondo-Santoyo M, Vázquez-Garcidueñas MS, Vázquez-Marrufo G. 2018. Identification and characterization of the biotechnological potential of a wild strain of *Paraconiothyrium* sp. *Biotechnol Prog.* <https://doi.org/10.1002/btpr.2653>.
7. Boonmee, S., D'souza, M. J., Luo, Z., Pinruan, U., Tanaka, K., Su, H., Bhat, D. J., McKenzie, E. H. C., Jones, E. B. G., Taylor, J. E., Phillips, A. J., Hirayama, K., Eungwanichayapant, P. D., Hyde, K. D. 2016. *Dictyosporiaceae* fam. nov. *Fungal Diversity*. 80(1): 457-482.
8. Buranov AU, Mazza G. 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Ind. Crop Prod.* 28(3): 237-259.
9. Cázares-García, S. V., Arredondo-Santoyo, M., Vázquez-Marrufo, G., Soledad Vázquez-Garcidueñas, M., Robinson-Fuentes, V. A., & Gómez-Reyes, V. M. 2016. Typing and selection of wild strains of *Trichoderma* spp. producers of extracellular laccase. *Biotechnology Progress*. 32(3): 787-798.
10. Chang AJ, Fan J, Wen X. 2012. Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 72: 26-30.
11. Crous, P. W., Wingfield, M. J., Burgess, T. I., Hardy, G. S. J., Barber, P. A., Alvarado, P., et al. 2017. Fungal planet description sheets: 558–624. *Persoonia*. 38: 240–384.
12. Díaz-Godínez, G. and Sánchez, C. 2002. In situ digestibility and nutritive value of maize straw generated after *Pleurotus ostreatus* cultivation. *Can. J. Anim. Sci.* 82: 617–619.
13. Forootanfar H, Faramarzi MA, Shahverdi AR, Yazdi MT. 2011. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variable*. *Bioresour Technol.* 102:1808-1814.
14. Gao H, Wang Y, Zhang W, Wang W, Mu Z. 2011. Isolation, identification and application in lignin degradation of an ascomycete GHJ-4. *Afr J Biotechnol.* 10:4166-4174.

15. Grabber JH. 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci.* 45: 820-831.
16. Jalč D, Nerud F, Zitnan R, Siroka P. 1996. The effect of white-rot basidiomycetes on chemical composition and *in vitro* digestibility of wheat straw. *Folia Microbiol.* 41: 73-75.
17. Jalč D, Siroka P, Feješ J, Čerešňáková Z. 1999. Effect of three strains of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. on chemical composition and rumen fermentation of wheat straw. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45: 277-282.
18. Montañez-Valdez O.D., Avellaneda-Cevallos, J.H., Guerra-Medina, C.E., Reyes-Gutiérrez, J.A., Peña-Galeas, M.M., Casanova-Ferrín, L.M., Herrera-Herrera, R.C. 2015. Chemical composition and ruminal disappearance of maize stover treated with *Pleurotus djamor*. *Life Sci. J.* 12(2s):55-60.
19. 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. *Appl Microbiol Biot.* 60(3): 327–335.
20. Nayan N, Sonnenberg ASM, Hendriks WH, Cone JW. 2018. Screening of white-rot fungi for bioprocessing of wheat straw into ruminant feed. *J. Appl. Microbiol.* doi: 10.1111/jam.13894.
21. Ramirez-Bribiesca, J.E., Soto-Sanchez, A., Hernandez-Calva, L.M., Salinas-Chavira, J., Galaviz-Rodriguez, J.R., Cruz-Monterrosa R.G., and Vargas-Lopez, S. 2010. Influence of *Pleurotus ostreatus* spent corn straw on performance and carcass characteristics of feedlot Pelibuey lambs. *Indian J. Anim. Sci.* 80: 754-757.
22. Ravindran R, Jaiswal AK. 2016. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.* 199: 92-102.

23. Paliwal R, Rawat AP, Rawat M, Rai JPN. 2012. Bioligninolysis: recent updates for biotechnological solution. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167: 1865-1889.
24. Sarkar P, Bosneaga E, Auer M. 2009. Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. *J. Exp. Bot.* 60: 3615-3635.
25. Sanchez C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.* 27:185-194.
26. Theodorou KM, Williams AB, Dahona SM, McAllan BA, France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol.* 48 (3):185-197.
27. Tuyen DV, Phuong HN, Cone JW, Baars JJP, Sonnenberg ASM, HendriksWH. 2013. Effect of fungal treatments of fibrous agricultural by-products on chemical composition and *in vitro* rumen fermentation and methane production. *Bioresour Technol.* 129: 256–63.
28. Van Dyk JS, Pletschke Bl. 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30: 1458-1480.
29. Van Kuijk SJA, Sonnenberg ASM, Baars JJP, Hendriks WH, Cone JW. 2015. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. *Biotechnol. Adv.* 33: 191-202.
30. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 1991 74(10):3583-3597.
31. Verkley, G. J. M., Da Silva, M., Wicklow, D. T., & Crous, P. W. 2004. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Studies in Mycology.* 50: 323–335.

32. Verkley, G. J. M., Dukik, K., Renfum, R., Göker, M., & Stielow, J. B. 2014. Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in *Montagnulaceae* (Ascomycota). *Persoonia*. 32: 35-51.
33. Wilkins RJ. 2000. Forages and their role in animal systems. In Forage evaluation in ruminant nutrition. Edited by D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford and H. M. Omed. CAB International, Wallingford UK. pp. 1-14.
34. Xiaoyu, F., Huiying, C., Dongsheng, X. & Shanjing, Y. 2013. Enhancement of laccase activity by marine-derived deuteromycete *Pestalotiopsis* sp. J63 with agricultural residues and inducers. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 21(10): 1182-1189.
35. Zuo, S., Niu, D., Zheng, M., Jiang, D., Tian, P., Li, R., & Xu, C. 2018. Effect of *Irpex lacteus*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus* pretreatment of corn stover on its improvement of the *in vitro* rumen fermentation. *J Sci Food Agric*. doi: 10.1002/jsfa.8951.

VI.4 CAPÍTULO IV.

“Purificación y caracterización de la lacasa de *Didymosphaeria* sp. (sin.=*Paraconiothyrium brasiliense* sensu lato).”

Artículo de investigación concluido

Se someterá a la revista *Journal of Microbiology and Biotechnology*

Purificación y caracterización de la lacasa extracelular de *Didymosphaeria* sp. (sin.= *Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*)

Marina Arredondo-Santoyo¹, Julio Cesar Villagómez-Castro², Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas³ y Gerardo Vázquez-Marrufo^{1*}

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Col. La Palma, Tarímbaro, Michoacán CP 58262

² Div. de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, Guanajuato CP 36050

³Div. de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Ave. Rafael Carrillo esq. Dr. Salvador González Herrejón, Col. Cuauhtémoc, Morelia, Michoacán CP 58020

* Autor de correspondencia:

Dr. Gerardo Vázquez-Marrufo

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro

Col. La Palma

Tarímbaro, Michoacán CP 58262

Tel/Fax: +52 01 443 2 95 80 29

E-mail: gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx

RESUMEN

Una lacasa extracelular de la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. (sin.= *Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*) inducida con Cu^{+2} fue purificada a homegenidad en un protocolo de tres pasos a través de resinas cromatográficas; se emplearon las columnas de intercambio aniónico DEAE-Sepharosa y MonoQ HR 5/5 seguida de una cromatografía de exclusión molecular a través de una columna Superdex. La masa molecular de la enzima purificada estimada por SDS/PAGE fue de 98 kDa. La caracterización bioquímica de la lacasa purificada revela que el pH de trabajo óptimo es de 4.5 empleando el buffer de citrato a 0.1 M y que la temperatura de 60°C favorece la mayor actividad enzimática de 2251 (± 16) U/L. Se evaluó la estabilidad de la enzima después de ser incubada en el buffer citrato pH 4.5 a 60°C de manera independiente por intervalos crecientes de tiempo de 0.5h–48h mostrando que es estable hasta las 3h de incubación con una actividad máxima de 76,887 (± 493) U/L, por otro lado, también se evaluó la estabilidad al pre-incubar la enzima por 1h en un rango de temperaturas de 4°C–70°C, mostrando que la enzima pierde actividad conforme aumenta la temperatura manteniendo el 60% y 58% de la actividad máxima a 20°C y 30°C respectivamente. Los iones Mg^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} mostraron inducción de actividad enzimática a las concentraciones de 1mM, 5mM y 10mM respectivamente, en presencia de Fe^{+2} la actividad disminuyó dando un 2.46% (± 0.56) de actividad relativa, todos los inhibidores mostraron una disminución de actividad enzimática a adición del EDTA y el EGTA a 1mM en donde se obtienen valores de actividad relativa de 38.27% (± 2.49) y 52.47% (± 3.5) respectivamente. En presencia de ABTS, la K_m fue de 35.28 μM y una V_{max} de 4943 $\text{mmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ y con DMP la K_m fue de 14.11 μM y la V_{max} de 787.2 $\text{mmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ demostrando que la enzima tiene la capacidad de oxidar ambos sustratos.

Palabras clave: *Didymosphaeria* sp., lacasa, purificación, caracterización bioquímica.

Introducción

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son metaloenzimas que pertenecen a la familia de las multicobre oxidasas con una presencia ubicua en la naturaleza, ya que han sido reportadas ampliamente en plantas, insectos, bacterias y en prácticamente todas las especies de hongos examinadas (Theuerl y Buscot, 2010). Los hongos poseen lacasas intracelulares y extracelulares; mientras que las primeras participan en la síntesis de pigmentos y en la formación del cuerpo fructífero, las segundas, además de catalizar la oxidación de la lignina, participan en procesos de patogénesis, en interacciones competitivas y en la respuesta a estrés ambiental (Morozova et al., 2007). Esta diversidad funcional se debe a que exhiben altos potenciales redox y tienen baja especificidad por sustrato, por lo que actúan sobre difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, hidroxiindoles y benzenotioles (Giardiana et al., 2010). El conocimiento sobre la estructura y las propiedades 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°C y 50°C (Morozova et al., 2007). Las lacasas extracelulares presentan de 3 a 10 sitios de *N*-glicosilación y la fracción de carbohidratos consiste de cadenas ramificadas de manosa, arabinosa, xilosa, galactosa y glucosa (Vite-Vallejo *et al.* 2009) conectadas a residuos de Asn a través de moléculas de *N*-acetil-D-glucosamina. 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, la estabilidad de los centros de cobre, y a la termoestabilidad (Rodgers et al., 2009).

La versatilidad catalítica de las lacasas fúngicas ha sido aprovechada en un gran número de aplicaciones biotecnológicas que incluyen la delignificación y blanqueo de pulpa Kraft, la síntesis de biopolímeros y biocombustibles, el tratamiento de forrajes, la remoción de colorantes, la fabricación de biosensores y

en nanotecnología (Mikolasch et al., 2009; Kudanga et al., 2011), entre otros. 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 (Dhouib et al., 2005), buscando proteínas con diferente especificidad por sustrato, estabilidad y actividad, bajo diversas condiciones de pH y temperatura (Halaburgi et al., 2011).

Las lacasas extracelulares son producidas tanto por hongos basidiomicetes como ascomicetes (Baldrian 2006). Entre las especies fúngicas que presentan altos niveles de producción de lacasa extracelular se encuentran los basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* (Lettera et al., 2010), *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* (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 *Podospira anserina* (Fernández-Larrea y Stahl 1996), *Neurospora crassa* (Pöggeler 2011) y *Aspergillus niger* (Tamayo-Ramos et al., 2011). Aunque las lacasas extracelulares de los basidiomicetes presentan altos potenciales redox en comparación con las de ascomicetes (Mot y Silaghi-Dumitrescu, 2012), las enzimas dentro de este último grupo fúngico muestran particularidades de interés biotecnológico como actividad óptima en condiciones alcalinas (Sulistyaningdyah et al., 2004) o de pH neutro (Kiiskinen et al., 2002), termoestabilidad (Halaburgi et al., 2011), así como osmotolerancia (Mtibaà et al. 2017). Esto hace importante la búsqueda continua de ascomicetes con actividad de lacasa extracelular y la purificación y caracterización de la enzima secretada.

En la descripción original del género de hongos ascomicetos *Paraconiothyrium* se incluía a *P. brasiliense* (Verkley et al., 2004) y posteriormente se incorporó a *P. variable* (Damm et al., 2008), ambas como especies de nueva

descripción. Sin embargo, posteriormente se reubicó a *P. variable* como sinónimo de *Didymosphaeria variable* y al holotipo de *P. brasiliense* como *Didymosphaeria rubi-ulmifolii*, proponiendo que aquellas cepas descritas inicialmente como *P. brasiliense* de las que no se tenga información morfológica sean consideradas como *Didymosphaeria* sp. (Ariyawansa et al., 2014). Así, los reportes de actividad de lacasa extracelular en las únicas dos especies del género *Paraconiothyrium*, deben de ser ahora considerados como reportes dentro de *Didymosphaeria*. En *D. variable* (sin.=*P. variable sensu lato*) se ha reportado la actividad de lacasa extracelular (Foorotanfar et al., 2011; Gao et al., 2011) y la enzima purificada mostró un PM de 84 kDa, así como un pH y temperatura óptimos de 4.8 y 50 °C, respectivamente (Foorotanfar et al., 2011). Dicha lacasa presenta una gran capacidad para la remoción de derivados clorofenólicos (Foorotanfar et al., 2012) y decoloración de tintes sintéticos (Aghaie-Khouzani et al., 2012; Ashrafi et al., 2013). Recientemente, nuestro grupo de trabajo documentó que *Didymosphaeria* sp. (sin.=*P. brasiliense sensu lato*) no muestra actividad basal de lacasa extracelular en medio completo, pero es inducida en presencia de Cu^{+2} (Arredondo-Santoyo et al., 2018). En el presente trabajo se purificó la lacasa de esta cepa silvestre y se realizó una caracterización de la enzima purificada, determinando pH y temperatura óptimos, termoestabilidad, efecto de iones divalentes y algunos inhibidores. Se determinaron las constantes cinéticas en presencia de diferentes sustratos. Se contrastan las características de la enzima con las reportadas previamente para *D. variable* y otras especies de hongos ascomicetos.

Materiales y métodos

Cepa de estudio

Se empleó la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. (sin.=*Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*) depositada en el Cepario Michoacano Universitario (CMU) del Laboratorio de Biotecnología y Conservación de Microorganismos de la

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Arredondo-Santoyo et al., 2018).

Medios de cultivo y obtención de inóculos

El medio Agar Papa y Dextrosa (PDA, Difco™ BD, Diagnostics) se empleó para el cultivo y mantenimiento del micelio vegetativo y la obtención de inóculos. Los inóculos se obtuvieron con un sacabocados de 6 mm de diámetro del borde de colonias en fase logarítmica de crecimiento incubadas en medio PDA a 24 °C.

Cultivo en medio líquido

Los cultivos líquidos se emplearon para la obtención del homogenado enzimático extracelular. Matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio PDB se inocularon con 6 inóculos cilíndricos de 6 mm de diámetro obtenidos de la manera previamente descrita. El medio así inoculado se incubó a 24 °C y 120 rpm de agitación. La inducción de la actividad enzimática de lacasa se realizó mediante la adición de 150 μ M de CuSO_4 (Arredondo-Santoyo et al., 2018).

Preparación de la muestra

Se empleó una muestra de 50 mL de medio extracelular de un cultivo líquido obtenido de la manera anteriormente descrita, en condiciones de máxima actividad de lacasa inducida con CuSO_4 (Arredondo-Santoyo et al. 2018). El cultivo se filtró inicialmente a través de papel filtro Whatman #1 y posteriormente a través de una membrana Millipore® de 0.45 μ m, el filtrado obtenido se concentró mediante liofilización y la pastilla se re-suspendió en 4 mL de regulador Tris-HCl 25 mM pH 7.2. Para eliminar metabolitos de bajo peso molecular y sales, el sobrenadante se eluyó en una columna de Bio-Gel P-6 (1.0 cm X 10 cm) regulada con buffer Tris-HCl 25mM pH 7.2. Esta muestra libre de células y concentrada fue el material de partida para la purificación secuencial por resinas cromatográficas.

Purificación de lacasa

Los pasos de purificación se realizaron a 4 °C utilizando el amortiguador Tris-HCl 25 mM pH 7.2 en todas las columnas cromatográficas. La muestra concentrada fue cargada en una columna DEAE-Sepharose (Bio-Rad), eluyendo mediante la aplicación de un gradiente de NaCl de 0–1 M. A las fracciones de 2 mL colectadas se les determinó la actividad enzimática de lacasa y se cuantificó el contenido de proteína (D.O. 280). Las fracciones con actividad se concentraron por liofilización, resuspendiéndose en 4 mL del regulador empleado. Posteriormente la muestra se aplicó en una columna Mono Q HR 5/5 (Bio-Rad) eluyendo con un gradiente de NaCl 0–1 M, colectando fracciones de 2.5 mL. Nuevamente se concentraron las fracciones con actividad y se resuspendieron en el regulador para su elución en la columna de exclusión molecular Superdex (1.35 X 1 cm, 106.4 mL), colectándose fracciones de 1 mL. De cada paso de purificación se tomaron alícuotas de 25 µL para analizar mediante electroforesis SDS-PAGE.

Determinación de actividad de lacasa

La actividad extracelular de lacasa se determinó midiendo la oxidación del ABTS a 420 nm (Nagai et al., 2002). La mezcla de reacción estaba compuesta por 50 mM de buffer Macllvaine pH 4.0, 1mM de 2, 2'- azino-bis (3- etilbenzotiazolina- 6- sulfonato (ABTS) y 1 µL de muestra directa de cada fracción colectada. Las muestras se incubaron a 30 °C durante 20 min y la reacción se detuvo añadiendo ácido tricloroacético 0.5% (v/v) en solución acuosa. La formación del radical catiónico se determinó midiendo el incremento en la absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$). Los valores de actividad fueron expresados en unidades de actividad enzimática (U) la cual expresa la cantidad de sustrato convertido por unidad de tiempo, tomando en cuenta un volumen de reacción de 1 mL en todos los casos.

Cuantificación de proteína

La concentración de proteína fue estimada usando el método de Bradford (Simpson, 2003), utilizando albumina sérica bovina como estándar. En los pasos de elución por cromatografía la proteína fue monitoreada midiendo A_{280} .

pH y temperatura óptimos

El pH y la temperatura óptima se determinaron realizando ensayos enzimáticos en diferentes niveles de pH (3, 4, 4.5, 5, 5.5 y 7) y temperatura (30 a 70 °C), de manera independiente. El pH óptimo se determinó usando los buffers de citrato, fosfato y McIlvaine en los valores de pH indicados, todos a una concentración 0.1 M. Una vez determinado el regulador y pH de actividad óptima, dichas condiciones se utilizaron para realizar los ensayos de actividad en el rango de temperaturas señalado.

Estabilidad térmica

La termoestabilidad se determinó incubando la enzima en el buffer que favoreció la mayor actividad a la mejor temperatura durante diferentes periodos de tiempo (0.5–48 horas) seguida de la determinación de actividad enzimática. También se evaluó la estabilidad de la lacasa purificada a varias temperaturas pre-incubando la enzima purificada en el mejor buffer en un rango de 4°C a 70°C durante 1 hora.

Efecto de iones metálicos e inhibidores de la actividad enzimática

El efecto de los iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Fe^{2+} sobre la actividad de la lacasa purificada se analizó incubando la enzima en las condiciones de pH y temperatura óptimas en presencia de dichos cationes y de los inhibidores ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), NaN_3 y 2-mercapto etanol (BME) en concentraciones de 2.5 mM, 5 mM y 10 mM.

Determinación de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten (V_{max} y K_m) de la oxidación de 2,2'-

azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) y 2,6-dimetoxifenol (DMP) se determinaran empleando el software PRISMA 7 mediante la regresión no lineal con concentraciones de sustrato entre 0–2 mM.

PAGE-SDS

El patrón electroforético de la proteína purificada, el peso molecular y la homogeneidad de cada etapa de purificación se analizó a través de un gel PAGE-SDS al 10% revelado por tinción de plata, empleando el marcador de peso molecular pre-teñido Kaleidoscope (Bio-Rad #161-0324, USA).

Resultados

Purificación de la enzima

La enzima se purificó a homogeneidad en un protocolo de tres pasos; en el panel A de la figura 1 se presenta el perfil de elución de las fracciones obtenidas de la cromatografía en DEAE. Se distinguen dos picos de actividad correspondientes a las fracciones 25D (53.9 U/L) y 31D (16.93 U/L) con valores de proteína (A_{280}) de 0.16 y 0.30 respectivamente, eluidos a una concentración de NaCl de 0.4 M y 0.65 M. Ambas fracciones se concentraron y se aplicaron de forma independiente en una columna de intercambio aniónico de alta precisión Mono Q HR 5/5. El panel B de la figura 1 muestra el perfil de elución correspondiente a la fracción 25D, en el que distingue un pico máximo de actividad en la fracción 24Q de 62.39 U/L con un valor de proteína a A_{280} de 0.23 obtenido con una concentración de 0.37M de NaCl. El perfil de elución correspondiente a la fracción 31D en la columna Mono Q HR 5/5 muestra una actividad máxima en la fracción 22Q de 21.44 U/L y proteína a A_{280} de 0.11 en una concentración de 0.09 M de NaCl (figura 1 panel C). En este paso se co-purificó una proteína con la capacidad de oxidar el ABTS pero que no corresponde a la lacasa de nuestro interés, ya que el peso molecular es de 65 kDa, mas bajo que el valor esperado (figura 2, carril 4). Finalmente, la fracción 24Q fue eluida a través de una cromatografía de exclusión molecular en la resina

Superdex. La actividad de lacasa se recuperó en un único pico de actividad enzimática en la fracción 76S de 9.4 U/mL y una proteína de 0.01 medida a A_{280} (figura 1, panel C).

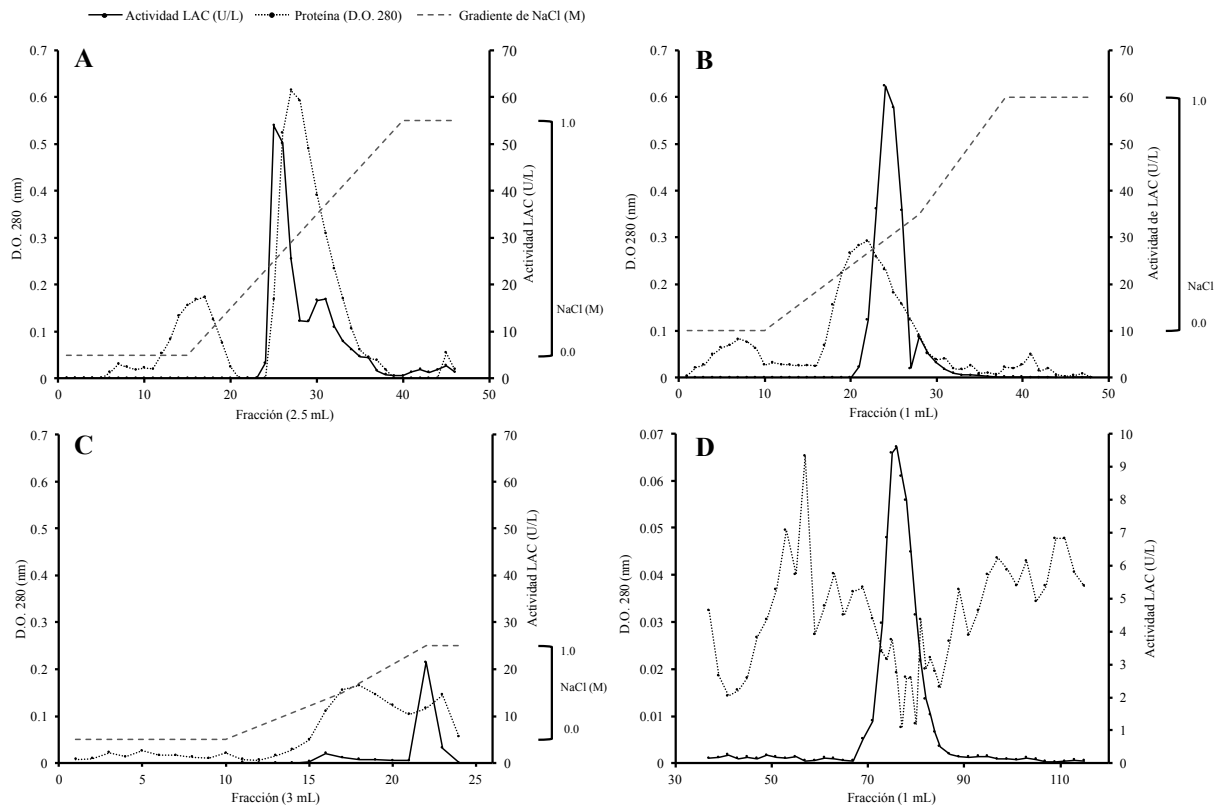


Figura 1. Cromatogramas de los pasos de purificación de la lacasa extracelular de *Didymosphaeria* sp. (sin.= *Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*). Panel A; perfil de elución de la muestra inicial en la columna DEAE Sepharose (Bio-Rad), volumen de 10 mL, Panel B; perfil de elución de la fracción 25D en la columna Mono Q HR 5/5, Panel C; perfil de elución de la fracción 31D en la columna Mono Q HR 5/5, volumen de 3.92 mL, Panel D; perfil de elución de la fracción 24Q Superdex de 1.35 cm X 1 cm, volumen de 106.4 mL. Todas las columnas fueron equilibradas con amortiguador Tris-HCL 25mM pH 7.2.

Las fracciones correspondientes a los máximos picos de actividad fueron concentradas de manera independiente y corridas en electroforesis PAGE-SDS (figura 2). En el carril 1 se identifica el homogenado proteico inicial resultante del paso de limpieza y desalado a través de la columna Bio-Gel P-6. En esta muestra se distinguen de siete a ocho proteínas de distintos tamaños moleculares, que van desde los 32 kDa hasta los 132 kDa. En el carril 2 se muestra la fracción

activa 25D recuperada de la resina DEAE Sepharose, en al que pueden distinguirse de tres a cuatro bandas cuyas masas moleculares son 98 kDa, 78 kDa y 57 kDa. El patrón electroforético de la fracción activa 24Q derivada del paso de la muestra 25D a través de la resina Mono Q HR 5/5 se muestra en la figura 2 carril 3; en este paso se optimiza la separación de las proteínas recuperadas en DEAE, identificándose tres proteínas con masas moleculares de 98 kDa, 78 kDa y 57 kDa enriqueciendo la identificación de otra proteína de 42 kDa. En el carril cuatro se muestra la purificación de una enzima eluida en la resina Mono Q HR 5/5, con actividad oxidativa proveniente de la fracción activa 31Q que presenta una masa molecular de 65 kDa. Finalmente, la lacasa de interés fue purificada a través de la resina Superdex, en el carril cinco se identifica esta enzima en una sola banda de masa molecular calculada de 98 kDa.

Durante el proceso de purificación se determinaron varios parámetros, tales como proteína y actividad enzimática total así como la actividad específica, porcentaje de rendimiento y veces de purificación (Tabla 1). La etapa de purificación más eficiente fue la aplicación en la cromatografía de intercambio aniónico DEAE-Sepharosa con rendimiento de recuperación y actividad específica de 44.6% y 1.05 U/mg, respectivamente. La enzima se purificó hasta la homogeneidad con un rendimiento del 4.2% y una actividad específica de 3.87 U/mg.

Tabla 1. Resumen de purificación de lacasa de de la lacasa extracelular de *Didymosphaeria* sp. (sin.= *Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*).

Pasos de purificación	Actividad total (μmol/min)	Proteína total (mg)	Actividad específica (μmol/min/mg)	Rendimiento (%)	Purificación (Veces)
Bio-Gel P-6	554.58	1758.90	0.315	100	1
DEAE-Sepharosa	247.79	343.02	1.05	44.68	3.33
Mono Q	87.28	57.27	1.52	15.73	4.83
Superdex	23.65	6.1	3.87	4.26	12.29

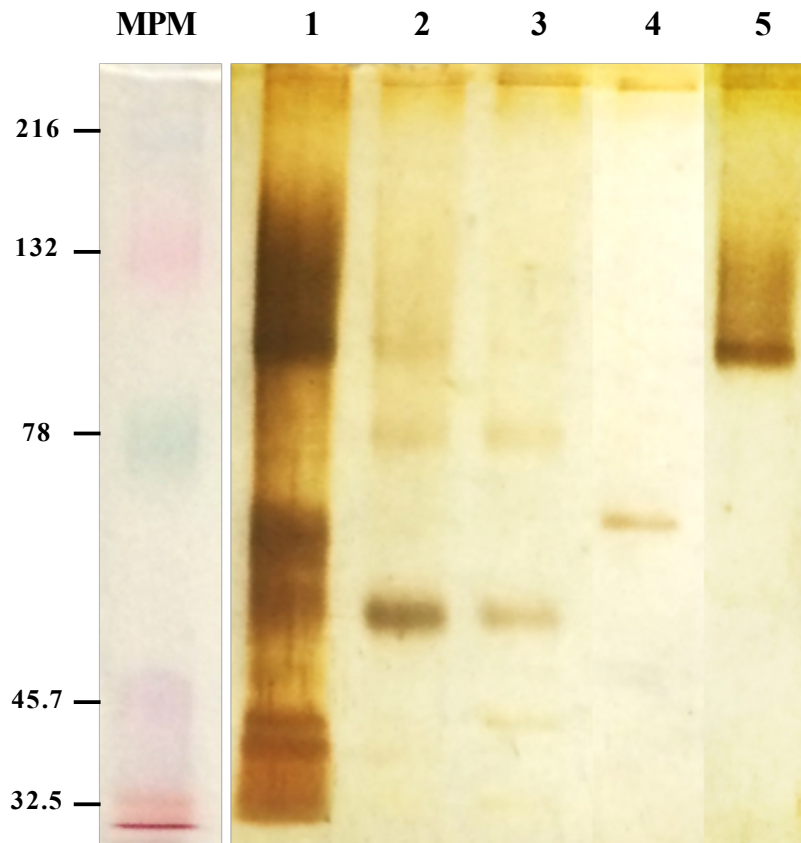


Figura 2. Perfil electroforético de los pasos de purificación de la lacasa extracelular de *Didymosphaeria* sp. (sin.= *Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*). Gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) al 10% teñido con nitrato de plata. Carril 1; muestra inicial Bio-Gel P-6, Carril 2; fracción activa del paso por DEAE-Sepharosa, Carril 3; fracción activa del paso por Mono Q HR 5/5, Carril 4; enzima purificada en Mono Q HR 5/5, Carril 5; lacasa purificada a través de Superdex. Marcador de peso molecular, Precision Plus Protein Kaleidoscope (Bio-Rad).

Caracterización bioquímica de la lacasa purificada de Didymosphaeria sp.

Efectos de pH y temperatura en la actividad

Una vez purificada la enzima se realizó una caracterización enzimática progresiva, como primer análisis se determinó el pH y amortiguador óptimos. Aunque la lacasa purificada estaba activa dentro del rango de pH de 3–5.5, la actividad fue abatida a pH de 7 con los 3 reguladores empleados. Los valores de actividad fueron 88.6 (± 23) U/L, 193.0 (± 23) U/L y 546.1 (± 3.8) U/L para los buffers McIlvaine, citrato y acetato, respectivamente (figura 3, panel A). La máxima actividad enzimática se observó empleando el buffer de citrato a pH 4.5, con un valor de 1404 (± 21) U/L

(Fig. 3, Panel A). El mejor regulador a pH 3 fue el McIlvaine, generando una actividad de 1265 (± 36) U/L, no así para los demás valores de pH donde se obtuvieron bajos niveles de actividad.

La determinación de la temperatura óptima de actividad enzimática esta representada en figura 3 (panel B), en la cual se puede notar que conforme aumenta la temperatura e incrementa la capacidad catalítica de la enzima, yendo de 1044 (± 26) U/L a 24 °C, hasta 2251 (± 16) U/L a 60 °C, siendo esta última la temperatura óptima de trabajo. Al elevar la 70 °C la actividad decae a 411(± 69) U/L.

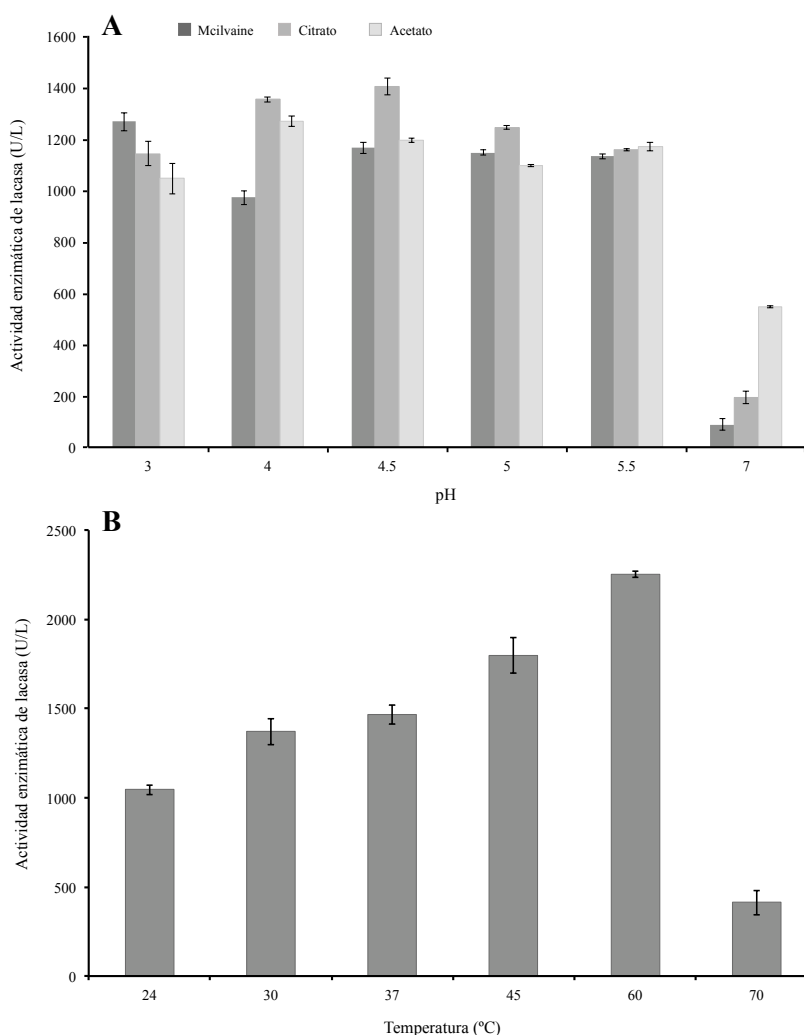


Figura 3. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de lacasa purificada de *Didymosphaeria* sp. (sin.= *Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*). Panel A; actividad de lacasa en distintos reguladores en un rango de pH de 3 a 7, Panel B; efecto de la temperatura (24°C - 70°C).

Estabilidad

Como se especificó con anterioridad, la estabilidad térmica se determinó por dos metodologías; por un lado, se incubó a la enzima en buffer de citrato pH 4.5 a 60 °C a durante distintos tiempos (figura 4, panel A), observando que entre 0.5–3 h la actividad incrementa progresivamente de 4258 (± 1495) U/L a 76887 (± 493) U/L conforme aumenta el tiempo de incubación, siendo esta última la máxima actividad registrada. Después de 3 h la estabilidad de la enzima disminuye gradualmente desde 63111 (± 801) U/L a las 6 h, hasta 7398 (± 529) U/L a las 48 h.

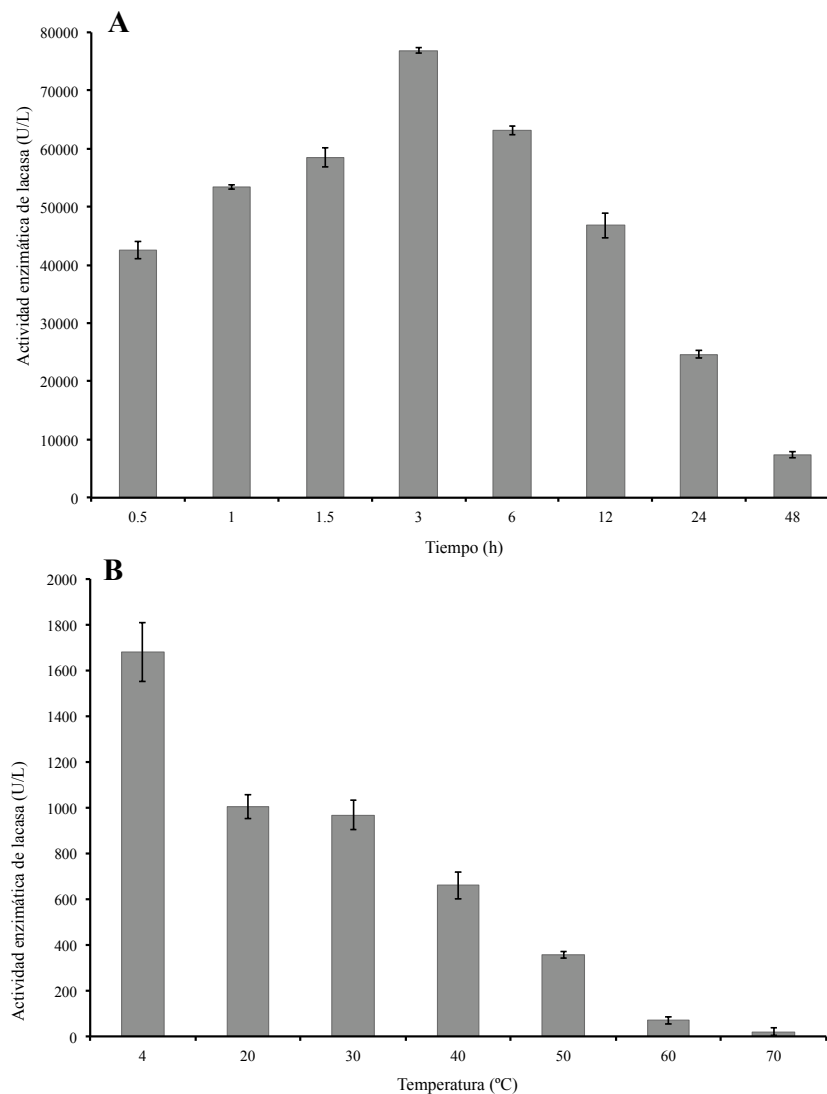


Figura 4. Estabilidad termica de la lacasa de *Didymosphaeria* sp. (sin.= *Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*). Panel A; estabilidad a 60°C por diferentes periodos de tiempo (0.5-48 h), Panel B; estabilidad pre-incubando la enzima por 1h a diferentes temperaturas (4°C - 70°C).

La estabilidad enzimática también se evaluó incubando la enzima por 1 h en buffer de citrato a pH 4.5 entre los 4 °C y los 70 °C (figura 4, panel B). A 4 °C la enzima se mantiene estable, con una actividad máxima de 1679 (± 129) U/L, mientras que a 20 °C y 30 °C se conserva el 60% y 58% de dicha actividad, respectivamente. A temperaturas más altas, la actividad decae de 660 (± 59) U/L a 40 °C hasta 19 (± 7.5) U/L a 70°C.

Efectos de iones metálicos e inhibidores típicos sobre la actividad de lacasa

Los iones Mg^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} mostraron inducción de actividad enzimática a las concentraciones de 1, 5 y 10 mM, respectivamente, mientras que el Fe^{+2} inhibió significativamente la actividad. El resto de cationes evaluados no mostraron diferencia significativa con respecto al control, todos los inhibidores mostraron una disminución significativa de la actividad enzimática a excepción del EDTA (38%) y el EGTA (52%) que a concentración de 1 mM generan valores de 890 (± 57) U/L y 1221 (± 83) U/L, respectivamente (Fig. 5).

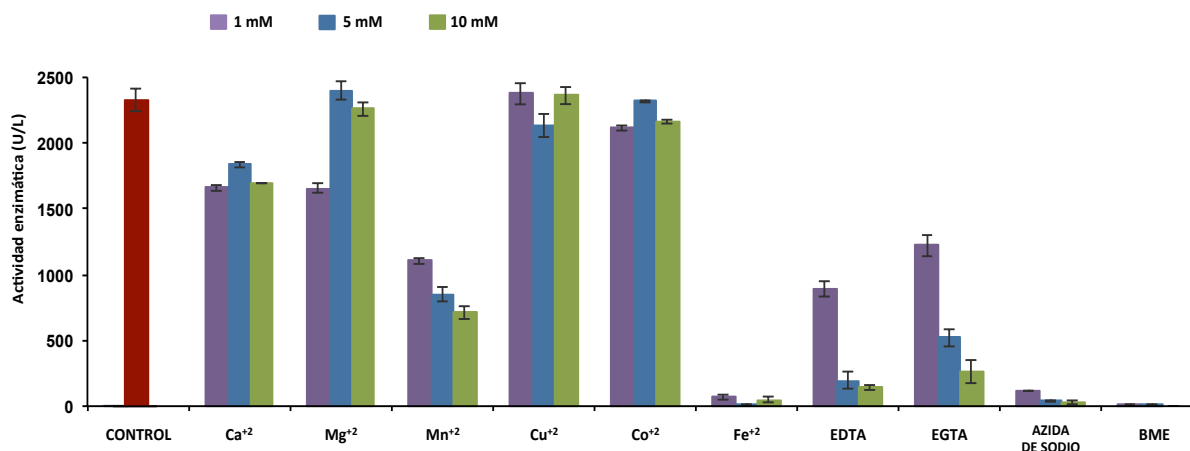


Figura 5. Efecto de cationes divalentes e inhibidores sobre la actividad de la lacasa de *Didymosphaeria* sp. (sin.= *Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*).

Los efectos de los iones y los inhibidores se resumen en las tablas 2 y 3, respectivamente. Como se muestra en la tabla 2, la adición de 5 mM de Mg^{+2} , 1mM y 10 mM de Cu^{+2} induce la actividad enzimática con porcentajes de actividad relativa de 103.14% (± 2.9), 102.08% (± 3.5) y 101.52% (± 2.8)

respectivamente. En la mayoría de los casos la actividad enzimática no se abate, manteniendo valores por arriba del 50%, como el caso de Co^{+2} , Mg^{+2} y Ca^{+2} , cuyos porcentajes de actividad relativa se encuentra en 94.9% (± 4.6), 90.5% (± 16.9) y 74.3% (± 4.1), respectivamente, en los tres valores de concentración probados. La incorporación de Mn^{+2} inhibe parcialmente la actividad conforme se aumenta la concentración de 1 a 5 y 10 mM en 47.44% (± 0.9), 36.56% (± 2.3) y 30.53% (± 2.0). El Fe^{+2} fue el único ion que inhibió la actividad enzimática en las tres concentraciones evaluadas, bajándola hasta un 1.9 % (± 0.99) del control.

Tabla 2. Efecto de iones divalentes en la actividad de la lacasa de *Didymosphaeria* sp. (sin.= *Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*).

Metal ion	Actividad relativa de lacasa (%)		
	1 mM	5 mM	10 mM
Ca^{+2}	71.30 \pm 1.7	79.02 \pm 1.0	72.84 \pm 0.1
Mg^{+2}	71.26 \pm 1.6	103.14 \pm 2.9	97.10 \pm 2.4
Mn^{+2}	47.44 \pm 0.9	36.56 \pm 2.3	30.53 \pm 2.0
Cu^{+2}	102.08 \pm 3.5	91.69 \pm 4.0	101.52 \pm 2.8
Co^{+2}	90.82 \pm 0.7	99.64 \pm 0.3	92.98 \pm 0.6
Fe^{+2}	2.86 \pm 0.7	0.39 \pm 0.3	2.06 \pm 1.1

La enzima purificada fue fuertemente inhibida por el 2-mercaptoetanol en las tres concentraciones probadas, llevando la actividad relativa a 0.3% (± 0.2) de la máxima, seguida de la azida de sodio con 2.54% (± 2.0) en promedio de las tres concentraciones probadas. El EDTA también inhibió la actividad enzimática dando un valor 38.27% (± 2.49) el cual disminuyó cuando aumentó la concentración analizada al igual que en el caso del EDTA aunque los porcentajes son superiores yendo de 52.47% (± 3.5), 22.41 (± 2.8) y 11.00 (± 3.7) para las concentraciones de 1 mM, 5 mM y 10 mM, respectivamente.

Tabla 3. Efecto de típicos inhibidores de la actividad de lacasa de *Didymosphaeria* sp. (sin.= *Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*).

Sustrato	Actividad enzimática de lacasa (U/L)		
	1 mM	5 mM	10 mM
EDTA	38.27 ± 2.4	8.35 ± 2.6	6.20 ± 0.9
EGTA	52.47 ± 3.5	22.41 ± 2.8	11.00 ± 3.7
Azida de sodio	4.88 ± 0.0	1.69 ± 0.2	1.06 ± 0.7
2-mercaptoetanol	0.51 ± 0.2	0.39 ± 0.2	0.0 ± 0.0

Constantes cinéticas de la lacasa purificada

Los valores de los parámetros cinéticos de la lacasa purificada obtenidos usando diferentes sustratos se resumen en la Tabla 4. En presencia de ABTS, la K_m calculada fue de 35.28 μM , con una V_{max} de 4943 $\text{mmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, demostraron una capacidad de oxidación eficiente de la lacasa hacia este sustrato. Con DMP la K_m calculada fue de 14.11 μM y la V_{max} de 787.2 $\text{mmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ mostrando una menor afinidad y velocidad de reacción con respecto al ABTS.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la lacasa de *Didymosphaeria* sp. (sin.= *Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*).

Parámetro	Sustrato	
	ABTS	DMP
Longitud de onda (nm)	420	468
Coefficiente de extinción molar ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	36 000	49 600
pH	4.5	4.5
K_m (μM)	35.28	14.11
V_{max} ($\text{mmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	4943	787.2

Discusión

En el presente trabajo se purificó y caracterizó a la lacasa extracelular de *Didymosphaeria* sp. (sin.= *Paraconiothyrium brasiliense sensu lato*). Dentro del género, se ha purificado y caracterizado a la enzima de *Didymosphaeria variabile* (sin.=*Paraconiothyrium variabile*) (Forootanfar et al., 2011), la cual muestra diferencias en algunos parámetros con la proteína aquí caracterizada. La purificación y caracterización de lacasas extracelulares de ascomicetes se ha incrementado considerablemente en los últimos años, y las reconstrucciones filogenéticas muestran una clara separación entre las lacasas extracelulares de este grupo y aquellas de basidiomicetes (Hoegger et al., 2006; Cázares-García et al., 2013). Por lo anterior, los resultados del presente trabajo se comparan con reportes previos exclusivamente de lacasas caracterizadas de ascomicetes.

El masa molecular estimada para la lacasa de *D. variabile* es de 84 kDa (Forootanfar et al., 2011), mientras que para la enzima aquí caracterizada es de 98 kDa. La masa molecular de las lacasas extracelulares de ascomicetes muestra una gran variación, siendo la de menor tamaño reportada a la fecha la de *Leptosphaerulina chartarum*, con 38 kDa (Sajben-Nagy et al., 2014). Una gran mayoría de las lacasas extracelulares caracterizadas de ascomicetes se encuentran entre los 60 y los 70 kDa, incluyendo las de *Leptographium qinlingensis* con 61.0 kDa (Hu et al., 2014), de *Myrothecium verrucaria* con 62 kDa (Sulistyaningdyah et al., 2004), de *Chalara* (sin. *Thielaviopsis*) *paradoxa* con 67 kDa (Robles et al., 2002), de *Leptosphaerulina* sp. con 67.7 kDa (Copete et al., 2015), de *Lamprospora wrightii* con 68 kDa (Mueangtoom et al., 2010), y para *Magnaporthe grisea* (Iyer y Chattoo, 2003) y *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen et al., 2002) el tamaño estimado es de 70 kDa. Arriba de ese tamaño, para *Chaetomium thermophilum* se documenta un tamaño de 77 kDa (Chefetz et al., 1998).

La mayoría de los estudios determinan la masa molecular relativa con base en el tamaño observado en geles PAGE-SDS, pero en algunos casos el cálculo de la masa molecular con métodos alternativos permite una determinación más

precisa de dicho parámetro. Por ejemplo, la masa molecular de la lacasa de *Mauginiella* sp. es de 67 kDa determinada por PAGE-SDS pero de 63.3 kDa mediante espectrometría de masas, correspondiente a ocho isoformas (Palonen et al., 2003). La proteína recombinante de *Botrytis aclada* expresada en *Pichia pastoris* tiene una masa molecular de 100 kDa y una vez deglicosilada es de 73 kDa, mientras que la secuencia de aminoácidos obtenida bioinformáticamente es de 61.5 kDa, por lo que los autores concluyen que el PAGE-SDS sobreestima la masa molecular en 18%, aproximadamente (Kittl et al., 2012).

Como en el ejemplo anterior de *B. aclada*, varios estudios reportan la masa molecular de la lacasa nativa y deglicosilasa, y en algunas especies se ha documentado que la enzima activa es un complejo de dos o más cadenas polipeptídicas. Dos lacasas extracelulares parcialmente purificadas de distintas cepas de *Aureobasidium pullulans* mostraron masas moleculares superiores a los 100 kDa, una de las cuales al ser tratada con Endo H reduce su tamaño alrededor de 60-70 kDa mientras que la otra no reduce significativamente su tamaño después de la deglicosilación (Rich et al., 2013). En el fitopatógeno *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, la lacasa glicosilada muestra un masa molecular de 70 kDa y la enzima desnaturalizada y deglicosilada de 60 kDa (Edens et al., 1999), aunque aparentemente la enzima activa es un homodímero de 190 kDa. En el caso de *Phoma* sp. la masa molecular es de 75.6 kDa, aunque la enzima activa parece ser un dímero de ~150 kDa cuya dimerización depende del pH y se da en un rango de 5.0 a 8.0. (Junghanns et al., 2009).

El presente trabajo encuentra que la diferencia de masa molecular entre la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. aquí analizada y *D. variabile* previamente reportada es de 14 kDa. Dentro de los ascomicetes se han reportado diferencias significativas en la masa molecular de lacasas extracelulares entre especies del mismo género o aun entre cepas de la misma especie. Por ejemplo, en *Cladosporium cladosporioides* se han reportado tamaños de lacasa extracelular de 50 (Aslam et al., 2012) y 71.2 kDa (Halaburgi et al., 2011), mientras que en *Cladosporium tenuissimum* se estima en 48 kDa (Dhakar y Pandey 2016), aunque

en este último caso la estimación se realizó sobre un extracto crudo. En *Fusarium proliferatum* se ha reportado una masa molecular de 54 kDa de dos isoenzimas con pIs de 5.17 (Lac1) y 5.07 (Lac 2) (Hernández-Fernaud et al., 2006), mientras que en *Fusarium solani* la enzima extracelular caracterizada presenta un tamaño de 72 kDa (Wu et al., 2010). Muy probablemente el principal factor asociado a la variación inter e intra-específica en la masa molecular de las lacasas extracelulares reportadas en ascomicetes, se deba a que en los diferentes estudios se estén analizando isoenzimas y no proteínas provenientes de genes homólogos. El hecho de que diferentes grupos taxonómicos de ascomicetes poseen múltiples genes de lacasa extracelular, los cuales presentan diferencias en la regulación transcripcional de acuerdo a la presencia de inductores y condiciones de cultivo (Cañero y Roncero 2008; Tamayo-Ramos et al., 2011; Solé et al., 2012; Xie et al., 2014), apoya dicha interpretación.

Todo lo anterior muestra que las dos lacasas extracelulares de *Didymosphaeria* hasta ahora caracterizadas se encuentran entre las de mayor tamaño reportadas para ascomicetes, particularmente la de la cepa CMU-196 aquí analizada, con una masa molecular de 98 kDa. A futuro es interesante realizar el cálculo del tamaño de la enzima aquí caracterizada después del tratamiento con Endo H, con la finalidad de conocer qué porcentaje de la masa molecular es aportada por la glicosilación. Por otra parte, una de las principales razones las diferencias en las masas moleculares entre las lacasas de los ascomicetes previamente citadas se debe a que cada proteína se ha purificado de distintas condiciones de incubación y/o inducción, por lo que seguramente se trata de isoenzimas. Por lo anterior, es necesario un estudio que compare tanto los genes como las enzimas caracterizadas, con el objetivo de poder definir diferencias específicas entre proteínas provenientes de genes homólogos. Este estudio permitiría tener un mejor conocimiento de la evolución estructural y funcional de las lacasas extracelulares un ascomicetes, al mismo tiempo que proporcionaría información valiosa para el diseño mediante ingeniería genética de lacasas para aplicaciones biotecnológicas específicas.

La temperatura óptima de la lacasa de *D. variabile* fue de 50 °C (Forootanfar et al., 2011) y en el caso de la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp. fue de 60 °C, mientras que el pH óptimo fue de 4.8 (Forootanfar et al., 2011) y 4.5, respectivamente. En relación a la temperatura óptima de trabajo, las lacasas extracelulares de ascomicetes presentan condiciones muy variadas. Entre las enzimas menos termoresistentes se encuentran las lacasas de *Chalara* (sin. *Thielaviopsis*) *paradoxa* (Robles et al., 2002) y *Magnaporthe grisea*, con una temperatura óptima de 30 °C (Iyer y Chattoo, 2003). En el siguiente nivel se encuentran las enzimas de *Leptosphaerulina chartarum* (Sajben-Nagy et al., 2014) y *Cladosporium cladosporioides* con una temperatura óptima de 40 °C (Aslam et al., 2012), aunque en otro estudio la enzima de esta especie muestra niveles de actividad similares entre los 40 y los 70 °C (Halaburgi et al., 2011). Una de las dos lacasas extracelulares caracterizadas de *Aureobasidium pullulans* presentó una temperatura óptima de 35–45 °C (Rich et al., 2013) y para *Leptographium qinlingensis* la enzima mostró también el óptimo en ésta última condición (Hu et al., 2014). En el siguiente nivel, de enzimas que ya pueden ser consideradas como termoresistentes incluida la de la cepa CMU-196, se encuentran las lacasas de *Botrytis cinerea* (Slomczynski et al., 1995), *Fusarium proliferatum* (Hernández-Fernaud et al., 2006), *Chaetomium thermophilium* (Chefetz et al., 1998) y la otra enzima caracterizada de *Aureobasidium pullulans* (Rich et al., 2013), con una temperatura óptima de 60 °C. Finalmente, en el último grupo se encontrarían las lacasas extracelulares de ascomicetes con resistencia térmica excepcional, incluyendo las enzimas de *Fusarium solani* (Wu et al., 2010), *Myrothecium verrucaria* (Sulistyaningdyah et al., 2004) *Phoma* sp. (Junghanns et al., 2009) y *M. albomyces* (Kiiskinen et al., 2002), con un valor óptimo de actividad a 70°C.

En general, las lacasas de ascomicetes muestran un pH óptimo ácido, que varía dependiendo del sustrato empleado en la caracterización. Entre las enzimas que trabajan mejor en ambientes más ácidos se encuentra la lacasa de *Mauginiella* sp. con un pH óptimo entre 2.4 con ABTS y de 3.5 con DMP (Palonen et al., 2003). En el caso de *Leptosphaerulina* sp. la lacasa mayoritaria en

condiciones de inducción muestra un pH óptimo de 3 cuando se utiliza ABTS como sustrato pero dos picos en 3 y 6 cuando el sustrato es el DMP (Copete et al., 2015). La lacasa de *Botrytis cinerea* tiene un pH óptimo de 3.5 con DMP (Slomczynski et al. 1995), y las caracterizadas de *Fusarium solani* (Wu et al., 2010) y *Fusarium proliferatum* (Hernández-Fernaud et al., 2006) muestran valores de pH óptimos similares empleando ABTS, de 3.0 y 3-3.5, respectivamente, aunque en el último caso se trata de una mezcla de isoenzimas (Lac1 y Lac2) que co-purifican. La lacasa de *Leptosphaerulina chartarum* presenta un pH óptimo de 3.8 (Sajben-Nagy et al., 2014). Aquellas enzimas cuyo pH óptimo se encuentra entre 4 y 5, similar a las condiciones óptimas para *Didymosphaeria* sp., se encuentran la de *Leptographium qinlingensis* (Hu et al., 2014) y *G. graminis* var. *tritici* (Edens et al., 1999), con un pH óptimo de 4.4 y 4.5, respectivamente. Entre las enzimas que trabajan mejor a un pH cercano a la neutralidad se encuentran las de *Chaetomium thermophilum* usando siringaldazina (Chefetz et al., 1998) y *Magnaporthe grisea* que presentan un pH óptimo de 6 para siringaldazina (Iyer y Chattoo, 2003), mientras que la de *Chalara* (sin.=*Thielaviopsis*) *paradoxa* tiene un pH óptimo 6.5 para la mayoría de los sustratos probados, aunque con algunos es de 4.5, incluido el ABTS (Robles et al., 2002). En el extremo francamente básico, se encuentra la lacasa de *Myrothecium verrucaria* con un pH óptimo de 9.0 (Sulistyaningdyah et al., 2004).

Entre otras de las especies que presentan lacasas extracelulares con distintos valores de pH óptimo, dependiendo del sustrato, se encuentra *Phoma* sp. en la que el pH óptimo cuando se emplea ABTS como sustrato es 2.5, pero para otros sustratos se encuentra entre 4.5 y 5.5 (Junghanns et al., 2009). También en *Lamprospora wrightii* el pH óptimo oscila entre 3 y 6, dependiendo del sustrato utilizado (Mueangtoom et al., 2010). En *Cladosporium cladosporioides* se han reportado valores de pH óptimo de 3.5 (Halaburgi et al., 2011) y 5.0 (Aslam et al., 2012), por lo que posiblemente se trata de isoenzimas. La actividad más alta de la lacasa de *M. albomyces* con ABTS se observó a un pH 3.5, mientras que con guayacol y siringaldazina el óptimo se observó en un rango de pH de 5–7.5 y 6–7,

respectivamente (Kiiskinen et al., 2002). Una enzima interesante es la proteína recombinante de *Botrytis aclada* expresada en *Pichia pastoris*, la cual muestra un rango de pH óptimo entre 3 y 5, dependiendo del sustrato, y aunque es sensible a la temperatura muestra halotolerancia, con un valor de I_{50} de 1.4 M, la tolerancia más alta a NaCl reportada hasta ahora en lacasas fúngicas (Kittl et al., 2012).

Los antecedentes presentados muestran que la lacasa *Didymosphaeria* spp., y en particular la de la cepa CMU-196, presentan pH óptimo característico de la mayoría de las lacasas extracelulares de ascomicetes caracterizadas. Por otra parte, la lacasa de la cepa CMU-196 presenta una resistencia a la temperatura que se encuentra entre las lacasas relativamente más termoresistentes dentro de las proteínas de ascomicetes. Está característica hace a la lacasa de la cepa CMU-196 un candidato para su aplicación en procesos biotecnológicos que requieren de temperaturas moderadamente altas. A futuro sería interesante estudiar el pH y la temperatura óptimos de trabajo de la lacasa de la cepa CMU-196 con distintos sustratos, con la intención de corroborar la posibilidad de que la enzima pueda trabajar en condiciones aún más extremas que las aquí reportadas.

En relación a la K_m , la lacasa caracterizada de la cepa de *Didymosphaeria* sp. mostró un valor de 35.28 μM con ABTS, mientras que con DMP fue de 14.11 μM . En *D. variable*, el valor de K_m con ABTS mismo sustrato es de 203 μM (Forootanfar et al., 2011), por lo que de las especies del género la afinidad por sustrato es mayor en la aquí estudiada. El valor de K_m se ha reportado en lacasas de ascomicetes empleando los mismos sustratos. En el caso del ABTS, algunas lacasas de distintas especies presentan valores de K_m menores al aquí encontrado, incluidas las enzimas de *C. (sin.= Thielaviopsis) paradoxa* (Robles et al., 2002), *Leptospheraulina* sp. (Copete et al., 2015), *C. cladosporioides* (Aslam et al., 2012), con valores de 0.77 μM , 16 μM y 15 μM , respectivamente. En contraste, la K_m para el mismo sustrato de las lacasas de *F. proliferatum* (Hernández-Fernaud et al., 2006), *F. solani* (Wu et al., 2010), *Magnaporthe grisea* (Iyer y Chattoo, 2003), *C. thermophilium* (Chefetz et al., 1998), presenta valores superiores al de la cepa CMU-196, con valores de 62 μM , 79.4 μM , 118

μM , 190 μM , respectivamente. De manera interesante, en el caso del DMP, la lacasa de la cepa CMU-196 presenta una de los valores de K_m más bajos reportados para lacasas de ascomicetos. Únicamente la enzima de *F. solani* (Wu et al., 2010) presenta un valor menor de K_m para dicho sustrato al de la cepa aquí estudiada, con 8.6 μM , mientras que la de *C. (sin.= Thielaviopsis) paradoxa* (Robles et al., 2002) presenta prácticamente el mismo valor que el de la cepa de estudio, con 14.72 μM . Las lacasas de *G. graminis* var. *tritici* (Edens et al., 1999), *C. thermophilium* (Chefetz et al., 1998), *B. cinerea* (Slomczynski et al., 1995), *Leptosphaerulina* sp. (Copete et al., 2015), con valores de K_m de 26 μM , 96 μM , 100 μM y 197 μM para DMP, son significativamente mayores al de *Didymosphaeria* sp.

En relación a la V_{\max} , la casa de la cepa CMU-196 presentó un valor de 4943 $\text{mmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ con ABTS, mientras que con DMP fue de 787.2 $\text{mmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. En *D. variable*, el valor de V_{\max} reportado empleando como sustrato el ABTS es de 40 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (Foorootanfar et al., 2011). En congruencia con la mayor afinidad hacia el ABTS mostrada por la cepa CMU-196 con respecto a *D. variable*, la velocidad de procesamiento del sustrato también es significativamente mayor en la primera con respecto a la segunda. La lacasa de *F. solani* presenta valores de V_{\max} 1483.1 $\mu\text{M min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para ABTS y de 1675.0 $\mu\text{M min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para el DMP (Wu et al., 2010), por lo que también en este caso la lacasa aquí caracterizada presenta una velocidad de procesamiento significativamente mayo. Los valores de V_{\max} reportados con los mismos sustratos para las lacasas de otras especies de ascomicetos están expresados en distintas unidades a las aquí reportadas, por lo que la comparación es difícil. Sin embargo se presentan dichos valores como datos adicionales., en la lacasa de *C. cladosporioides* el valor de V_{\max} reportado fue de 4612 $\mu\text{mol L}^{-1}\text{min}^{-1}$ con el ABTS como sustrato (Aslam et al., 2012). La lacasa de *C. thermophilium* tiene una V_{\max} de 2.6 $\mu\text{M O}_2\text{ min}^{-1}$ para el ABTS, mientras que el valor para DMP es de 3.4 (Chefetz et al., 1998).

El contraste de los datos de K_m y V_{\max} aquí obtenidos con los previamente reportados muestra claramente que la cepa CMU-196 de *Didymosphaeria* sp.

presenta una alta afinidad y velocidad de procesamiento por ABTS y DMP en relación a otras lacasas de ascomicetes. Esta característica de la lacasa aquí caracterizada la hace biotecnológicamente competitiva dentro de las lacasas de ascomicetes. A futuro es necesario evaluar los parámetros cinéticos de la enzima de de *Didymosphaeria* sp. con otros sustratos, con la finalidad de poder conocer la capacidad de procesamiento de la dicha lacasa de sustratos de distintas características y complejidad química.

Referencias

1. Aghaie-Khouzani, M., Forootanfar, H., Moshfegh, M., Khoshayand, M. R., & Faramarzi, M. A. (2012). Decolorization of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Biochemical Engineering Journal*. 60: 9–15.
2. Aslam, M. S., Aishy, A., Samra, Z. Q., Gull, I., Athar, M. A. (2012). Identification, purification and characterization of a novel extracellular laccase from *Cladosporium cladosporioides*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 26(6): 3345-3350.
3. Ariyawansa HA, Tanaka K, Thambugala KM, Phookamsak R, Tian Q, Camporesi E, Hongsanan S, Monkai J, Wanasinghe DN, Chukeatirote E, Kang JC, Xu JC, McKenzie EHC, Jones EBG, Hyde KD. (2014). A molecular phylogenetic reappraisal of the *Didymosphaeriaceae* (= *Montagnulaceae*). *Fungal Diversity*. 68:69–104.
4. Arredondo-Santoyo M., Vázquez-Garcidueñas M.S., Vázquez-Marrufo G. 2018. Identification and characterization of the biotechnological potential of a wild strain of *Paraconiothyrium* sp. *Biotechnology Progress*. In press. doi:10.1002/btpr.2653.
5. Ashrafi, S. D., Rezaei, S., Forootanfar, H., Mahvi, A. H., Faramarzi, M. A. 2013. The enzymatic decolorization and detoxification of synthetic dyes by the laccase from a soil-isolated ascomycete, *Paraconiothyrium variabile*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 85: 173-181.

6. Baldrian, P. 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 30: 215–242.
7. 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.
8. Cañero, D. C., Roncero, M. I. G. (2008). Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. 98(5): 509-518.
9. 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:0.1371/journal.pone.0055295.
10. Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y. (1998). Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(9): 3175-3179.
11. Copete, L. S., Chanagá, X., Barriuso, J., López-Lucendo, M. F., Martínez, M. J., Camarero, S. (2015). Identification and characterization of laccase-type multicopper oxidases involved in dye-decolorization by the fungus *Leptosphaerulina* sp. *BMC Biotechnology*. 15(1): 74.
12. Cordoba, C. D., Roncero, M. I. G. (2008). Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. 98 (5): 509–519.
13. 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.
14. 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.
15. Damm, U., Verkley, G. J. M., Crous, P. W., Fourie, P. H., Haegi, A., & Riccioni, L. (2008). Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. *Persoonia*. 20(1): 9–17.

16. Dhakar, K., Pandey, A. (2016). Extracellular laccase from a newly isolated psychrotolerant strain of *Cladosporium tenuissimum* (NFCCI 2608). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 86(3): 685-690.
17. 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.
18. Edens, W. A., Goins, T. Q., Dooley, D., Henson, J. M. (1999). Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(7): 3071-3074.
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. Forootanfar, H., Faramarzi, M.A., Shahverdi, A.R., Tabatabaei Yazdi M. (2011). Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variable*. *Bioresource Technology*. 102: 1808–1814.
22. Forootanfar, H., Movahednia, M. M., Yaghmaei, S., Tabatabaei-Sameni, M., Rastegar, H., Sadighi, A., & Faramarzi, M. A. (2012). Removal of chlorophenolic derivatives by soil isolated ascomycete of *Paraconiothyrium variable* and studying the role of its extracellular laccase. *Journal of Hazardous Materials*. 209–210: 199–203.

23. Gao, H., Wang, Y., Zhang, W., Wang, W., & Mu, Z. (2011). Isolation, identification and application in lignin degradation of an ascomycete GHJ-4. *African Journal of Biotechnology*. 10(20), 4166–4174.
24. 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.
25. 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.
26. Hernández-Fernaud, J., Marina, A., González, K., Vázquez, J., Falcón, M. A. (2006). Production, partial characterization and mass spectrometric studies of the extracellular laccase activity from *Fusarium proliferatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 70(2): 212-221.
27. Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R., Kües, U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *The FEBS Journal*. 273(10): 2308-2326.
28. Hu, X., Wang, C., Wang, L., Zhang, R., Chen, H. (2014). Influence of temperature, pH and metal ions on guaiacol oxidation of purified laccase from *Leptographium qinlingensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30(4): 1285-1290.
29. Iyer, G., Chattoo, B. B. (2003). Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters*. 227(1): 121-126.
30. 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 characterisation of a novel laccase produced by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84(6): 1095-1105.

31. Kiiskinen, L. L., Viikari, L., Kruus, K. (2002). Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59(2-3): 198-204.
32. Kittl, R., Mueangtoom, K., Gonaus, C., Khazaneh, S. T., Sygmund, C., Haltrich, D., Ludwig, R. (2012). A chloride tolerant laccase from the plant pathogen ascomycete *Botrytis aclada* expressed at high levels in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*. 157(2): 304-314.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Mot, A. C., Silaghi-Dumitrescu, R. (2012). Laccases: complex architectures for one-electron oxidations. *Biochemistry (Moscow)*. 77(12): 1395-1407.
39. Mtibaà, R., de Eugenio, L., Ghariani, B., Louati, I., Belbahri, L., Nasri, M., & Mechichi, T. (2017). A halotolerant laccase from *Chaetomium* strain isolated from desert soil and its ability for dye decolourization. *3 Biotech*. 7(5): 329.

40. Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shl:ev, S. V., Yaropolov, A. I. (2007). "Blue" Laccases. Review. *Biochemistry (Moscow)*. 72(10): 1136–1150.
41. Mueangtoom, K., Kittl, R., Mann, O., Haltrich, D., Ludwig, R. (2010). Low pH dye decolorization with ascomycete *Lamprospora wrightii* laccase. *Biotechnology Journal*. 5(8): 857-870.
42. Palonen, H., Saloheimo, M., Viikari, L., Kruus, K. (2003). Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 33(6): 854-862.
43. Pöggeler, S. (2011). Evolution of multicopper oxidase genes in coprophilous and non-coprophilous members of the order sordariales. *Current Genomics*. 12: 95–103.
44. Rich, J. O., Leathers, T. D., Anderson, A. M., Bischoff, K. M., Manitchotpisit, P. (2013). Laccases from *Aureobasidium pullulans*. *Enzyme and Microbial Technology*. 53(1): 33-37.
45. Robles, A., Lucas, R., Martínez-Cañamero, M., Omar, N. B., Pérez, R., Gálvez, A. (2002). Characterisation of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. *Enzyme and Microbial Technology*. 31(4): 516-522.
46. 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.
47. 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.
48. Sajben-Nagy, E., Manczinger, L., Škrbić, B., Živančev, J., Antić, I., Krisch, J., Vágvölgyi, C. (2014). Characterization of an extracellular laccase of *Leptosphaerulina chartarum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30(9). 2449-2458.

49. 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.
50. Simpson, R.J. (2003). *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*, first ed. CSHL Press, New York. pp. 857–859.
51. Slomczynski, D., Nakas, J., Tanenbaum, S. W. (1995). Production and Characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(3): 907-912.
52. 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.
53. 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 aquatica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(13): 4732-4739.
54. Sulistyaningdyah, W. T., Ogawa, J., Tanaka, H., Maeda, C., Shimizu, S. (2004). Characterization of alkaliphilic laccase activity in the culture supernatant of *Myrothecium verrucaria* 24G-4 in comparison with bilirubin oxidase. *FEMS Microbiology Letters*. 230(2): 209-214.
55. 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. doi:10.1186/1475-2859-10-78.
56. 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.
57. Verkley, G. J. M., Da Silva, M., Wicklow, D. T., & Crous, P. W. (2004). *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite

- Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Studies in Mycology*. 50: 323–335.
58. 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.
59. Wu, Y. R., Luo, Z. H., Chow, R. K. K., Vrijmoed, L. L. P. (2010). Purification and characterization of an extracellular laccase from the anthracene-degrading fungus *Fusarium solani* MAS2. *Bioresource Technology*. 101(24): 9772-9777.
60. Xie, N., Chapeland-Leclerc, F., Silar, P., Ruprich-Robert, G. (2014). Systematic gene deletions evidences that laccases are involved in several stages of wood degradation in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Environmental Microbiology*. 16(1): 141-161.
61. Zheng, Y. K., Qiao, X. G., Miao, C. P., Liu, K., Chen, Y. W., Xu, L. H., & Zhao, L. X. (2016). Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Annals of Microbiology*. 66(2): 529-542.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

La cepa CMU-196 caracterizada en el presente trabajo proviene de un cepario de hongos silvestres del estado de Michoacán. La conservación *ex situ* y el estudio del micelio vegetativo de cepas de hongos silvestres de *taxa* poco estudiados *in vitro*, como lo es el género *Didymosphaeria*, tienen relevancia tanto para el conocimiento de su biología básica como para el aprovechamiento de su potencial biotecnológico. Los hongos representan una fuente importante de metabolitos con actividad farmacológica (Anke y Schüffler, 2018; Gargano et al., 2017), son recursos para la bioremediación y detoxificación ambiental (Prasad, 2017; Spina et al., 2018), herramientas para el tratamiento de biomasa vegetal para la producción de alimento animal (Van Kuijk et al., 2015), así como para el biopulpeo (Singh y Singh, 2014) la producción biocombustibles y otros productos de valor agregado (Gupta et al., 2016). La descripción y conservación de la biodiversidad fúngica debe ir acompañada de su prospección biotecnológica (Chambergo y Valencia, 2016), y el presente trabajo se enmarca en esa estrategia de doble objetivo conservación/prospección de la diversidad de hongos del estado de Michoacán. Es deseable que este tipo de estudios se incrementen, evaluando *taxa* endémicos y poco conocidos para su aplicación en el desarrollo de productos y procesos de relevancia regional. También es necesario que en estudios posteriores se incorporen herramientas omicas y bioinformáticas modernas que permitan una descripción más completa del potencial biotecnológico de cepas fúngicas silvestres (Hillman et al., 2017; Miyauchi et al., 2018; Sharma, 2016).

Al iniciar la caracterización de la cepa CMU-196 con el objetivo de evaluar su potencial biotecnológico, la evidencia filogenética indicó de manera robusta que dicha cepa pertenecía a la especie *Paraconiothyrium brasiliense*, la cual había sido descrita recientemente junto con el género (Verkley et al., 2004). El cambio de *P. brasiliense* a *Didymosphaeria* sp. fue propuesto con base en el análisis filogenético de especies dentro de géneros de la familia *Didymosphaeriaceae* (Ariyawansa et al., 2014). Debido a la estrecha relación entre ambos géneros y

otros de la familia, es factible que en el futuro se sigan realizando adecuaciones en la posición taxonómica en estos niveles jerárquicos de clasificación en dichos taxa. El reacondo continuo de géneros y especies es algo común en el reino Fungi en el que se describen anualmente entre 1000 y 1500 nuevos taxa, y particularmente en Ascomycota, el grupo más complejo y dentro del cual se incluyen 6300 géneros y cerca de 64 000 especies (Wijayawardene et al., 2017).

La relevancia de una correcta identificación de cepas fúngicas de interés biotecnológico ha sido enfatizada por diversos autores (Druzhinina et al., 2005; Raja et al., 2017), sin embargo, el conocimiento en Sistemática y Taxonomía de hongos es algo que está fuera del área de desarrollo de investigadores en el área de la biotecnología. Es por que se han desarrollado estrategias para la identificación genético molecular de hongos que no requieren mucha experiencia en taxonomía (Begerow et al., 2010; Kõljalg et al., 2013). No obstante, las herramientas filogenéticas, aún aplicadas de manera adecuada, no garantizan que una cepa sea asignada correctamente a una especie dada la constante reestructuración de taxa previamente mencionada. El caso del cambio de las especies *Paraconiothyrium variabile* y *Paraconiothyrium brasiliense* a *Didymosphaeria rubi-ulmifolii* y *Didymosphaeria variabile* (Ariyawansa et al., 2014), respectivamente, y en este última caso también como *Didymosphaeria* sp. cuando no se cuenta con información morfológica, aún no ha sido registrado por investigadores del área de biotecnología. De tal forma, continúan apareciendo trabajos que registran la producción de metabolitos secundarios (Liu et al., 2016; Somjaipeng et al., 2016; Vallet et al., 2017; Xu et al., 2017). De la misma forma, la publicación originada del presente trabajo también documentó a la cepa CMU-196 como *P. brasiliense* (Arredondo-Santoyo et al., 2018).

Debido a la relevancia de asociar correctamente una especie con un proceso fisiológico, ecológico o biotecnológico, lo cual puede tener inclusive implicaciones legales (Naeem y Bunker, 2009) es necesario desarrollar estrategias que permitan que los micólogos no asociados a la identificación fúngica directamente se mantengan al tanto de los cambios en nomenclatura y asignación

taxonómica de hongos. Aunque la definición de especies fúngicas con base únicamente en secuencias ha sido cuestionada (Thines et al., 2018), la asignación inicial de una cepa mediante un protocolo de barcoding molecular es una herramienta de primera instancia para la identificación fúngica (Lücking et al., 2017) y es útil en cepas que serán estudiadas con fines biotecnológicos (Raja et al., 2017). Una posibilidad es que cualquier reclasificación de una especie se refleje inmediatamente en la asignación de las secuencias depositadas en el Genbank, utilizadas comúnmente por los biotecnólogos para la asignación de especie a sus cepas de estudio. La curación de bases de datos para asignación de una secuencia de ADN con la especie correcta ya ha iniciado en algunos grupos hongos (Robbertse et al., 2017). Sin embargo, es necesario que se extienda a otros grupos de hongos, particularmente de taxa en conflicto o de reciente descripción, aunque el mecanismo para esto estaría por definirse.

Referencias

1. Anke, T., Schüffler, A. (2018). Physiology and genetics: selected basic and applied aspects. The Mycota XV 2nd Edition. Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
2. Ariyawansa, H.A., Tanaka, K., Thambugala, K.M., Phookamsak, R., Tian, Q., Camporesi, E., Hongsanan, S., Monkai, J., Wanasinghe, D.N., et al. (2014). A molecular phylogenetic reappraisal of the *Didymosphaeriaceae* (= *Montagnulaceae*). *Fungal Diversity*. 68:69–104.
3. Arredondo-Santoyo, M., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Vázquez-Marrufo, G. (2018). Identification and characterization of the biotechnological potential of a wild strain of *Paraconiothyrium* sp. *Biotechnology Progress*. doi: 10.1002/btpr.2653
4. Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., Maier, W. (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(1): 99-108.

5. Chambergo, F. S., Valencia, E. Y. (2016). Fungal biodiversity to biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(6): 2567-2577.
6. Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G., Kubicek, C. P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*. 42(10): 813-828.
7. Gargano, M. L., van Griensven, L. J., Isikhuemhen, O. S., Lindequist, U., Venturella, G., Wasser, S. P., Zervakis, G. I. (2017). Medicinal mushrooms: valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems*. 151: 548-565.
8. Gupta, V. K., Kubicek, C. P., Berrin, J. G., Wilson, D. W., Couturier, M., Berlin, A., Filho E.X.F., Ezeji, T. (2016). Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. *Trends in Biochemical Sciences*. 41: 633-645.
9. Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F., Bahram, M., et al. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*. 22(21): 5271-5277.
10. Liu, C. X., Yu, X. Q., Guo, Z. Y., He, H. B., Tu, X., Deng, Z. S., Zou, K. (2016). Structural elucidation and NMR spectral assignments of paraconfuranones I–M from the insect-associated fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 54(11): 916-921.
11. Lücking, R., Kirk, P. M., Hawksworth, D. L. (2018). Sequence-based nomenclature: a reply to Thines et al. and Zamora et al. and provisions for an amended proposal “from the floor” to allow DNA sequences as types of names. *IMA Fungus*. 9(1): 185-198.
12. Miyauchi, S., Rancon, A., Drula, E., Chaduli, D., Favel, A., Grisel, S., et al. (2018). Integrative visual omics of the white-rot fungus *Polyporus brumalis* exposes the biotechnological potential of its oxidative enzymes for delignifying raw plant biomass. *Biotechnology for Biofuels*. 11:201. doi:10.1186/s13068-018-1198-5.

13. Naeem, S., Bunker, D. E. (2009). TraitNet: furthering biodiversity research through the curation, discovery, and sharing of species trait data. *In* S. Naeem, DE Bunker, A Hector, M Loreau, C Perrings (editors). Biodiversity, ecosystem functioning, and human wellbeing: an ecological and economic perspective. Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 281-289.
14. Prasad, R. (2017). Mycoremediation and environmental sustainability. Vol. 1. Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG.
15. Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products*. 80(3): 756-770.
16. Robbertse, B., Strope, P. K., Chaverri, P., Gazis, R., Ciufu, S., Domrachev, M., Schoch, C. L. (2017). Improving taxonomic accuracy for fungi in public sequence databases: applying 'one name one species' in well-defined genera with *Trichoderma/Hypocrea* as a test case. *Database*. 2017: bax072. doi:10.1093/database/bax072
17. Sharma, K. K. (2016). Fungal genome sequencing: basic biology to biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*. 36(4): 743-759.
18. Singh, A. P., Singh, T. (2014). Biotechnological applications of wood-rotting fungi: a review. *Biomass and Bioenergy*. 62: 198-206.
19. Somjai peng, S., Medina, A., & Magan, N. (2016). Environmental stress and elicitors enhance taxol production by endophytic strains of *Paraconiothyrium variabile* and *Epicoccum nigrum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 90: 69-75.
20. Spina, F., Cecchi, G., Landinez-Torres, A., Pecoraro, L., Russo, F., Wu, B., Cai, L., Liu X.Z., Tosi, S., Varese, G.C., Zotti, M., Persiani, A. M. (2018). Fungi as a toolbox for sustainable bioremediation of pesticides in soil and water. *Plant Biosystems*. 52: 474-488.
21. Thines, M., Crous, P. W., Aime, M. C., Aoki, T., Cai, L., Hyde, K. D., et al. (2018). Ten reasons why a sequence-based nomenclature is not useful for fungi anytime soon. *IMA Fungus*. 9(1): 177-183.

22. Vallet, M., Vanbellingen, Q. P., Fu, T., Le Caer, J. P., Della-Negra, S., Touboul, D., et al. (2017). An integrative approach to decipher the chemical antagonism between the competing endophytes *Paraconiothyrium variabile* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products*. 80(11): 2863-2873.
23. Van Kuijk, S. J. A., Sonnenberg, A. S. M., Baars, J. J. P., Hendriks, W. H., Cone, J. W. (2015). Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. *Biotechnology Advances*. 33: 191-202.
24. Verkley, G. J. M., Da Silva, M., Wicklow, D. T., & Crous, P. W. (2004). *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Studies in Mycology*. 50: 323–335.
25. Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Rajeshkumar, K. C., Hawksworth, D. L., Madrid, H., Kirk, P. M., Braun, U., Singh, R.V. et al. (2017). Notes for genera: Ascomycota. *Fungal Diversity*. 86(1): 1-594.
26. Xu, G. B., Mi, J., Yang, T., Wu, L. W., Yuan, X. H., Li, G. Y. (2017). Two new polyketide metabolites isolated from *Paraconiothyrium brasiliense*. *Chemistry of Natural Compounds*. 53(5): 870-873.

VIII. PERSPECTIVAS

1. Es necesario evaluar la capacidad de la lacasa purificada de la cepa CMU-196 para degradar sustancias fenólicas, con la finalidad de conocer su potencial en el proceso de detoxificación de efluentes contaminados. También es interesante evaluar el efecto de la lacasa purificada sobre el proceso de delignificación de rastrojo de maíz u otro tipo de biomasa vegetal, lo que sería útil en el mejoramiento de la alimentación ruminal o producción de biocombustible.
2. La expresión heteróloga del gen de lacasa extracelular de la cepa CMU-196 para escalar su producción a gran escala debe de ser explorada en estudios posteriores.
3. La realización de un análisis proteómico del cultivo de la cepa CMU-196 en ensayos de fermentación en sustrato sólido empleando rastrojo de maíz permitirá evaluar el papel de lacasa y otras enzimas extracelulares en la delignificación de dicho sustrato, con la finalidad de mejorar su calidad como alimento ruminal. Este estudio también contribuiría a evaluar la posibilidad de generar biocombustibles con la cepa de interés.
4. Sería interesante seguir explorando la capacidad antagonista hacia hongos y oomicetes fitopatógenos de la cepa de estudio. En particular, evaluar los mecanismos moleculares, incluyendo la participación de enzimas y metabolitos volátiles y no volátiles, que participan en dicho proceso.
5. La secuenciación del genoma de la cepa de estudio incrementará significativamente el potencial biotecnológico de la cepa CMU-196, al identificar grupos de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios, así como como aquellos codificantes de enzimas hidrolíticas y oxidativas extracelulares. Aún más, la obtención de transcriptomas durante los procesos de degradación de biomasa vegetal o en ensayos de antagonismo contra fitopatógenos debe de incorporarse en el proceso de caracterización de la cepa CMU-196.

IX. CONCLUSIÓN GENERAL

La hipótesis del presente trabajo no se cumple, ya que la cepa CMU-196 solo posee la capacidad para secretar lacasa extracelular; se sugiere que las actividades de manganeso peroxidasa y lignin peroxidasa detectadas se deben a falsos positivos originados por otras actividades enzimáticas.

Observación adicional

El potencial de degradación de sustancias fenólicas, de delignificación de rastrojo de maíz y de antagonismo contra microorganismos fitopatógenos de la cepa CMU-196 puede estar asociado parcialmente a la actividad de lacasa extracelular, de acuerdo a los antecedentes encontrados en la literatura; no obstante, el presente estudio no demostró dicha asociación.

ANEXO I

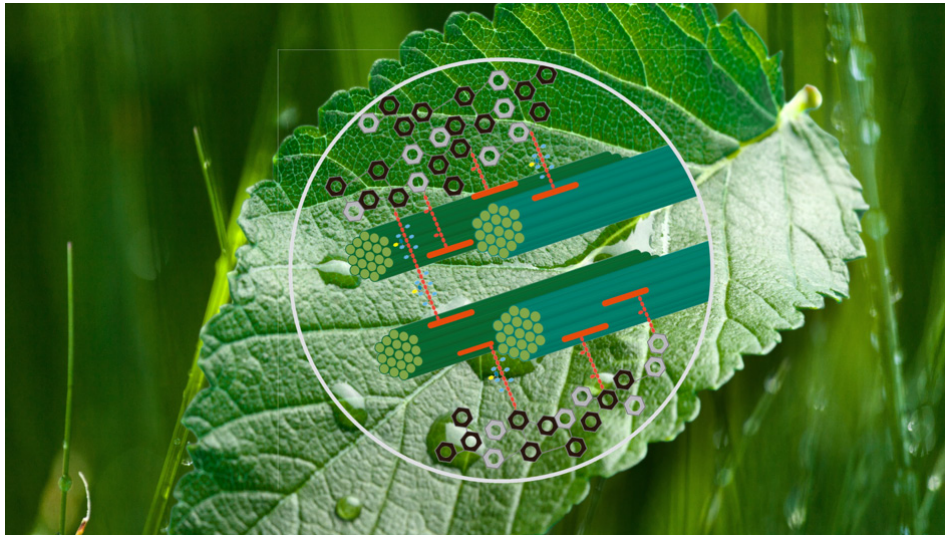
“Pared celular de las plantas: Función, estructura y aplicaciones”

Artículo de divulgación científica
Publicado en la revista Saber Más
Marzo-Abril 2018

ARTÍCULO

*Pared celular de las plantas:
Función, estructura y aplicaciones*

Marina Arredondo-Santoyo y Gerardo Vázquez-Marrujo



Algo que la experiencia diaria de cualquiera de nosotros nos muestra, y quizá no le prestamos mucha atención al pasar por un parque de la ciudad o al salir de día de campo, es que las plantas son capaces de mantenerse erguidas, sin "aplastarse" como una masa sin forma de hojas, tallos y troncos en el suelo. Hay árboles como las secuoias que tienen alturas arriba de los 60 metros, se ha medido un árbol con la increíble altura de 115 metros.

¿Cómo es esto posible? Bueno, la explicación es que poseen una estructura celular muy importante que les permite desafiar las leyes de la gravedad -**La Pared Celular**-

Los componentes químicos de esta estructura son la clave para darle rigidez y forma a las células vegetales, incluidas las que constituyen las raíces, los tallos, los troncos y las hojas de las plantas. Las células de nuestro cuerpo o de cualquier especie animal no poseen esta estructura.

Pero, las plantas no son los únicos organismos cuyas células poseen una pared, ya que los hongos y las algas también la presentan, al igual que los organismos celulares más simples, como las eubacterias y las arqueobacterias. Aunque existe cierto parecido general en la composición química

La M. en C. Marina Arredondo Santoyo es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en la Opción de Biotecnología Molecular Agropecuaria. El D. en C. Gerardo Vázquez Marrujo es investigador responsable del Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

U.M.S.N.H. | Año 7 /Marzo - Abril/ No. 38

básica, las sustancias químicas más complejas y la estructura de la pared celular de cada uno de estos organismos presentan marcadas diferencias.

¿Por qué estamos particularmente interesados en hablar aquí de la pared celular de las plantas y no de los otros grupos biológicos? Como lo explicaremos a continuación, la pared celular vegetal se ha convertido en los últimos años en un actor importante del desarrollo biotecnológico.

La pared celular vegetal está hecha de polímeros

Es imposible en este espacio detallar el proceso completo que permite a las células vegetales ensamblar una estructura tan compleja, pero podemos intentar comprender cuáles son los compo-

destacándose la glucosa por su abundancia. Otros azúcares simples presentes en la pared son la xilosa, el ácido galacturónico, la galactosa, la arabinosa y la fucosa. Imaginemos que estos azúcares con nombres curiosos son eslabones con los que queremos formar cadenas. En el proceso de construcción de su pared, la célula vegetal ensambla "cadenas", particularmente de glucosa, xilosa y ácido galacturónico, que pueden ser de cientos o en algunos casos, de miles de estos "eslabones". Estas cadenas se llaman polímeros, que por estar formados de azúcares simples son polisacáridos.

La Celulosa.- El polímero formado por cadenas de glucosa es el polisacárido natural más abundante en los ecosistemas terrestres y se llama celulosa. Cuando varias cadenas de celulosa se asocian, se forman las microfibrillas de la pared celular

vegetal, que pueden compararse con los "castillos" de varillas de fierro empleados en la construcción de un edificio. Las cadenas más cortas que la celulosa formadas por los otros azúcares mencionados constituyen distintos polímeros denominados genéricamente como hemicelulosa.

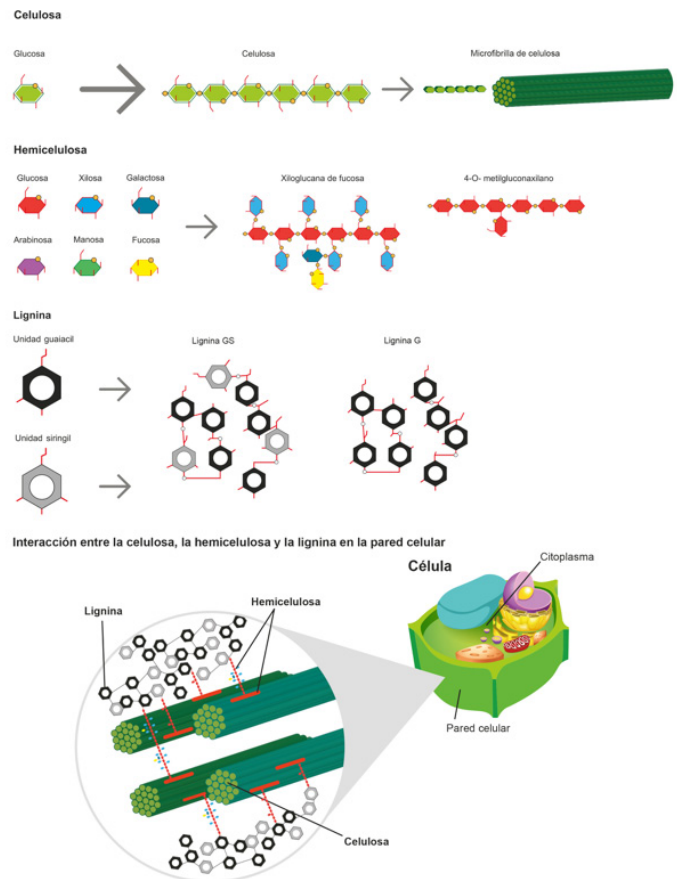
La Lignina.-

Para complementar la estructura de la pared vegetal es necesario incluir otro tipo de compuesto complejo denominado lignina. Esta sustancia química no está construida con azúcares simples y no tiene la estructura de una cadena. Para formar la lignina, la planta hace uso de moléculas orgánicas denominadas alcoholes aromáticos o fenoles, estructuras de forma hexagonal que se unen para construir una "red" tridimensional. Aunque la comparación es muy simplista, imaginemos una red

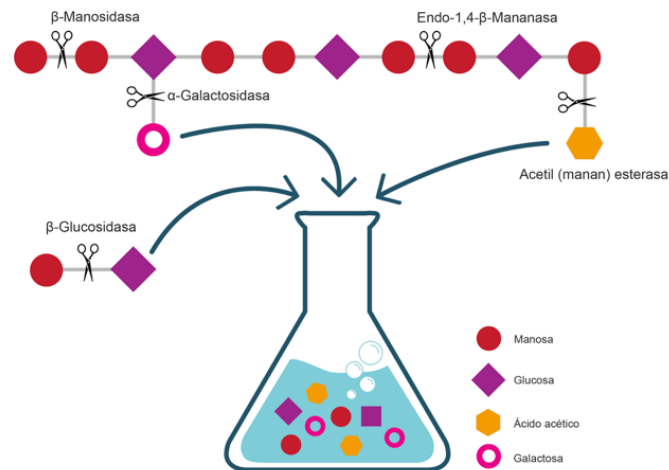
de gallinero o varias de estas redes orientadas en diferentes posiciones. Siguiendo con la comparación del edificio, la lignina podría ser como el concreto o cemento de la construcción, interactuando con las cadenas de celulosa y hemicelulosa para

nentes principales de la pared celular de las plantas y cómo interactúan.

Entre las estructuras químicas básicas que ensamblan la pared celular de las plantas se encuentran los azúcares simples o monosacáridos,



Enzimas degradativas



darle firmeza a la estructura de la pared. La reconstrucción que hemos hecho de la pared celular vegetal está simplificada, pero permite darnos una idea de su complejidad química y estructural.

La pared celular cambia, es dinámica y diversa

La composición química de la pared celular vegetal y su conformación tridimensional no son estables. Al pasar de semilla a una planta madura, la pared celular se va modificando conforme la planta va desarrollando tejidos y órganos. Además, la pared es distinta en las estructuras que conforman una planta madura, de tal forma que la raíz, los tallos, las hojas y el tronco de árboles, presentan variaciones en la composición de polímeros y la estructura de la pared dentro de una misma planta.

Por último, la estructura de la pared celular es distinta entre diferentes especies de plantas. El maíz y el trigo presentan diferencias y ellos dos tienen una pared distinta a la de los pinos o los eucaliptos. Todo esto debe dejarnos la idea de que la pared celular es una estructura dinámica y diversa, que a partir de los mismos elementos básicos de construcción puede generar distintas versiones. Para seguir con nuestra comparación entre la pared celular y un edificio, es fácil imaginarse cualquier ciudad o voltear a ver alrededor de donde uno esté parado en cualquier calle, para darse cuenta cómo con los mismos elementos de construcción, se pueden generar edificios muy distintos.

Hongos y bacterias degradadores de pared celular de plantas

Las bacterias y los hongos son los responsables de "romper" tanto las "cadenas" de azúcares simples de celulosa y hemicelulosa, como las "redes" de lignina en la naturaleza. Cuando la hoja de un árbol cae al suelo del bosque, o se deja el tallo y las hojas de la planta del maíz en el suelo de la parcela de cultivo, inicia un proceso de descomposición muy complejo, cuya relevancia es que tanto bacterias como hongos producen proteínas tipo enzimas que funcionan como "tijeras" que pueden "cortar" las fibras de celulosa y hemicelulosa, así como a la lignina, liberando fragmentos cada vez más pequeños que pueden ser utilizados por otros microorganismos para alimentarse, iniciando así un ciclo de reciclado de sustancias químicas en la naturaleza.

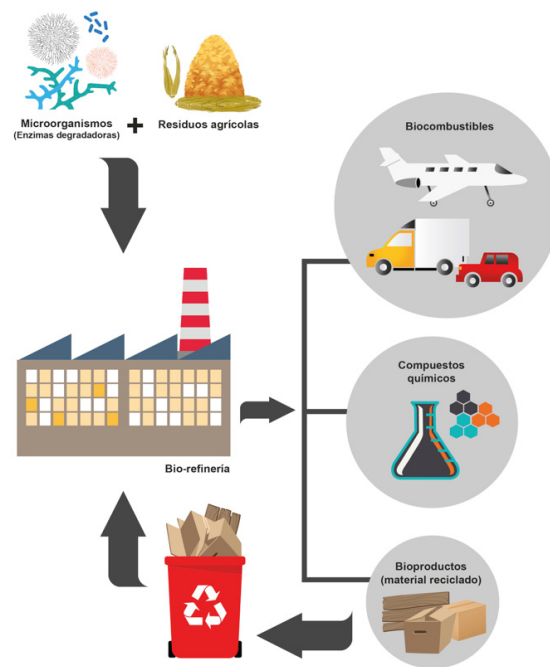
Aplicaciones de la degradación microbiana de la pared celular vegetal

Los científicos tienen gran interés en entender cómo ocurre el proceso de degradación de tejidos vegetales en la naturaleza, reproducirlo en el laboratorio y desarrollar plantas industriales del proceso a gran escala. Esto se debe a que la biomasa vegetal se ha convertido en una fuente importante de combustibles, que en un futuro no muy lejano pueden reemplazar completamente a los combustibles fósiles derivados del petróleo.

U.M.S.N.H. | Año 7 /Marzo - Abril/ No. 38

Una ventaja importante de los biocombustibles es que al utilizarse en motores no producen gases tóxicos, que además de afectar la salud humana y contaminar los ecosistemas, provocan el calentamiento global que tanta preocupación ha despertado en los últimos años. Para aprovechar todos los componentes de la biomasa vegetal, el paso clave es degradar la pared celular. La idea para la producción de los biocombustibles es que en un proceso industrial controlado, los polímeros sean degradados o "cortados" por las enzimas de bacterias y hongos, y los azúcares simples que resultan de dicha degradación sean convertidos en alcohol para ser utilizado como combustible.

Pero el biocombustible no es el único producto que se puede obtener de la degradación de la biomasa vegetal y los polímeros que conforman la pared celular. La recuperación y tratamiento adecuado de la lignina permite obtener emulsificantes, preservadores de madera, aditivos para la construcción, matriz para fertilizantes,



así como productos químicos con aplicaciones en medicina humana y animal, incluyendo estimuladores del sistema inmune y sustancias antivirales. La actividad pecuaria también se ve beneficiada del proceso de degradación microbiana de la pared celular vegetal, ya que se puede obtener alimento enriquecido para vacas, borregos y chivos. Puede decirse que el tratamiento de biomasa vegetal con bacterias y hongos contribuye a mejorar la producción de leche y carne, ¡algo que quizá no nos hubiéramos imaginado!

El complejo industrial que permite generar todos estos productos se ha denominado biorrefinería, y echar a andar una empresa de esa índole involucra el esfuerzo de distintas áreas del conocimiento,

desde microbiólogos y genetistas hasta ingenieros químicos y expertos en cómputo, marcando un nuevo hito en el desarrollo biotecnológico. Algo de lo que muy probablemente quieren formar parte los lectores jóvenes con intereses en la biotecnología.

SaberMás

Centeno-Rumbos y Pavone-Maniscalco. 2015. Producción de celulasas y biomasa del hongo *Trichoderma reesei* utilizando lodo papelerero como fuente de carbono. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 35(1), 40-46. <http://www.redalyc.org/html/1994/199441803008/>

Montoya S.B. 2014. Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. Biotecnología en

el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 12(2), 115-124. <http://revistabiotecnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotecnologia/article/view/347>

Segura-Vilchez y Navarrete-Coronado. 2012. Enzimas microbianas para producir moléculas con potencial uso terapéutico, el caso del xilitol. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica, LXIX (600), 25-29. <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/contenido.cgi?IDPUBLICACION=3612>