



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Manuscrito de tesis para la obtención de la Maestría en Biotecnología

Profundizando en el repertorio lignolítico de  
*Punctularia atropurpurascens*:  
un hongo con potencial biotecnológico

Lic. Lucía Bidondo

Orientadora: Dra. Gianna Cecchetto

Tribunal

Dra. Susana Castro

Dra. Dinorah Pan

Dra. Paula Rodríguez

Montevideo, Uruguay

2021



# Agradecimientos

Las palabras de agradecimiento no serían suficientes para reconocer a las personas que me ayudaron y colaboraron en el desarrollo de mi trabajo y sin las cuales, esta tesis no sería posible.

Quiero comenzar mis agradecimientos dándole las gracias, a mi supervisora, Gianna Cecchetto. Muchas gracias por confiar en mí y haberme dado la oportunidad de participar en el proyecto que luego se convertiría en mi tesis. Gracias por apoyarme en todas mis decisiones y principalmente por todo el tiempo dedicado a ayudarme a mejorar como científica.

En segundo lugar, quiero agradecerles a dos personas que fueron mis cotutoras de corazón: Gabriela Da Rosa y Mariana Barraco. Con ellas me formé, aprendí, discutí, reí, lloré, compartimos almuerzo y confidencias. Ellas fueron dos pilares muy importantes en mi trabajo y a quienes estaré eternamente agradecida.

Muchísimas gracias a la Dra. Paula Rodríguez, la Dra. Susana Castro y la Dra. Dinorah Pan por haber aceptado formar parte del tribunal para la evaluación de mi tesis.

Gracias a la ANII por haber financiado mi beca de maestría y a CSIC por haber financiado el proyecto. Sin la ayuda económica brindada, muchos de los ensayos no se hubieran podido realizar y la beca me permitió dedicarle el mayor tiempo posible.

Agradecer desde lo más profundo de mi corazón a todos mis compañeros del Laboratorio del 12: Feli, Niki, Ari, Vir, Sofi, Vale, Mil, Gonza, Stefi, Roberto, César, Flor, donde no hubo una mano que no pasara por un mortero, un traslado de frascos, una palabra de aliento, una respuesta a alguna pregunta o una ayuda para descargar de algún programa. Gracias por ser los mejores compañeros del mundo, espero algún día tener la oportunidad de volver a trabajar dentro de un grupo humano tan hermoso. Un enorme gracias a Virginia Ferreira, quien dedico su tiempo para formarme en la técnica de qPCR y sin quien no hubiese podido completar este trabajo a tiempo; a Ariel Tijman, el genio más genio, al "técnico" en informática del 12 quien me lanzó un salvavidas cuando más lo necesitaba y utilizó cada célula de su cerebro para ayudarme a solucionar problemas; a mi amigo Felipe Clavijo, quien estuvo a mi lado en las buenas y en las malas, y quien de alguna forma siempre intentó ayudarme desde su conocimiento y regalarme sus manos para hacer algún ensayo; a Niki, de quien nunca faltó un mensaje de aliento o un: "contá conmigo para lo que precises" y a Sofi Fort por haber compartido tardes de escritura, charlas, tarot y mate. Simplemente gracias.

Quiero agradecer también a la profesora Maria Inés Siri, por su calidez humana y conocimiento científico, por cuidarme y decirme las palabras justas en los momentos justos.

Muchas gracias a Andrés Milano y Pablo Smircich por haber realizado los ensamblajes y búsquedas informáticas. Especialmente, gracias Andrés por dedicarme el tiempo y tener la paciencia para explicarme cosas de bioinformática.

Agradecerle también a Martín Torres, del laboratorio de fisicoquímica, por haberme ayudado con a medir los potenciales a circuito abierto y a Andres Cuña por la clase de voltimetría cíclica. Los intercambios fueron de gran ayuda para la discusión de mis resultados.

Un enorme gracias a todos mis amigos, por haber sido un refugio importante durante el transcurso de la tesis. A mi gran amigo Beto, quien me dedicó sábado y domingos, quien estuvo conmigo a altas horas de la noche corrigiendo datos y redacciones, quien escuchó y me dio sugerencias para mejorar presentaciones. La persona que me cebó mates y quién me acompañó durante todo este viaje. A mi amiga Ivana también por estar a la par, por tratar de ayudarme en todo lo que estuvo a su alcance y más que nada por el amor y por cada mensaje de: "Cómo venís?".

Finalmente, por no menos importante, a mi otro pilar fundamental: mi familia. A mi abuela, a mi tía Bea, mi tía Carola y a mi prima, por ser mi principal respaldo.

Pero mi mayor agradecimiento va dirigido hacia mi madre, mi sostén, mi compañera, mi resguardo, mi principal hinchta y quien estuvo a mi lado en todo momento. Hace unos días, juntando papeles, encontré uno que particularmente me emocionó (Figura\*).

U11			Lcc12			
F2	R2		F1	R1	F2	R2
1	2/9	2/6	2/7	4/13	3/15	2/11
2	<del>2/9</del>	2/7	2/9	4/13	2/13	2/11
3	2/9	1/10	1/8	4/13	2/17	2/14
4	<del>4/14</del>	2/8	2/10	4/13	3/14	3/17
5	2/10	1/6	2/8	4/12	2/13	3/14
6	2/10	2/7	2/8	4/13	3/16	2/17
7	1/8	2/9	2/12	4/12	2/13	2/10
8	2/10	2/8	2/9	4/13	3/15	2/10
9	1/14	2/11	2/11	4/13	4/18	1/6
10	-/6	2/9	2/11	4/11	2/14	2/10
11	-	-	3/12	3/9	3/16	2/11
12	3/14	3/13	-	-	-	-

GATC G G A G A C A A G G T C G

**Figura\*:** Cuantificación de diferencias de nucleótidos en el extremo 3'/totales de los cebadores Fw y Rvs para los genes *lcc11* y *lcc12*.

La Figura\* me llevó directo a esa noche de sábado donde entre risas, yo contaba nucleótidos y vos me asistías anotando las diferencias. Soy la hija con más suerte en el mundo por tenerte como madre. Te adoro. Esta tesis te la dedico a ti.

# Resumen

Los hongos de la podredumbre blanca tienen la capacidad de mineralizar efectivamente la lignina presente en las paredes celulares vegetales, a través de la secreción de una serie de enzimas. Este mecanismo, les permite a los microorganismos acceder a la celulosa y hemicelulosa, su principal fuente de carbono y energía. Las principales proteínas involucradas en este proceso son enzimas tipo lacasas y peroxidasas de alto potencial redox y de baja especificidad. Debido a su importancia ambiental y potencial aplicación en procesos de biorremediación y procesos industriales, los hongos degradadores de la madera han sido ampliamente estudiados.

La producción enzimática y la capacidad degradativa varía con la especie y aún no están claras las diferencias a nivel bioquímico y operacional debido a la complejidad de los sustratos y la multiplicidad de las enzimas coexistentes en un mismo organismo. Por estos motivos, la prospección de enzimas lignolíticas más eficientes, así como la comprensión de su funcionamiento a nivel bioquímico y genético, siguen siendo de gran interés biotecnológico.

Para esta tesis se recurrió, a una colección de aislados de nuestro país y la región, entre los que se seleccionó el basidiomicota *Punctularia atropurpurascens* por su capacidad decolorante. Nuestros estudios indican que este hongo presenta, además de degradación selectiva de lignina, características interesantes tales como lacasas y manganeso peroxidasas funcionales en condiciones de metabolismo primario.

Esta tesis se centró en el estudio del funcionamiento de este sistema enzimático aún desconocido: capacidad decolorante de una gama de cromóforos, seguimiento del perfil de actividad lacasa, lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa en fermentaciones con colorantes y madera, la caracterización de genes lignolíticos y la comparación de la expresión génica en diferentes condiciones mediante RT-qPCR.

*P. atropurpurascens* pudo decolorar y crecer en presencia de todos los colorantes ofrecidos. El perfil de la actividad lacasa y manganeso peroxidasa, se vio alterada por el agregado de algunos colorantes al medio de cultivo. No se encontraron genes *lip* y se verificaron la presencia de ocho genes *mnp* y 12 genes *lcc*, cuya expresión relativa varió a lo largo del tiempo de incubación y en presencia de colorantes seleccionados. Por otra parte, se observó una falta de correlación entre actividad enzimática y la expresión génica. Este resultado podría sugerir que la regulación de la producción de estas enzimas también podría tener un fuerte componente a nivel postranscripcional y/o traduccional.

# Lista de abreviaturas

AA: Actividad auxiliar

ANQ: antraquinona

CAZy: *Carbohydrate-Active enzyme* (enzimas activas sobre carbohidratos)

DMAB: p-dimetilaminobenzaldehído

DMSO: dimetilsulfóxido

DyP: dye-peroxidase (*peroxidasa decolorante*)

EM: extracto de malta

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrógeno

HPB: Hongos de la podredumbre blanca

HPM: Hongos de la podredumbre marrón

HTP: hemo tiolato peroxidasa

Lcc: Lacasa

LiP: Lignino Peroxidasa

MBTH: (3-metilbenzotiazolinona-2(3H)-hidrazona)

MnP: Manganeso Peroxidasa

RBBR: Remazol brilliant blue R

RT: retrotranscripción

TFM: trifenilmetano

TZN: tiazina

VA: alcohol veratrílico

Vcre: velocidad de crecimiento

Vdec: velocidad de decoloración

VM: Verde malaquita

VP: Peroxidasa versátil

XNT: xanteno

## Tabla de contenido

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 El origen de la lignina: el nacimiento de las plantas vasculares.....	2
1.2 Lignina .....	3
1.2.1 Estructura de las paredes celulares vegetales .....	7
1.3 Hongos degradadores de la madera.....	8
1.3.1 Hongos de la podredumbre blanca .....	10
1.3.2 Hongos de la podredumbre marrón .....	11
1.4 Enzimas lignolíticas.....	12
1.4.1 Lacasas .....	12
1.4.2 Peroxidasas .....	16
1.5 Regulación de la expresión de enzimas lignolíticas.....	22
1.5.1 Inducción por nutrientes .....	22
1.5.2 Inducción por iones metálicos .....	23
1.5.3 Inducción por tipos de madera .....	24
1.5.4 Inducción por fenoles .....	25
1.6 Aplicaciones biotecnológicas de los HPB y enzimas lignolíticas.....	27
1.7 <i>Punctularia atropurpurascens</i> .....	29
<b>Objetivos.....</b>	<b>31</b>
Objetivo general.....	31
Objetivos específicos.....	31
<b>2. Materiales y métodos.....</b>	<b>32</b>
2.1 Materiales.....	33
2.1.1 Microorganismos .....	33
2.1.2 Colorantes .....	33
2.1.3 Cribado de la capacidad decolorante: Medio de cultivo AEM (Agar extracto de malta)- <i>P. atropurpurascens</i> y <i>P. chrysosporium</i> .....	34
2.1.4 Cribado de la capacidad decolorante: Medio de cultivo AEM modificado- <i>A. nidulans</i> .....	34
2.1.5 Medidas de actividad enzimática: Medio de cultivo líquido EM (extracto de malta) .....	34
2.2 Métodos .....	36
2.2.1 Análisis bioquímicos y microbiológicos .....	36
2.2.2 Análisis moleculares .....	41
<b>3. Resultados.....</b>	<b>51</b>
3.1 Análisis de la capacidad decolorante de <i>P. atropurpurascens</i> .....	52

3.1.1 Cribado cualitativo en medio sólido	52
3.1.2 Cinéticas de decoloración y de crecimiento	60
3.1.3 Potencial de reducción de los colorantes a circuito abierto	65
3.2 Actividad enzimática de enzimas lignolíticas	67
3.3 Identificación de secuencias lignolíticas y genes de referencia	72
3.3.1 Secuencias LiP	74
3.3.2 Secuencias MnP	75
3.3.3 Secuencias Lcc	77
3.4 Estudio de la expresión transcripcional de genes <i>mnp</i> y <i>lcc</i>	79
3.4.1 Validación de genes de referencia	80
3.4.2 Diseño y verificación de cebadores para genes <i>mnp</i> y <i>lcc</i>	84
3.4.3 Expresión relativa por RT-qPCR	85
<b>4. Discusión</b>	<b>98</b>
4.1 Cribado de la capacidad decolorante: <i>P. atropurpurascens</i> vs <i>P. chrysosporium</i>	100
4.2 Cinéticas de decoloración y potencial redox de colorantes	104
4.3 Actividad lignolítica y expresión de genes <i>mnp</i> y <i>lcc</i>	107
<b>5. Conclusiones y perspectivas</b>	<b>115</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>119</b>
<b>7. ANEXO</b>	<b>127</b>
7.1 ANEXO 1	128
7.1.1 Estructura molecular de colorantes	128
7.1.2 Cinética de crecimiento	131
7.1.3 Cinética de decoloración	132
7.1.4 Medidas de potencial electroquímico a circuito abierto	133
7.2 ANEXO 2	134
7.2.1 Motivos conservados MnP	134
7.2.2 Motivos conservados <i>lcc</i>	134
7.2.3 Secuencias genómicas, transcriptómicas y proteicas de <i>P.atropurpurascens</i>	135
7.3.4 Alineamientos de secuencias <i>mnp</i> B1, B2 y F	160

## Lista de Figuras

**Figura 1.1:** Representación ilustrativa de la evolución de plantas vasculares, creado por el artista Tom Phillips

**Figura 1.2:** Descripción de los sustituyentes del ácido hidroxicinámico

**Figura 1.3:** Ilustración esquemática de las estructuras y los principales componentes de las paredes celulares de las plantas

**Figura 1.4:** Diferentes aspectos de la madera atacada por hongos de la podredumbre blanca (HPB), gris (HPG) y marrón (HPM).

**Figura 1.5:** Oxidación de subunidades fenólica de lignina por parte de lacasas.

**Figura 1.6:** Ciclo catalítico de lacasa

**Figura 1.7:** Ciclo catalítico de MnP

**Figura 1.8:** ciclo catalítico de LiP

**Figura 1.9:** Esquema de los pasos de la fabricación de papel y puntos clave donde se podrían aplicar los HPB y sus enzimas para la biorremediación

**Figura 2.1:** Mecanismo de oxidación a siringaldazina por acción de lacasas para dar una quinona violeta

**Figura 2.2:** Mecanismo de reacción de acoplamiento de MBTH con DMAB para dar un cromóforo azulado por acción de MnP

**Figura 2.3:** Conversión de alcohol veratrílico a veratraldeído por acción de LiP

**Figura 3.1:** Estructura de grupos químicos antraquinona, trifenilmetano, xantenos, tiazina y azo.

**Figura 3.2.1:** Colorantes químicos del grupo AZO y XNT empleados para el cribado de la capacidad de decoloración de *P. atropurpurascens*.

**Figura 3.2.2:** Colorantes químicos del grupo TFM y TZN empleados para el cribado de la capacidad de decoloración de *P. atropurpurascens*.

**Figura 3.3:** A- Colorantes químicos degradados por *P. chrysosporium*. B-Ensayo de decoloración en placa

**Figura 3.4:** Colorantes susceptibles a la degradación en *A. nidulans*.

**Figura 3.5:** Espectro de absorbancia de cultivos de *P. atropurpurascens* con Naranja de metilo

**Figura 3.6:** A- Velocidad de crecimiento (Vcre); B- Velocidad de decoloración (Vdec) de *P. atropurpurascens*.

**Figura 5.1:** Estructura molecular de colorantes tipo ANQ, TZN y XNT.

**Figura 3.7:** Seguimiento de la decoloración de Azul de Timol por *P. atropurpurascens* en función de los días.

**Figura 3.8:** Biomasa (g) producida en medio de cultivo EM y suplementado con *chips* de madera en función del tiempo (días)

**Figura 3.9:** Actividad enzimática MnP y Lcc de *P. atropurpurascens* en presencia de madera

**Figura 3.10:** Cuantificación de biomasa y de actividad enzimática MnP y Lcc de *P. atropurpurascens* en presencia de colorantes.

**Figura 3.11.** Curva de crecimiento *P. atropurpurascens* en AMP.

**Figura 3.12:** Árbol de similitud de las secuencias proteicas de manganeso-peroxidasas obtenido en el programa ClustalW a partir del alineamiento de las secuencias.

**Figura 3.13:** Árbol de similitud de las secuencias proteicas de lacasas obtenido en el programa ClustalW a partir del alineamiento de las secuencias.

**Figura 3.14:** Representación de aminoácidos del sitio activo de Lcc de *Trametes Versicolor* que coordinan los átomos de cobre en T1, T2 y T3.

**Figura 3.15:** qPCR con cebadores específicos de los genes *gdpC*, *sarl*, *phos* y *pep*.

**Figura 3.16:** Análisis de la estabilidad de los genes de referencia evaluados por el algoritmo geNorm

**Figura 3.17:** Expresión relativa de genes *mnp* referida a 0,5%EM incubado 3 días (condición control).

**Figura 3.18:** Expresión relativa de los genes *mnp* de *P. atropurpurascens* en presencia de colorantes *versus* ausencia de colorante

**Figura 3.19:** Curva de fluorescencia de la amplificación de los genes *lcc4*, *lcc2*, *lcc5*, *lcc11* y *lcc10*.

**Figura 3.20:** Expresión relativa de genes *lcc* referida a 0,5%EM incubado 3 días (condición control).

**Figura 3.21:** Expresión relativa de los genes *lcc* de *P. atropurpurascens* en presencia de colorantes *versus* ausencia de colorante

**Figura 4.1:** Estructuras de los colorantes Cristal violeta y Verde malaquita

**Figura 4.2:** A- Mecanismo de degradación de Verde malaquita por MnP de *Irpex lacteus*.

**Figura A.1:** Estructura molecular de colorantes tipo ANQ, TZN y XNT.

**Figura A.2:** Estructura molecular de colorantes tipo TFM.

**Figura A.3:** Estructura molecular de colorantes tipo AZO.

**Figura A.4:** Seguimiento del crecimiento del micelio de *P. atropurpurascens* en función de los días.

**Figura A.5:** Seguimiento de la decoloración de colorantes por *P. atropurpurascens* en función de los días.

**Figura A.6:** Medida de Potencial (V) a circuito abierto en función del tiempo.

**Figura A.7:** Aminoácidos de unión a manganeso en MnP de *P. atropurpurascens* verificadas.

**Figura A.8:** Secuencias conservadas en Lcc.

**Figura A.9.** Alineamiento de secuencias genómicas y transcriptómicas *mnpB1* y *mnpB2*.

**Figura A.10.** Alineamiento de proteínas deducidas MnPB1 y MnPB2.

**Figura A.11:** Alineamiento de secuencias transcriptómicas *mnpB1*, *mnpB2* y *mnpF*

## Lista de Tablas

**Tabla 2.1:** Parámetros del ensamblado genómico

**Tabla 2.2:** Cebadores específicos diseñados para qPCR de genes de referencia

**Tabla 2.3:** Cebadores específicos diseñados para qPCR de genes *lcc*

**Tabla 2.4:** Cebadores específicos diseñados para qPCR de genes *mnp*

**Tabla 3.1:** Parámetros de decoloración de *P. atropurpurascens* y *P. chrysosporium*

**Tabla 3.2:** Potencial de reducción colorantes medido a potencial abierto.

**Tabla 3.3:** Tamaño teórico de MnP de *P. atropurpurascens*.

**Tabla 3.4:** Tamaño teórico de MnP de *P. atropurpurascens*

**Tabla 3.5:** Temperatura de *melting* de los amplicones de los genes de referencia candidatos

**Tabla 3.6:** Análisis de la expresión génica por NormFinder

**Tabla 3.7:** Temperatura de *melting* ( $T_m$ ) de los productos de PCR para los diferentes genes *lcc* y *mnp*

**Tabla 3.8:** Expresión relativa de genes *mnp* en presencia de colorantes.

**Tabla 3.9:** Actividad enzimática MnP (AE, UE/mL) del sobrenadante de cultivo con y sin colorantes, normalizada por la masa del micelio (g). SD: desviación estándar.

**Tabla 3.10:** Expresión relativa de genes *lcc* en presencia de colorante *versus* ausencia de colorante

**Tabla 3.11:** Actividad enzimática Lcc (AE, UE/mL) normalizada por la masa del micelio (g) de las muestras en las que se analizó la expresión relativa de los genes

# 1. Introducción

## 1.1 El origen de la lignina: el nacimiento de las plantas vasculares

Hace cerca de 450 millones de años, las plantas vasculares comenzaron a erguirse en la superficie terrestre. Se cree que algas, fueron arrastradas hacia las costas marinas hace 500 millones de años donde se vieron sometidas al ambiente terrestre <sup>1,2</sup>. La radiación UV-B, la falta de estructuras de soporte, la disecación y estrés y la presencia de herbívoros y patógenos fueron algunos de los desafíos con los que se encontraron estos organismos <sup>1,2</sup>. Pero durante su historia evolutiva, estas plantas primitivas lograron desarrollar metabolismos especializados para soportar las adversidades y dominar la superficie terrestre. Uno de los eventos claves fue la evolución del metabolismo de los fenilpropanoides. La capacidad de depositar fenoles que absorben luz en un rango de absorbanza entre 280-320 nm permitió enfrentar el daño de los rayos UV-B <sup>3</sup>. No fue hasta la aparición de las *tracheophytas* que las plantas lograron realmente florecer en la superficie terrestre y este evento crítico pudo estar relacionado al depósito de lignina en las paredes celulares <sup>2</sup>.



**Figura 1.1:** Representación ilustrativa de la evolución de plantas vasculares, creado por el artista Tom Phillips.

La lignina brindó rigidez estructural, lo cual les permitió erguirse, soportar la presión negativa de la transpiración y fortalecer las paredes celulares de los compartimentos transportadores de agua, y en consecuencia expandir su tamaño <sup>1,2,4</sup>. La primera molécula de lignina probablemente se construyó a partir de la unión oxidativa de numerosos alcoholes de fenilpropanoides simples para formar el polímero. La naturaleza y las uniones diversas convirtieron a esta molécula en un escudo protector contra el ataque de depredadores, siendo uno de los biopolímeros más duros de degradar. La lignina pronto sería el mayor depósito de carbono en las plantas, viéndose superado únicamente por la celulosa. El material rico en lignina enterrado en los pantanos durante el período carbonífero se fosilizó en carbono y se convirtió en una de las mayores reservas de combustibles fósiles y un gran impulsor de la industrialización humana <sup>2,5</sup>.

## 1.2 Lignina

Las paredes celulares de las plantas tienen roles biológicos fundamentales durante las etapas de crecimiento y desarrollo de la planta, como la regulación de la expansión y forma de la célula, control de la cohesión de los tejidos, intercambio iónico y defensa contra microorganismos invasores <sup>6,7</sup>. La mayoría del carbón fijado se acumula como polímeros de la pared, lo que convierte a las paredes celulares en la fuente de más abundancia de biomasa terrestre y energía renovable <sup>6</sup>. La lignina junto a la celulosa y la hemicelulosa son de los principales componentes de la pared celular de las plantas y están estrechamente asociados <sup>4</sup>.

La celulosa está formada de cadenas de unidades  $\beta$ -1,4 D-glucosa y se encuentra formando fibras que están integradas con un *set* de polisacáridos más solubles, conocidos como la hemicelulosa y pectina. La celulosa se dispone en la forma de microfibrillas unidas entre ellas por enlaces de hidrógeno. Puede existir en varios polimorfismos cristalinos (insolubles) o en estados amorfos (regiones solubles). En el formato amorfo, las

microfibrillas están menos compactas y son más susceptibles a ser hidrolizadas por celulasas <sup>8</sup>.

La hemicelulosa está formada de cadenas polisacáridas más cortas y ramificadas que la celulosa. Su estructura primaria está formada de residuos  $\beta$  1-4 D-hexosas principalmente xilano, glucuronoxilano, xiloglucano, arabinoxilano, glucano de enlace mixto o glucomanano. También puede contener ácido urónico. Otros azúcares como la  $\alpha$ -L-ramnosa y la  $\alpha$ -L-fucosa pueden estar presentes y los grupos hidroxilos de los azúcares pueden estar sustituidos con grupos acetilos <sup>6,8</sup>

La lignina es la sustancia que más componentes aromáticos tiene en la naturaleza. Es un polímero formado de alcoholes hidroxicinámicos que se diferencian entre ellos por su grado de metoxilación como el alcohol sinápico, p-cumárico y ferúlico (Figura 1.2) <sup>6,8,9</sup>. Estos tres monómeros se unen a través de acoplamiento radicalario para dar unidades de p-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringuilo (S)<sup>9</sup>. La lignina H y G está presente en todas las plantas vasculares, pero la lignina S se limita a ciertos linajes como por ejemplo las Selaginéláceas <sup>1,2</sup>.

La síntesis de lignina es parte final de la diferenciación de las células del xilema. La polimerización de lignoles sobre la capa S3 de la pared celular, precede a la síntesis de celulosa y hemicelulosa en la capa S2 (Figura 1.3) <sup>4</sup> Una vez que los monolignoles son sintetizados y transportado hacia la pared celular secundaria, son dehidrogenados por una batería de enzimas tipo lacasas, peroxidasa, polifenol oxidasas y confieril alcohol oxidasas <sup>4</sup>. La polimerización es iniciada entonces por la formación de radicales libres de monolignoles, que se van agregando al entramado de crecientes unidades de lignina. Las uniones de este polímero son muy diversos (pueden formarse hasta 12 tipos de uniones covalentes diferentes) y el tipo de unión va a estar dictado por el tipo de monolignol disponible <sup>1,4,9</sup>. Las uniones más comunes son las uniones  $\beta$ -O-4 ( $\beta$ -aril éter) (Figura 1.2). Las otras posibles tipos de uniones son  $\beta$ -5,  $\beta$ - $\beta$ , 5-5, 5-O-4 y  $\beta$ -1 <sup>9</sup>. El enlace

$\beta$ -O-4 es el tipo de enlace menos resistente de todos los posibles enlaces y es el más lábil a ser hidrolizado <sup>9</sup>.

La composición de los monómeros y el tipo de unión covalente varía ampliamente dependiendo del tipo de planta y el tipo de tejido. Su composición hace que sus propiedades fisicoquímicas sean variables y adaptables a su función biológica <sup>1</sup>. La complejidad de la lignina también significa que su biodegradabilidad se vea limitada, ya que los métodos enzimáticos clásicos como la hidrólisis no funcionan. Por ende, su estructura obliga a que el ataque inicial sea oxidativo, inespecífico y extra celular debido a su gran tamaño <sup>4</sup>.

Debido a que el alcohol sináplico no puede tener enlaces tipo  $\beta$ -5', 5'-5', 4-O-5' como sí pueden tener los monómeros G y H, esto conlleva a que los monómeros S estén menos condensados. La lignina de la madera dura está compuesta predominantemente de monolignoles G y S, con rastros de lignina H, mientras que la lignina de la madera blanda está compuesta principalmente de unidades G. Las plantas herbáceas tienen las tres unidades en diferentes proporciones <sup>8</sup>.

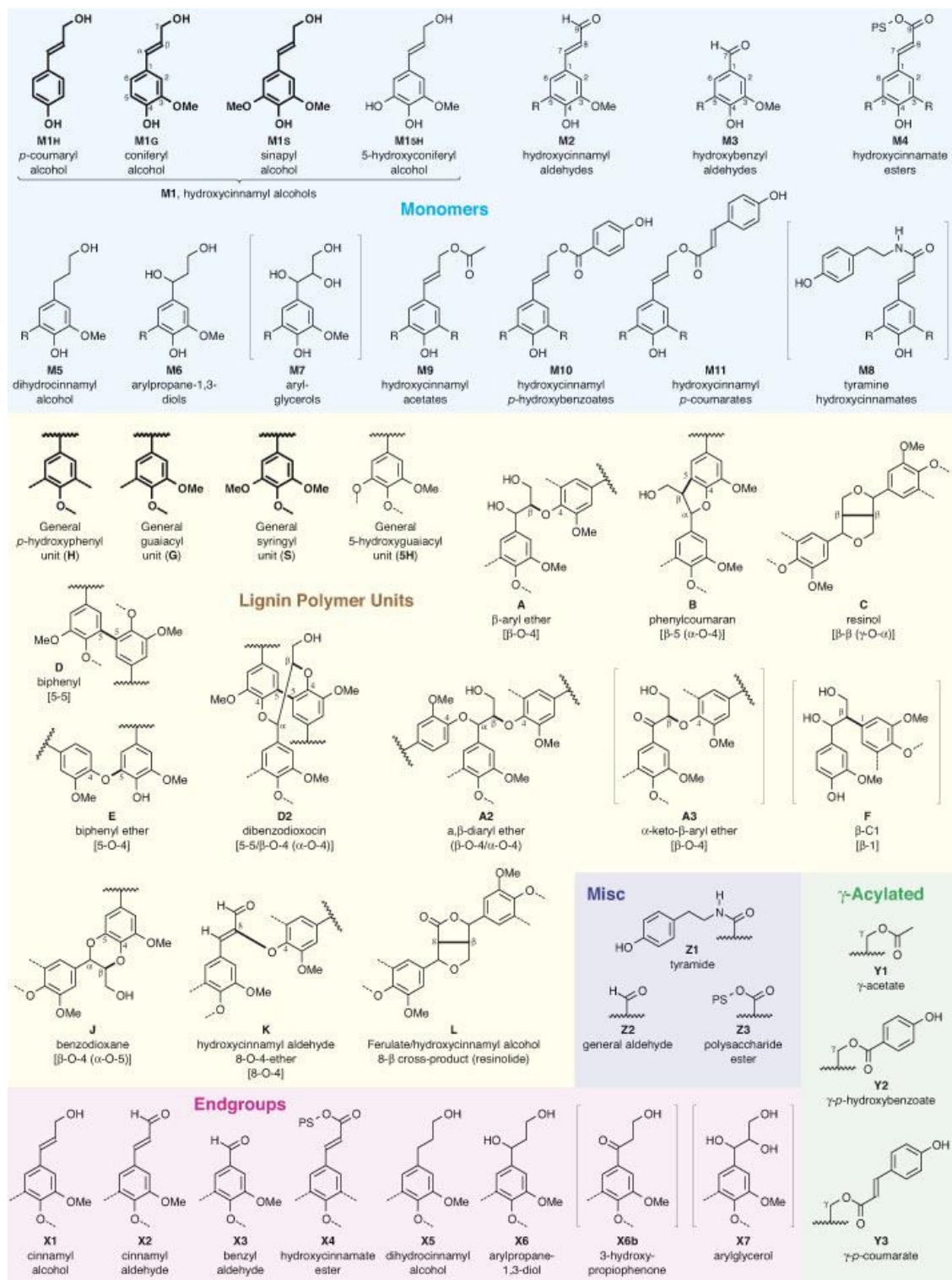
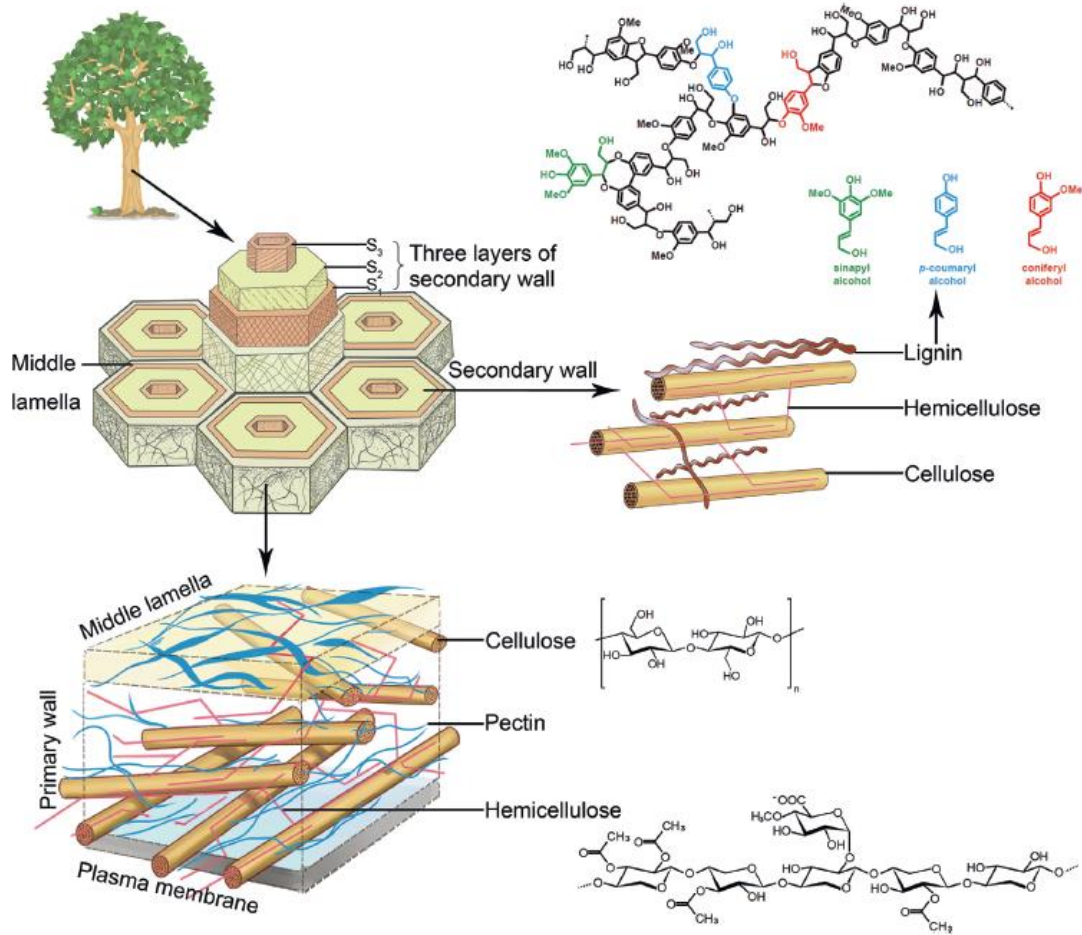


Figura 1.2: Descripción de los sustituyentes del ácido hidroxicinámico<sup>9</sup>.

### 1.2.1 Estructura de las paredes celulares vegetales

La recalcitrancia de la lignocelulosa deriva principalmente de su estructura dispuesta dentro de la pared celular, la cual es un entramado de polisacáridos entrecruzados, proteínas glicosiladas y lignina. Esta representa una importante barrera física y química al ataque de patógenos<sup>8</sup>.

Las paredes de las células vegetales tienen una estructura en multicapas que consisten en la lamela media, la pared primaria y la pared secundaria (Figura 1.3)<sup>8</sup>. Las células están cementadas con sus vecinas mediante la lamela media. Esta estructura está formada de polisacáridos de pectina y pequeñas proteínas. Una vez que se termina de formar la lamela media, luego de finalizada la mitosis, se forma la pared primaria que está formada de microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de polisacáridos y glicoproteínas. Algunas plantas cuentan solo con la pared primaria, mientras que en otras dentro de la pared primaria se deposita la pared secundaria, luego que el crecimiento de la célula cesa. La pared secundaria se subdivide en S1, S2 y S3 (Figura 1.3), esta es especialmente importante en células que requieren de soporte mecánico o forman parte de estructuras transportadoras de agua, por ejemplo, tejidos del xilema. Las paredes secundarias contienen mayoritariamente celulosa (40-80%), hemicelulosa (10-40%), lignina (5-25%) y proteínas de la pared celular<sup>6,8</sup>. Las proporciones de cada compuesto de las plantas celulares varía en diferentes proporciones y partes de la planta. Generalmente la biomasa leñosa tiene mayor cantidad de celulosa y lignina, mientras que la biomasa de hierba tiene mayor contenido de hemicelulosa, particularmente xylano, extractivos y cenizas<sup>8</sup>.



**Figura 1.3.** Ilustración esquemática de las estructuras y los principales componentes de las paredes celulares de las plantas. En el diagrama se pueden ver las estructuras de la pared celular como la lámina media, la pared primaria y la pared secundaria, así como la organización de las microfibrillas de celulosa y las capas S1, S2 y S3 de la pared celular secundaria <sup>6</sup>.

### 1.3 Hongos degradadores de la madera

La revolución industrial estuvo marcada por el uso extensivo del carbón. Este material fue el que provocó una revolución y transformación económica, tecnológica y social sin precedentes en la historia humana. Pero el origen del carbón data de hace millones de años, en el Carbonífero <sup>5</sup>. Este período geológico se caracterizó por la acumulación del carbón, compuesto formado de restos fosilizados de plantas, principalmente de lignina.

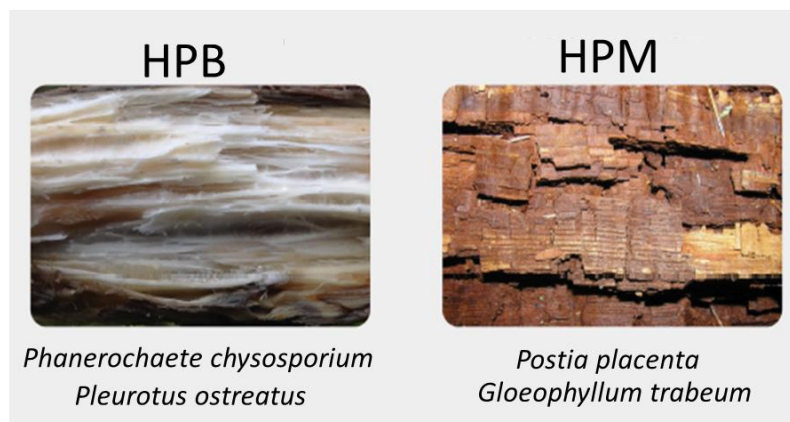
Pero el carbono se dejó rápidamente de acumular al final de este período y los hongos parecían ser un elemento clave en este suceso <sup>10</sup>.

El investigador Dimitrios Floudas y un equipo de 71 investigadores, publicó en el 2012 un estudio que indicaría que el cese de la acumulación de carbón se vio vinculado con el desarrollo de la capacidad de los hongos en degradar lignina enzimáticamente. Esto implicó que se comenzaran a descomponer grandes acumulaciones de restos de madera, que de otra forma se hubieran fosilizado en carbón <sup>11</sup>. El desarrollo de este sistema oxidativo fue el que posteriormente permitió a los hongos colapsar la malla de lignina que rodea la celulosa y poder alimentarse de las subunidades glucosídicas <sup>10</sup>. Se cree que otro elemento clave en el rápido aumento de genes que codifican para oxidoreductasas fue la alta concentración de oxígeno en la atmósfera (superior al 35%) <sup>12,13</sup>. Este ambiente altamente oxidante puede haber sido un impulsor de los mecanismos redox que permitieron catalizar la degradación oxidativa de la madera <sup>13</sup>. Cabe destacar que esta hipótesis ha sido muy discutida y otros autores refieren a las condiciones geológicas y climáticas como responsables a este cambio abrupto en el depósito de carbono y el surgimiento de los hongos degradadores de la madera como una coincidencia en la línea temporal <sup>12</sup>.

El trabajo de Floudas y colegas, se basó en el estudio y comparación de 31 genomas de un grupo de hongos llamados Agaricomycetes con el fin de rastrear la evolución de las enzimas lignolíticas. El grupo de Agaricomycetes incluyen a los hongos de la podredumbre blanca (HPB), a los hongos de la podredumbre marrón (HPM) y a especies de ectomicorrizas. Los hongos de la podredumbre blanca son basidiomicetes capaces de destruir la lignina, hemicelulosa y celulosa de las paredes celulares, mientras que los hongos de la pudrición marrón no pueden mineralizar la lignina (solamente la pueden modificar) pero si pueden metabolizar hemicelulosa y celulosa <sup>11</sup>. Según los resultados de este estudio un HPB sería el ancestro más antiguo de los Agaricomycetes y su origen data

de unos 300 millones de años. Por otra parte, los hongos de la podredumbre marrón y otras especies de micorrizas, perdieron esta habilidad de degradar lignina enzimáticamente ya que desarrollaron otros mecanismos de penetración <sup>10</sup>.

Los hongos llevan su denominación marrón y blanca, por el aspecto que dejan sobre la madera una vez que comienzan a actuar. El color y la textura de la lignocelulosa resultante es un claro indicador de la batería enzimática que se pone en juego (Figura 1.4) <sup>14</sup>.



**Figura 1.4:** Diferentes aspectos de la madera atacada por hongos de la podredumbre blanca (HPB) y marrón (HPM). Modificado de <sup>14</sup>.

### 1.3.1 Hongos de la podredumbre blanca

Los HPB son los únicos microorganismos conocidos que pueden mineralizar completamente lignina en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O <sup>4</sup>. Estos hongos codifican en su genoma una serie de enzimas de alto poder redox del tipo peroxidasa y lacasas. Estas proteínas son las encargadas de actuar sobre la depolimerización de la lignina abriendo camino hacia la celulosa, la principal fuente de energía y carbono en estos hongos <sup>4,14,15</sup>.

El grupo de HPB es muy heterogéneo en cuanto a su accionar sobre la madera e incluye mayoritariamente cepas de basidiomicetes y sólo unos pocos ejemplares de ascomicetes<sup>15</sup>. Algunos hongos pueden deslignificar selectivamente, es decir, sin

degradar las porciones de celulosa o hemicelulosa, como es el caso de *Ganoderma australe* y *Phlebia radiata*. Otros HPB como *Trametes versicolor* e *Irpex lacteusare* degradan lignina y celulosa de forma simultánea <sup>4,15</sup>.

### 1.3.2 Hongos de la podredumbre marrón

Algunos ejemplos de este grupo de hongos son *Coniophora puteana* (orden Boletales), *Postia placenta* (orden Polyporales), *Fistulina hepatica* (orden Agaricales), *Neolententinus lepideus* (orden Gloeophyllalesse) y *Dacryopinax primogenitus* (orden Dacrymycetes)<sup>13</sup>. Se piensa que evolutivamente, los hongos de la podredumbre marrón, son subsecuentes a los HPB y aparecen luego de la pérdida de enzimas peroxidadas <sup>11,14</sup>. Su principal mecanismo de apertura hacia el interior de las fibras de celulosa es mediante la dimetilación, la escisión del enlace éter  $\beta$ -O-4 y la oxidación de las cadenas laterales. Se cree que estas modificaciones se dan principalmente por reacciones no enzimáticas denominadas reacciones de Fenton <sup>11,13</sup>. Las reacciones de Fenton son reacciones redox que dan como resultado radicales hidroxilo a partir de la reacción química entre peróxido de hidrógeno y un ión de hierro ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ ). Esta reacción ocurre dentro del llamado mecanismo CMF (reacción de Fenton mediada por agentes quelantes) donde en una primera etapa el ácido oxálico, producido por el metabolismo del hongo, ayuda a la solubilización de hierro en el lumen. En este estado, el hierro se une a las paredes celulares generando un entorno ácido que favorece la formación del complejo oxálico-hierro el cual difunde a través de poros de la pared celular secundaria. En este compartimento el hierro se disocia del complejo por un aumento en el pH y es reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  que reacciona con peróxido de hidrógeno. Se cree que pequeñas moléculas aromáticas, como por ejemplo dímeros o monómero de lignina, podrían actuar de agente reductor <sup>13</sup>. A diferencia de los HPB que utilizan hidrolasas para despolimerizar la

celulosa, se cree que estos mecanismos oxidativos también son empleados por los HPM para romper los enlaces glucosídicos <sup>16</sup>.

Un elemento común en los HPB y HPM es la presencia de oxidasas como glioxal oxidasas y aril alcohol oxidasas, enzimas productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este subproducto sería la base de reacciones peroxidativas enzimáticas en el caso de los HPB y no enzimáticas, en el caso de HPM. En ambos casos, el fin sería el mismo: lograr vencer la barrera lingolítica <sup>13,14,17,18</sup>.

## 1.4 Enzimas lignolíticas

Debido a la alta variabilidad de enlaces presentes en la estructura de la lignina, las enzimas actuantes deben ser altamente inespecíficas. Por otro lado, las enzimas oxidorreductasas tienen preferencia sobre las hidrolasas, ya que pueden actuar sobre los enlaces C-C <sup>19</sup>. Debido a que estas enzimas tienen un rol fundamental en la biología de los HPB que las presentan, se ha visto que a nivel genético se encuentran en múltiples copias <sup>11</sup>.

Las lacasas (Lcc), manganeso peroxidasas (MnP), lignino peroxidasas (LiP) y peroxidasas versátiles (VP) son postuladas como las enzimas en la primera línea de descomposición de la lignina <sup>19</sup>.

### 1.4.1 Lacasas

Las lacasas, también conocidas como fenol oxidasas del tipo multicobre (EC 1.10.3.2; AA1 CAZy), son glicoproteínas que utilizan el oxígeno molecular como aceptor final de electrones para llevar adelante la oxidación de fenoles y aminas aromáticas. Los productos oxidados, serán a continuación, responsables de la despolimerización de la lignina. La oxidación de los sustratos fenólicos se da a través de la remoción de un electrón de un grupo hidroxilo para formar radicales hidroxifenilos <sup>14,19,20</sup>.

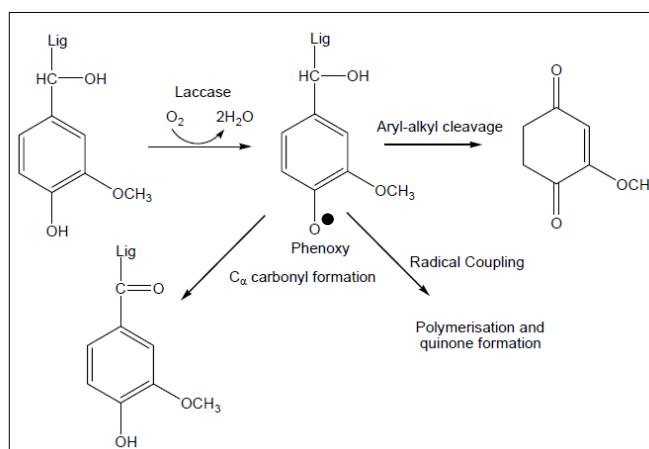
A nivel estructural, las lacasas tienen 4 regiones conservadas que contienen una cisteína y 10 residuos de histidina que forman una "caja quelante," donde se retienen los átomos de cobre en el sitio activo <sup>19,20</sup>. Estos sitios de unión al cobre se identifican como T1 ( tipo 1, une un átomo de cobre), T2 (tipo 2, une un átomo de cobre) y T3 (tipo 3, une dos átomos de cobre) <sup>20</sup>. El sitio T1 es donde se une al sustrato en forma reducida y los sitios T2/T3 se disponen formando un *cluster* trinuclear donde se va a unir el oxígeno molecular (Figura 1.6) <sup>21</sup>. Los sitios exhiben diferentes potenciales redox según la fuente de la que provengan. Por ejemplo, en *Neurospora crassa* y en *T. versicolor*, T1 tiene un potencial de 780-800 mV mientras que en *Rhus vernicifera* T1 tiene un potencial de 460 mV a pH 7.5 <sup>20</sup>.

Es importante destacar que las lacasas no son capaces de oxidar directamente aquellos compuestos de potencial de redox superior al del potencial del ión de cobre T1 <sup>22</sup>. El potencial redox de las lacasas (+0,42 - +0,79 mV) no es lo suficientemente alto para oxidar moléculas no-fenólicas (+1.3 V o superior), a diferencia de las peroxidasa <sup>14,22</sup>. Esta limitación se ve subsanada a través de la utilización del sistema mediador de lacasa, que le permite no solo oxidar moléculas de potencial redox mayor sino también moléculas grandes que no pueden acceder al sitio activo <sup>21,22</sup>. El mediador, que puede ser por ejemplo, un monómero lignolítico, es oxidado por la lacasa, y el cual puede difundir dentro de la estructura de la lignina para oxidar compuestos "no sustrato" a través de una reacción no enzimática <sup>14,22</sup>. Los mediadores lignolíticos son moléculas de bajo peso molecular y con un potencial redox lo suficientemente bajo como para poder ser oxidado por la lacasa <sup>22</sup>. Los mecanismos de acción de los mediadores pueden ser clasificados en mecanismo de transferencia de electrones, oxidación iónica y transferencia de radical hidrógeno <sup>23</sup>.

La mayoría de los HPB producen varias isoformas de lacasas de entre 520-550 aminoácidos, que pueden ser encontrados en forma monomérica o de dímero. En el

genoma de los hongos, estos genes se pueden encontrar en numerosas copias <sup>19,20</sup>. Por ejemplo, el *cluster* de lacasas del hongo *Pleurotus ostreatus* consiste en 12 genes. Estas isoformas comparten entre 45-89% de homología en su estructura primaria <sup>19</sup>. A diferencia de los *Ascomycetes*, los basidiomicetes tienen mayor cantidad de intrones en su secuencia (hasta 19). Este número hace que los números de las posibles variables de lacasas por *splicing* alternativo, aumenten, pero hasta el momento nadie ha comprobado que este mecanismo suceda en lacasas <sup>19</sup>.

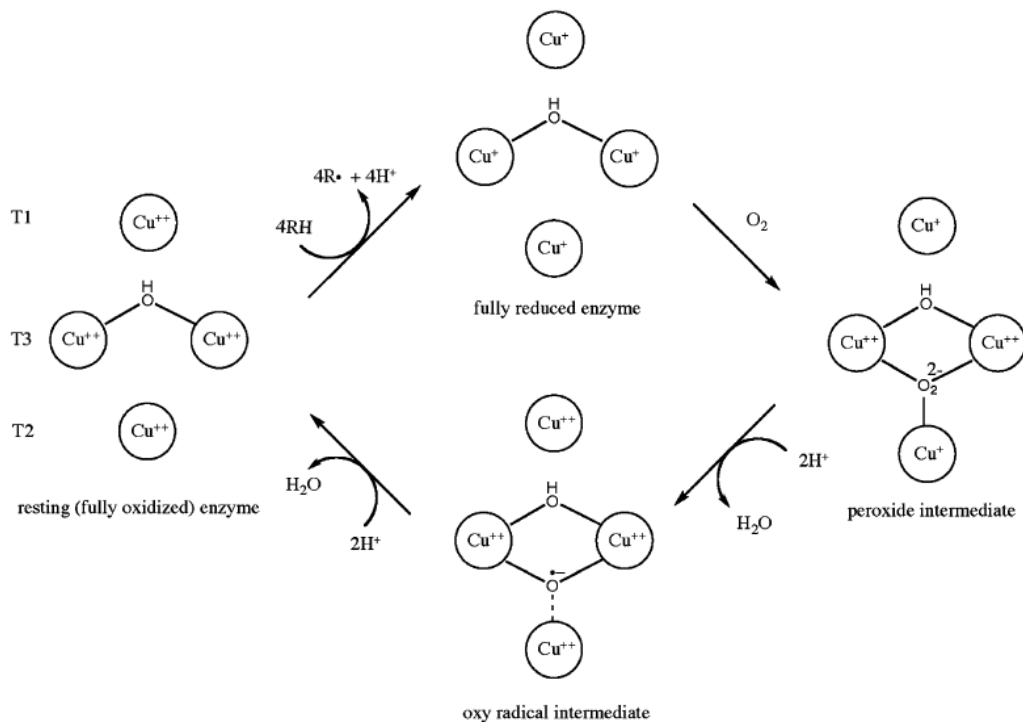
Su mecanismo de acción se basa en la extracción de un electrón del grupo hidroxilo de fenoles utilizando al oxígeno molecular como aceptor final ( $4RH + O_2 \rightarrow 4R^* + 2H_2O$ ). De esta reacción redox se forma un radical fenoxi que va a participar de reacciones oxidativas no enzimáticas, como puede ser la polimerización de dímeros u oligómeros mediante enlaces C-C, C-O y C-N o la formación quinonas mediante rearrreglos (Figura 1.5). Estas reacciones radicalarias también pueden dar lugar a la escisión de las uniones  $C\alpha-C\beta$ , oxidación del  $C\alpha$ , escisión de la unión alquilo-arilo y la ruptura del anillo aromático <sup>20,22</sup>.



**Figura 1.5:** Oxidación de subunidades fenólicas de lignina por parte de lacasas <sup>21</sup>.

El ciclo catalítico comienza por la reducción del cobre  $Cu^{2+}$  a  $Cu^+$  del sitio T1 (Figura 1.6), como consecuencia de la oxidación monoelectrónica de una molécula de sustrato. Este mecanismo sucede de forma secuencial un total de cuatro veces, por lo que en cada ciclo

se oxidan cuatro moléculas fenólicas/aminas aromáticas. Los electrones son transferidos al sitio trinuclear T2/T3, donde se acumulan los electrones. La reducción del oxígeno molecular a agua ocurre en dos pasos vía la formación de un intermediario peróxido. Esta forma molecular decae rápidamente a un radical oxy que pasa para por clivaje reductivo de 2 e<sup>-</sup> del enlace O-O junto a la producción de una molécula de agua. Luego ocurre una transferencia de un electrón desde T2 al intermediario, facilitado por la protonación del ácido carboxílico del residuo próximo al sitio activo. En el último paso todos los iones de cobre regresan a su estado oxidativo inicial y el O<sup>-2</sup> es liberado como una molécula de agua <sup>20</sup>.



**Figura 1.6:** Ciclo catalítico de lacasa <sup>20</sup>. El ciclo comienza con la reducción de los iones cobre en los sitios T1,T2/T3 y la oxidación paralela de cuatro moléculas de sustrato. El oxígeno que actúa como aceptor de electrones, es captado por el *cluster* trinuclear, formándose un intermediario peróxido que luego es reducido por la protonación y formación de dos moléculas de agua.

En las plantas, las lacasas están involucradas en la respuesta a heridas y participan junto a las peroxidasas en la síntesis de lignina. En los hongos, las lacasas tienen un rol muy importante en la pigmentación de las esporas, en la detoxificación de los compuestos

fenólicos producidos durante la degradación de lignina y junto con las peroxidasas, son las encargadas de la descomposición lingolítica <sup>20</sup>.

### 1.4.2 Peroxidasas

Las peroxidasas son enzimas que basan su capacidad oxidante en el uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como cosustrato. Los tres principales tipos de enzimas que actúan sobre la conversión de lignina son las lignino peroxidasa (LiP), las manganeso peroxidasa (MnP) y las peroxidasas versátiles (VP). Estas enzimas pertenecen a la clase II de peroxidasas dentro de la superfamilia de las peroxidasas-catalasas. Todos los miembros de este grupo contienen como grupo prostético protoporfirina IX <sup>14,24</sup>. Recientemente, se ha identificado tanto en hongos como en bacterias una nueva superfamilia de hemoperoxidasas denominadas DyP (*dye-peroxidases*, peroxidasas decolorantes) y hemo-tiolato peroxidasas (HTP), identificadas por la forma de su plegamiento y por tener residuos típicamente encontrados en zonas de unión al grupo hemo <sup>11</sup>. Se cree que las DyP también podrían tener un rol importante en la degradación de lignina, pero para las HTP no está muy definida su función en la oxidación lingolítica <sup>11,24</sup>.

#### *1.4.2.1 Manganeso peroxidasa*

Las MnP (EC 1.11.1.13) son peroxidasas glicosiladas que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos, en una reacción dependiente de la oxidación de Mn(II) a Mn(III) <sup>25</sup>. Estas enzimas contienen un grupo hemo y su peso molecular oscila entre los 38- 62,5 kDa, promediando en 45 kDa <sup>19</sup>. El sitio activo está formado de tres grupos ácidos (dos Glu y un Asp) que unen el ión manganeso <sup>11,26</sup>.

La primera MnP extracelular aislada fue de *Phanerochaete chrysosporium*, y se ha visto que su expresión puede ser regulada por la presencia del ion Mn<sup>2+</sup> en el medio de cultivo <sup>20</sup> La presencia de los genes *mnp* se limita a los genomas de algunas familias de basidiomicetes como los *Agaricales*, *Corticiales*, *Polyporales* e *Hymenochaetales* <sup>19</sup>. Estructuralmente, la proteína MnP está compuesta de 330-370 aminoácidos y contiene

secuencias MAF y AAP conservadas en el N-terminal que corresponden a señales de exportación. Las MnPs se pueden describir como una serie de isoenzimas que son codificadas y reguladas por diferentes genes <sup>20</sup>. En el microorganismo *Ceriporiopsis (Gelatoporia) subvermisporea*, se han descrito hasta 11 diferentes isoformas de MnP [11].

Las manganeso peroxidasas catalizan principalmente la escisión de enlaces C $\alpha$ -C $\beta$ , la oxidación C $\alpha$ -H y enlaces alquilo-arilo dentro de las fenoles de la lignina <sup>23</sup>. Su modalidad de conversión de la lignina se da a través de un mecanismo indirecto, donde oxida Mn<sup>+2</sup> a Mn<sup>+3</sup>.

El ciclo catalítico (Figura 1.7) se inicia cuando la enzima nativa reacciona con peróxido de hidrogeno o un peróxido orgánico, oxidándose el átomo de hierro del grupo hemo (complejo 1). Este se convierte rápidamente en un compuesto II por oxidación de un equivalente de Mn(II) resultando la formación del Mn(III). Una segunda unidad de Mn(II) reduce al compuesto II a la forma nativa (Fe(III)) y genera otro ion Mn(III). El Mn(III) formado está involucrado en la oxidación de varios sustratos fenólicos. La enzima utiliza Mn(II)/Mn(III), como pareja redox obligatoria para oxidar sustratos fenólicos terminales de la lignina <sup>27,28</sup>.



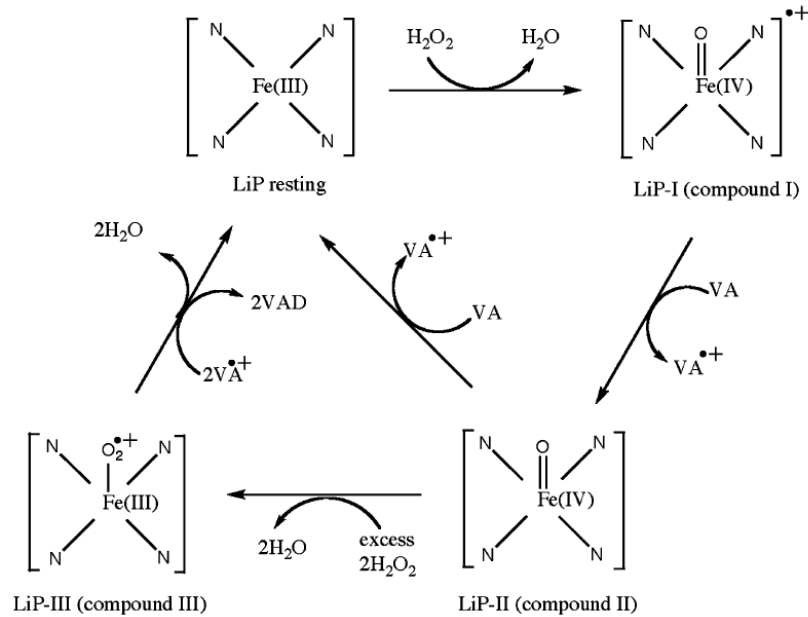
### 1.4.2.2 Lignino peroxidasas

Las lignino peroxidasas (EC 1.11.1.14, AA2 CAZy) pertenecen a la clase II de la superfamilia de peroxidasas. Son glicoproteínas monoméricas que contienen un grupo hemo y catalizan la depolimerización oxidativa de lignina en una reacción dependiente de  $H_2O_2$  <sup>14,20</sup>.

Al igual que las MnP, las LiP fueron aisladas por primera vez de *P. chrysosporium* y se conocen varias isoformas en este microorganismo y en numerosos HPB <sup>20</sup>. Estas glicoproteínas tienen un peso molecular de entre 38-56 kDa y están formadas de una cadena de 343- 345 aminoácidos <sup>19,20</sup>. Tiene un potencial estándar de reducción alto, cercanos a los + 1,2 V (en comparación a un electrodo estándar de hidrógeno a pH=3), puede oxidar porciones fenólicas como no fenólicas de la lignina <sup>14,19</sup>. A diferencia de las MnP, estas enzimas no pueden catalizar la oxidación de manganeso. Esta enzima posee un Trp catalítico sobre su superficie que permite la oxidación de moléculas de alto potencial redox mediante un mecanismo denominado transferencia de electrones de largo alcance <sup>31</sup>.

Su ciclo catalítico tiene dos pasos (Figura 1.8):

- 1- La enzima reacciona con una molécula de peróxido de hidrógeno y ocurre una oxidación de dos electrones sobre el  $Fe^{+3}$  del centro catalítico para dar lugar al compuesto I, un catión radical de hierro  $Fe^{4+}$ . Los electrones son utilizados para clivar el enlace O-O del peróxido de hidrógeno (sustrato) y dar una molécula de agua <sup>20,28</sup>.
- 2- Dos moléculas de sustrato son oxidadas consecutivamente mediante la reducción de un electrón del compuesto I para volver al estado nativo <sup>20</sup>. La primera reacción de oxidación da lugar a la formación del complejo II ( $Fe(IV)=O$ ) y a un radical catiónico. La segunda reacción de reducción de 1 e- devuelve el estado oxidativo enzimático original <sup>20,28</sup>.



**Figura 1.8:** Ciclo catalítico de LiP <sup>20</sup>. El ciclo catalítico tiene dos pasos, donde la enzima atraviesa dos estados oxidativos (compuesto I y compuesto II) antes de volver a su estado de reposo. En el proceso de oxidación de dos moléculas de alcohol veratrílico (AV). En ausencia de sustrato y exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se puede formar el compuesto III, que puede ser revertido en presencia de AV en estado de catión radical <sup>20,32</sup>.

Se ha visto que el alcohol veratrílico (AV) puede actuar como sustrato en el ciclo redox de LiP. El radical formado libre puede continuar en una variedad de reacciones oxidativas no enzimáticas <sup>28,32</sup>. También, como otras peroxidasas, LiP puede ser inhibida por el exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (compuesto III) y ausencia de sustrato, pero puede ser estabilizada nuevamente en presencia de AV <sup>20,32</sup>.

### 1.4.2.3 Peroxidasas versátiles

Las peroxidasas versátiles (EC 1.11.1.16, AA2 CAZy) son enzimas que combinan la estructura molecular tanto de MnP como de LiP<sup>24</sup>. Son capaces de oxidar tanto Mn<sup>2+</sup> como también compuestos de alto potencial redox<sup>17</sup>.

Las VP pueden oxidar eficazmente compuestos fenólicos y colorantes de alto potencial redox, donde LiP únicamente puede oxidar en presencia de mediadores redox como AV. Esto es posible ya que las VP tienen un muy alto potencial redox (mayor +1,4 V), pueden oxidar tanto compuestos fenólicos como no fenólicos (por ejemplo AV) en ausencia de Mn<sup>2+</sup> y sin mediadores redox<sup>14,17,20,24</sup>.

Estructuralmente, las VP contienen 11- 12 hélices, cuatro puentes de disulfuro, dos sitios de unión a Ca<sup>2+</sup>, un sitio de unión de Mn<sup>2+</sup> y un bolsillo para el grupo hemo. El sitio de unión al Mn<sup>2+</sup> está formado de grupo ácidos Glu/Glu/Asp cerca del grupo hemo (característicos de MnP). Pero las VP también presentan un segundo sitio activo en la superficie de la enzima. En *P. chrysosporium*, la enzima LiP-H8 expone sobre su superficie un Trp<sup>171</sup> y en *Pleurotus eryngii* VPL un Trp<sup>164</sup>. Este residuo de triptófano es característico de LiP y sería el involucrado en la oxidación de alcohol veratrílico y compuestos aromáticos vía transferencia electrónica de largo alcance<sup>11,20,24,26</sup>.

En los HPB, las VP son las enzimas menos frecuentes y se han descrito principalmente en *Pleurotus*, *Bjerkandera* y otros pocos géneros<sup>33</sup>. Su ciclo catalítico tiene dos intermediarios (compuesto I y compuesto II) al igual que las otras peroxidasas, pero es un poco más complejo debido al espectro más amplio de sustratos que maneja<sup>24</sup>.

## 1.5 Regulación de la expresión de enzimas lignolíticas

Las enzimas lignolíticas surgieron luego de millones de años de evolución en los HPB. Estas enzimas no solamente permiten descomponer la madera, sino que también actúan en la formación del cuerpo fructífero, como factor de virulencia o como sistema de defensa de la hifa frente a ataques de las plantas como de fitoanticipinas, fitoalexinas o taninos<sup>19,20</sup>. La amplia cantidad de isoformas de las proteínas lignolíticas cumplen diversas funciones a lo largo del ciclo de vida del hongo. Las mismas tienen diferencias cinéticas y fisicoquímicas, motivo por el cual la expresión de isoformas enzimáticas sucede en diversos patrones<sup>19,34</sup>.

La expresión de los genes lignolíticos están regulados por diferentes señales ambientales como la concentración de carbono y nitrógeno, la presencia de iones metálicos, de xenobióticos, la temperatura de incubación, tiempo de exposición a horas de luz, la etapa de crecimiento del hongo e inclusive el co-cultivo de dos o más especies<sup>19,35-37</sup>.

A nivel molecular, se han encontrado la presencia de diferentes elementos de regulación en el promotor de los genes lignolíticos. Se ha descrito la presencia de elementos HSE (*heat-shock elements*, elementos de *shock* de temperatura), MRE (*metal-response elements*, elementos de respuesta de metales), XRE (*xenobiotic-response elements*, elementos de respuesta a xenobióticos) y creA (*cAMP responsive elements*, elementos de respuesta a cAMP)<sup>33,34,38</sup>. Se ha visto la presencia de varios de estos elementos hacia el 5' del ATG inicial de manera simultánea, sugiriendo que la regulación de la expresión de estas enzimas está regulado por una o más de una de estas señales<sup>19,38</sup>.

### 1.5.1 Inducción por nutrientes

En hongos filamentosos, la concentración de nitrógeno y carbono tienen una importante incidencia en la producción de enzimas lignolíticas. Generalmente las enzimas lignolíticas son producidas principalmente durante el metabolismo secundario del hongo. También

se ha visto que el perfil de isoformas enzimáticas está condicionado no solamente por la concentración de C y N biodisponible sino también por su fuente de origen <sup>4,19</sup>. No existe una regla general para la expresión de lacasas y su relación con la concentración de fuentes de nitrógeno. Se ha reportado inducción tanto en condiciones de déficit como de exceso de nitrógeno <sup>38</sup>. Por otra parte, las fuentes orgánicas de nitrógeno como la peptona o L-asparagina, parecerían tener efectos positivos en la producción de Lcc y MnP <sup>22,38,39</sup>.

Especies como *Phanerochaete chrysosporium*, expresan LiP y MnP en condiciones de escasez de C/N y en forma contraria *Trametes trogii* produce altas concentraciones de enzimas en medios de cultivo con exceso de nitrógeno. En el caso de *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus edodes*, por otra parte, la concentración de fuentes de nitrógeno les es indiferente y es capaz de mineralizar lignina en condiciones de alta y baja concentración de nitrógeno <sup>4,19</sup>.

La concentración de carbono también parecería tener influencia en la expresión de enzimas lignolíticas y al parecer, este efecto estaría vinculado a la producción de biomasa del hongo. La deficiencia de fuente de carbono dispararía la expresión de enzimas lignolíticas debido la repercusión directa que tiene sobre el tamaño del micelio <sup>4</sup>. Se ha visto que el agregado de azúcares simples, como glucosa, aumenta la expresión de lacasa en *P. ostreatus*.

### 1.5.2 Inducción por iones metálicos

Varios estudios muestran que la presencia de cobre es un inductor de la expresión de lacasas, pero también se ha visto que el exceso del ión puede llevar a la inhibición del crecimiento fúngico <sup>32,40-42</sup>. El efecto de inducción/represión de las enzimas Lac también puede verse afectado por la relación entre las fuentes de carbono y nitrógeno <sup>42</sup>. Pero el metal, no puede estar en forma de complejo, si no que debe estar en su forma libre. La

adición de ácidos orgánicos como el málico u oxálico, disminuye el efecto inductivo ya que altera el pH del medio y tiene un efecto quelante sobre los iones <sup>43</sup>.

En cuanto a MnP, se ha estudiado que su inducción está relacionada a la presencia de Mn<sup>2+</sup> en el medio de cultivo. La falta de Mn<sup>2+</sup> en el medio no inhibe el crecimiento del hongo, pero sí la actividad MnP <sup>44</sup> También existe un estudio en *C. subvermispora* que sugiere que el ión manganeso, no regula la expresión de MnP únicamente a nivel transcripcional, sino que también a nivel traduccional <sup>45</sup>.

Sin embargo, se ha visto que la presencia de Mn<sup>2+</sup> en el medio de cultivo, inhibe la actividad de LiP, ya que tiene un efecto supresor en la producción de alcohol veratrílico en *Bjerkandera sp.* <sup>46</sup>. También se vio que el déficit de manganeso en el medio de cultivo tiene efectos inductores en la expresión de la isoenzima LiP-H2 de *P. chrysosporium* y que el DMSO (*scavenger* de radicales hidroxilos) inhibe la expresión a nivel de ARNm y de proteínas LiP en un medio con exceso de oxígeno, indicando que la expresión puede ser inducida por mecanismos de estrés oxidativo <sup>47</sup>. La presencia de Mn<sup>2+</sup> en el medio de cultivo también tiene un efecto represión en la transcripción del gen *vps* de las peroxidasa versátiles <sup>33</sup>.

### 1.5.3 Inducción por tipos de madera

La especie de árbol sobre la cuál crece el hongo también se ha visto que incide sobre el perfil enzimático expresado. Young et al. estudió la expresión de genes de *Punctularia strigosozonata* crecido sobre madera de aspen, de pino y en esas mismas condiciones pero agregando aceite Bunker C. En los ensayos observaron que había una mayor acumulación de transcritos expresados diferencialmente en el hongo crecido sobre madera de aspen que sobre pino, donde de los 19 transcritos inducidos correspondientes a oxidoreductasas, 16 estaban inducidos en aspen y 3 en madera de pino, pero no se veía ninguna diferencia cuando se suplementaba el medio con aceite. Estos resultados indicarían que el tipo de madera tiene una mayor influencia en la

inducción de la expresión de genes lignolíticos y no así el agregado de lípidos <sup>48</sup>. Janusz y colegas <sup>49</sup>, compararon el perfil transcriptómico de *Cerrena unicolor* crecido en medio definido y medio suplementado con aserrín de madera de mapple, de abedul y de ceniza, encontrando que las diferentes isoformas de Lcc y MnP, se veían inducidas o reprimidas según el medio. Se evidenció la presencia de MnP, Lac y VP en el medio control, pero la expresión del transcripto Lac (XLOC\_00069) se vio especialmente inducida en el medio suplementado con cualquier de los 3 tipos de aserrín. Sin embargo, la isoforma Lac (XLOC\_011745) estuvo reprimida en todos los medios. Por otra parte, la isoforma MnP (XLOC\_004631) estuvo especialmente inducida en medio suplementado con cenizas y maple pero reprimida durante su crecimiento con abedul <sup>49</sup>. Por otro lado, Couturier et al. comparó los transcriptomas de *Pycnoporus coccineus* crecido en madera de aspen y en madera de pino y no observó una diferencia considerable entre ambas condiciones. En particular los transcriptos de Lac se expresaron en baja cantidad, sugiriendo que cuando su crecimiento se dio sobre ambas maderas, su expresión se encontraba reprimida. Por el contrario, 2 transcriptos de *mnp* fueron inducidos en las mismas condiciones. En especial una tercer isoforma de MnP se vio inducida en cultivo con aspen <sup>50</sup>. Estos resultados demuestran la gran adaptabilidad y variabilidad que tienen los hongos a la hora de expresar su batería de enzimas en diferentes sustratos.

#### 1.5.4 Inducción por fenoles

Debido al rol preponderante que tienen las enzimas lignolíticas de los HPB en la oxidación de compuestos fenólicos de la madera, es de pensar que las presencias de estas sustancias en los medios de cultivo tengan cierto grado de influencia en la expresión y producción de peroxidasas y lacasas.

En el hongo *Trametes hirsuta*, la adición al medio de cultivo de compuestos aromáticos como vainillina, ácido gálico y alcohol veratrílico tiene un efecto inductor sobre la actividad enzimática de MnP y Lac. Mientras que la adición al medio de ácido cafeico,

ácido siríngico y ácido trans-cinámico no tiene efecto alguno <sup>51</sup>. Por el contrario, en *Phanerochaete chrysosporium*, la adición de alcohol veratrílico no tiene ningún efecto sobre la actividad Lac y MnP ni tampoco aumenta la expresión del ARNm para las isoformas LiP H2 y H8, aunque sí se incrementa en su actividad enzimática <sup>52</sup>. Además OH-libres en monómeros y dímeros de lignina tendrían un efecto inhibitor sobre LiP H8, bloqueando el transporte de electrones en el Trp <sup>171</sup> y evitando la oxidación de AV <sup>53</sup>.

Se ha visto que la expresión de isoformas de Lcc en *Pleurotus pulomaris* está condicionada a la presencia de fenoles pequeños. Un estudio observó mediante electroforesis, que la adición de ácido vainillínico y ácido ferúlico induciría un patrón expresión de lacasas diferente a la del control, especialmente de la isoforma *lcc3* <sup>54</sup>. Terrón y colegas, también obtuvo un resultado similar con el basidiomicete *Trametes sp. I-62*. En su trabajo estudió el efecto sobre la actividad y expresión de lacasas frente a nueve compuestos fenólicos (entre ellos siringaldazina, guaiacol, ácido ferúlico y ácido p-cumárico). Observó que todos los compuestos tenían un efecto inductor en la actividad enzimática, pero que la expresión de tres isoformas Lcc ocurrían de manera diferente frente al agregado de inductores fenólicos, a pesar de la gran similitud en la estructura de los compuestos <sup>55</sup>.

A pesar de todas las investigaciones relacionadas a la expresión de enzimas lignolíticas bajo diferentes condiciones de cultivo todavía quedan muchas incógnitas acerca de la regulación en la producción de estas enzimas. El hecho de que se hayan podido identificar elementos de regulación es un paso importante para acercarse a la identificación de las señales y redes de regulación involucradas, pero todavía quedan preguntas sin responder.

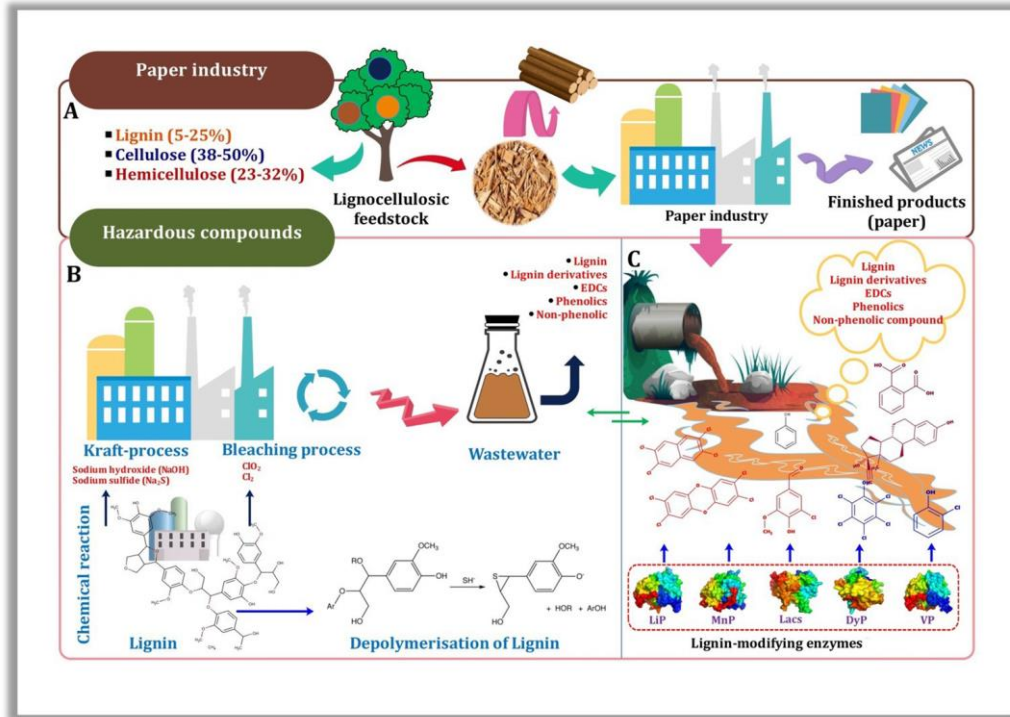
## 1.6 Aplicaciones biotecnológicas de los HPB y enzimas lignolíticas

Como ya hemos resaltado, las enzimas lignolíticas son enzimas de alto potencial redox y de naturaleza inespecífica. Los HPB son capaces de crecer sobre cualquier sustrato lignolítico y son capaces de degradar una gran cantidad de compuestos aromáticos. Esta característica los vuelve muy interesante para aplicaciones biotecnológicas de diversa naturaleza. El pulpeado de celulosa, la biodecoloración, la biorremediación, el pretratamiento de biomasa para raciones animales y la producción de biocombustible, se encuentran entre las posibles aplicaciones de estos hongos <sup>20,56,57</sup>.

Los rumiantes, por ejemplo, tienen la capacidad de hidrolizar celulosa enzimáticamente pero no son capaces de digerir lignina. Se ha estudiado que el pretratamiento con HPB o sus enzimas en materias primas como el rastrojo, mejora la digestibilidad del material vegetal <sup>4</sup>.

Una aplicación de alto interés en la industria biotecnológica de los HPB es en el biopulpeado de la madera. Generalmente para extraer las fibras de celulosa se emplean técnicas mecánicas o químicas que son muy demandantes energéticamente o contaminantes <sup>4,15</sup>. A pesar de los grandes avances que se ha hecho en esta área, hoy en día, la producción de papel y el pulpeado de celulosa genera como productos secundarios fenoles, fenoles clorados y fragmentos de lignina sulfonados. Algunos posibles efectos estudiados en la salud humana sobre estos compuestos son la formación de cáncer y de disruptores endócrinos <sup>58</sup>.

Un mecanismo alternativo en la producción de papel y bioetanol, podría ser el empleo de cocteles de enzimas lignolíticas que degraden de manera específica a la lignina y faciliten la remoción de celulosa, siendo este método menos extenuante para el medio ambiente <sup>15,59,60</sup>. También estos hongos o sus enzimas pueden ser aplicados en procesos de detoxificación de los efluentes de la industria papelera y de pulpeado (Figura 1.9) <sup>61</sup>.



**Figura 1.9:** Esquema de los pasos de la fabricación de papel y partes del desarrollo donde se podrían aplicar los HPB y sus enzimas para la biorremediación; A- Esquema general del proceso de fabricación de papel. B- Depolimerización de lignina y extracción y blanqueo de pulpa de celulosa, C- Biorremediación de los efluentes <sup>58</sup>.

Otro nicho de investigación que se ha desarrollado en los últimos años es la utilización de desechos de lignina para generar productos de valor agregador. A partir de la lignina se ha llevado a cabo la producción de lípidos, bioplásticos, vainillina, biofertilizantes entre otros. Sus aplicaciones han sido revisadas en profundidad por Weng et al. 2021<sup>15</sup>.

Como se mencionó antes, los HPB son prometedores agentes biorremediantes. Además del tratamiento de efluentes de la industria papelera también se ha estudiado su funcionalidad en la detoxificación de efluentes de la industria textil. El mecanismo de remoción de tóxicos se basa no solamente en la oxidación sino también en la adsorción de contaminantes sobre las paredes de las hifas <sup>57</sup>. También se ha ensayado extensamente la capacidad de peroxidasas y lacasas aisladas de HPB para degradar colorantes tóxicos <sup>57,62</sup>. Se ha visto que hongo como *T. versicolor* y *Ganoderma lucidum* fueron capaces de decolorar en cerca de 2 horas, 50  $\mu$ M del colorante verde malaquita

y que esta capacidad decolorante se veía incrementada cuando se co-cultivaban las dos especies. El verde de malaquita es un trifenilmetano utilizado como control para el crecimiento de hongos y protozoos y existen evidencias que puede ser altamente tóxico en eucariotas superiores <sup>35,63</sup>. Este mismo efecto decolorante se obtuvo empleando MnP de *P. chrysosporium* expresado heterológicamente, donde la enzima logró decolorar 100 g/L de verde malaquita en 3 horas. Mediante ensayos de *in vitro*, también se corroboró su detoxificación <sup>64</sup>. Yang et al, estudió la decoloración y detoxificación de verde malaquita, utilizando la lacasa LacA del HPB *Cerrena* sp. En este trabajo obtuvieron 91% de decoloración en casi 3 horas y también logrando buenos niveles de detoxificación <sup>63</sup>. La aplicación de las enzimas de lignocelulosa no se limita solamente a su aplicación en procesos de biorremediación, sino que también han sido ampliamente utilizados en la industria textil para decolorar, suavizar algodón, mejorar el teñido de prendas, etc. <sup>65</sup>. Otros colorantes como Remazol golden yellow, Indigo carmín, Drimaren Yellow X-8GN, Reactive Blue 21, Reactive black 5, Alizarina, etc. han sido decolorados por enzimas lignolíticas de HPB <sup>57</sup>.

Finalmente la remoción de compuestos aromáticos policíclicos, desechos farmacológicos, disruptores endócrinos y pesticidas, por HPB y sus enzimas lignolíticas o el sistema detoxificador citocromo P450 también han sido altamente reportados <sup>32,57,66</sup>.

## 1.7 *Punctularia atropurpurascens*

*Punctularia atropurpurascens* (División Basidiomycotina, Orden Aphyllophorales, Familia Corticiaceaea) es un HPB, aislado de *Eucalyptus* sp de nuestra región. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo, muestran que este organismo tiene un sistema lignolítico diferente al de *P. chrysosporium* (organismo modelo) respecto a las enzimas que posee y a la fase de crecimiento en que se producen <sup>67</sup>. Una característica original de *P. atropurpurascens* es la producción de algunas enzimas en condiciones correspondientes

al metabolismo primario y que degrada lignina de forma específica <sup>68,69</sup>. Además, este hongo fue capaz de crecer en presencia de endosulfán, es decir como única fuente de carbono y también con el agregado de glucosa <sup>67</sup>. El endosulfán es un agroquímico de alta persistencia, que desde el 2011 su uso ha sido prohibido en Uruguay <sup>67</sup>.

*P. atropurpurascens* es un hongo muy poco explorado. Su genoma no ha sido reportado y existe muy poca bibliografía que lo incluya en sus ensayos. El hecho que sea capaz de crecer sobre pesticidas recalcitrantes en presencia de fuentes de carbono y que no requiera de una fase secundaria estricta para la producción de MnP es una ventaja para su aplicación en la biorremediación de efluentes industriales. Generalmente, estos desechos contienen también, altas concentraciones de residuos orgánicos. Por otra parte, que sea muy selectivo a la hora de degradar lignina, no afectando las porciones de celulosa y hemicelulosa, también lo postulan como un buen candidato para el pretratamiento de madera.

Por los motivos anteriormente detallados, en esta tesis proponemos ahondar en el estudio de *P. atropurpurascens*. Partiendo de la hipótesis de que su capacidad biorremediadora y decolorante se debe a su sistema lignolítico, planteamos realizar cribados comparativos de decoloración para identificar si existen peculiaridades en su metabolismo que lo diferencien del hongo lignolítico modelo *P. chrysosporium*. Pretendemos también vincular la capacidad decolorante con la actividad enzimática de lacasas y peroxidasas y finalmente estudiar si la expresión de estas enzimas está condicionada a la presencia de colorantes.

# Objetivos

## Objetivo general

Determinar la presencia de la batería de lacasas (Lcc), manganeso (MnP) y lignino peroxidadas (LiP) con las que cuenta *P. atropurpurascens* y contribuir a la comprensión de los mecanismos que este organismo ha desarrollado para adaptarse a su hábitat natural.

## Objetivos específicos

1- Comparar la capacidad de crecimiento y de decoloración de *Punctularia atropurpurascens* con la de *Phanerochaete chrysosporium* mediante cribado de la capacidad decolorante.

2- Realizar curvas de cinética de decoloración y de crecimiento en presencia de colorantes (azo, antraquinonas, tiazina, xantenos y trifenilmetilos) y comparar las velocidades con el potencial redox de los cromóforos.

3- Evaluar el perfil de la actividad enzimática MnP, LiP y Lcc de *P. atropurpurascens* cuando es incubado en medio con el agregado de colorantes/madera.

4- Identificar secuencias codificantes de lacasas, manganeso y lignino peroxidadas extracelulares identificadas en muestras con actividad lignolítica interesante.

5- Establecer un sistema de referencia interno para cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real y validar genes con expresión constitutiva en todas las condiciones de interés.

6- Relacionar las actividades peroxidasa y lacasa, detectadas durante la decoloración /degradación de sustratos con secuencias seleccionadas.

## 2. Materiales y métodos

## 2.1 Materiales

### 2.1.1 Microorganismos

*Punctularia atropurpurascens* H2126, *Phanerochaete chrysosporium* 1556 DZM y *Aspergillus nidulans* MV001 fueron obtenidos de la colección de la Cátedra de Microbiología General (CCMG) de la Facultad de Química, Udelar . Las cepas fueron mantenidas en extracto de malta 1,25% y 1,5% agar a 4°C.

### 2.1.2 Colorantes

Los colorantes utilizados en esta tesis pertenecen al *stock* de colorantes de la Cátedra de Microbiología.

Colorantes tipo Azo: Rojo congo, Rojo bordó, Amarillo brillante, Azul eriocromo RSS 140%, Crisoidina, Negro eriocromo T, Rojo p-nitroanilina, Rojo metilo, Amido Black 10B, Negro sudán B, Anaranjado metil.

Colorantes tipo Antraquinona (ANQ): Remazol Brilliant Blue, Rojo carmín, Rojo Alizarina S (ácido alizarinasulfónico).

Colorantes tipo Xantenos (XNT): Fluoresceína di bromo, Fluoresceína, Rodamina Beta.

Colorantes tipo Trifenilmetano (TFM): Azul Victoria 4R, Verde brillante, Verde malaquita, Diamante fucsina, Fucsina ácida, Auramina, Azul de anilina, Azul de timol, Cristal Violeta

Colorantes tipo Tiazina (TZN): Azul de metileno y Azul de toluidina.

Se prepararon soluciones madre de 15 mM, esterilizadas por filtración con filtros de 0,22 µm (Life Science, GVS North America). Todos los colorantes fueron preparados en agua destilada estéril, excepto: Negro Sudán B (etanol), Rojo PNA (acetona), Rojo metilo (etanol), Auramina (agua:etanol,15:5), Azul de timol (etanol), Azul victoria 4R (etanol) y Fluoresceína (acetona:agua, 10:5).

### 2.1.3 Cribado de la capacidad decolorante: Medio de cultivo AEM (Agar extracto de malta)- *P. atropurpurascens* y *P. chrysosporium*

El medio utilizado para realizar la búsqueda de la capacidad decolorante en *P. atropurpurascens* y *P. chrysosporium* contuvo con 1,25% de extracto de malta, 1,5% agar y pH=5,6.

Se esterilizó en calor húmedo por 15 min a 121 °C a 1,1 kg/cm<sup>2</sup> de presión. En el caso de la adición de colorantes, se termostató el medio a 37 °C y se adicionó solución de colorantes esterilizada en filtros de 0,22 µm (Life Science, GVS North America) a una concentración final de 150 µM. Treinta y cinco mL de medio de cultivo se agregaron a placas de Petri de 8,9 cm de diámetro en flujo laminar.

### 2.1.4 Cribado de la capacidad decolorante: Medio de cultivo AEM modificado- *A. nidulans*

El medio utilizado para realizar la búsqueda de la capacidad decolorante en *A. nidulans* contuvo 1,25% extracto de malta, 1,5% agar, 0,81 % Nitrato de sodio, 2 mg/L Ácido p-aminobenzoico a pH=6,8.

Se esterilizó en calor húmedo por 15 min a 121 °C a 1.1 kg/cm<sup>2</sup> de presión. En el caso de la adición de colorantes, se termostató el medio a 37 °C y se adicionó solución de colorantes esterilizada en filtros de 0,22 µm (Life Science, GVS North America) a una concentración final de 150 µM. Treinta y cinco mL de medio de cultivo se agregaron a placas de Petri de 8,9 cm de diámetro en flujo laminar.

### 2.1.5 Medidas de actividad enzimática: Medio de cultivo líquido EM (extracto de malta)

Los medios de cultivo empleados para realizar las evaluaciones de actividad enzimática contuvieron 0,5% Extracto de malta, 0,81 % Nitrato de sodio, 20 mL/L de solución de sales a pH=5,6.

Se esterilizó en calor húmedo por 15 min a 121 °C a 1,1 kg/cm<sup>2</sup> de presión.

En el caso de la adición de colorantes, se termostató el medio a 37 °C y se adicionó solución de colorantes esterilizada en filtros de 0,22 µm a una concentración final de 150µM.

En el caso de adición de *chips* de madera de *Eucalyptus spp.* 5 cm x 5 cm x 0,3 cm: se hidrataron los *chips* toda la noche en agua destilada y se autoclavaron. Luego se adicionaron 5 *chips* a un frasco conteniendo EM sin esterilizar y se corrió una segunda ronda de autoclave en las condiciones previamente descritas.

#### 2.1.5.1 Solución de sales

- 26 g de cloruro de potasio
- 26 g de sulfato de magnesio heptahidratado
- 76 g de fosfato de potasio monobásico
- 50 mL de solución de metales traza

Se llevó a un volumen final de 1 L con agua destilada. Se esterilizó en calor húmedo por 15 min a 121 °C a 1,1 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Se agregan 2 mL de cloformo como conservante y se almacenó 4 °C.

##### 2.1.5.1.1 Solución de metales traza

- 40 mg de borato de sodio decahidratado
- 400 mg de sulfato de cobre pentahidratado
- 800 mg de fosfato férrico dihidratado
- 800 mg sulfato de manganeso dihidratado
- 800 md molibdato de sodio dihidratado
- 8 g de sulfato de zinc heptahidratado

Se llevó a un volumen final de 1 L y se esterilizó en calor húmedo por 15 min a 121°C a 1,1 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Se almacenó a 4 °C.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Análisis bioquímicos y microbiológicos

#### *2.2.1.1 Cribado de la capacidad decolorante: Cinética de decoloración y de crecimiento*

Las placas de Petri conteniendo 35 mL de medio de cultivo con AEM y 150  $\mu$ M de colorante, fueron inoculadas mediante la técnica de punción (1 sola vez, de forma céntrica) a partir de un cultivo fresco de *P. atropurpurascens*. Como control de crecimiento, se inocularon placas con medio de cultivo conteniendo AEM sin colorante. Como control negativo, las placas con colorante sin inocular fueron incubadas para controlar la estabilidad de los colorantes bajo las condiciones del ensayo. El experimento se realizó por triplicado.

Como control positivo, se utilizó *P. chrysosporium*, ya que es un modelo biológico para el estudio de sistemas lignolíticos <sup>15</sup> y se empleó *Aspergillus nidulans*, como control negativo en AEM modificado con colorantes.

Los ensayos se incubaron en cámara a 28 °C. Las placas fueron fotografiadas diariamente. Se realizaron medidas de crecimiento del diámetro de micelio y del halo de decoloración (o cambio en la coloración) de los colorantes en placa con el programa Image J hasta que el micelio cubriera totalmente la placa o la misma haya sido decolorada en su totalidad.

#### *2.2.1.2 Medición del potencial de reducción de los colorantes en circuito abierto*

Se midió el potencial de reducción de una solución conteniendo medio 0,5% EM pH=5.6 y 150  $\mu$ M de colorante, utilizando un sistema de tres electrodos conformados por 2 electrodos de platino, que ofician como electrodo de trabajo, y un electrodo auxiliar (Radiometer analytical). Como electrodo de referencia se utilizó un electrodo de Ag/AgCl (Hanna instruments). Los ensayos se realizaron a circuito abierto, con toma de medidas del potencial del electrodo cada 1 segundo durante un intervalo de medida de 600-1200

segundos (Interface1010, Gamry). La medida reportada es aquella cuya variación de potencial con el tiempo tiende a cero ( $dE/dT \cong 0$ ), es decir en condiciones de equilibrio electroquímico.

El potencial de la reducción del colorante se calculó como:

$$E_{PCA} = E_{trabajo} + E_{referencia}$$

$E_{PCA}$  es el potencial a circuito abierto y se calcula como la suma del potencial (E) de trabajo y el potencial de referencia ( $E_{referencia}$ ). Siendo  $E_{trabajo}$ , aquel medido por el potenciómetro y el  $E_{ref}$  al potencial estándar de reducción Ag/AgCl (220 mV a 25 °C).

### 2.2.1.3 Cultivos para análisis de actividad enzimática y expresión por qPCR

El inóculo inicial fue preparado a partir de un cultivo fresco de *P. atropurpurascens* en medio de AEM incubadas por 2 semanas a 28 °C. Los conidios fueron recuperados con espátulas estériles con una solución de 0,1% Tween 80. La suspensión fue filtrada en tela estéril y homogenizada por vortex. Seguidamente, se realizó un recuento en cámara Neubauer para conocer la concentración de conidios.

Se realizaron cultivos en 100 mL de medio con 0,5% EM y 150  $\mu$ M de colorante o con cinco *chips* de madera de *Eucalyptus spp.* en frascos de 500 mL. Los frascos fueron inoculados con una suspensión de conidios de *P. atropurpurascens* a una concentración final de  $1 \times 10^6$  conidios/mL.

La incubación se llevó a cabo sin agitación a 28 °C. Se midió la actividad enzimática Lcc, MnP y LiP en los sobrenadantes del cultivo los días 3, 7, 10 y 20 de incubación. Previo a la medida de actividad, los sobrenadantes fueron centrifugados 2 minutos a 12000 rpm. Los micelios fueron filtrados, lavados con agua autoclavada, secados en papel secante autoclavado, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70 °C hasta la extracción de ARN. Los cultivos se realizaron por triplicado.

## 2.2.1.4 Determinación de actividad enzimática

### 2.2.1.4.1 Actividad Lacasa

La actividad lacasa fue medida siguiendo la metodología descrita por Criquet et al. 1999<sup>70</sup>. Esta técnica se basa en el seguimiento de las tasas de oxidación del sustrato artificial siringaldazina a una quinona (Figura 2.1). Para las medidas cinéticas se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cultivo a una mezcla previamente termostata a 30 °C conteniendo buffer fosfato pH=5,7, 10 mM y 0,02 mM de siringaldazina a un volumen final de 2 mL. Se tomaron alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  y se midió la absorbancia en lector de placas (M200 Infinite Pro Microplate Reader, Tecan Life Science) cada 15 segundos durante 10 minutos a 30 °C. Las medidas se realizaron por duplicado técnico de tres réplicas biológicas.

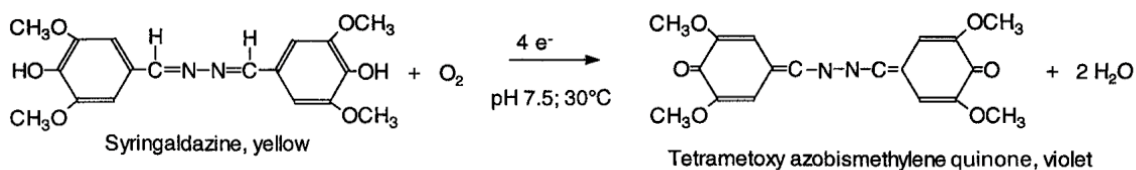


Figura 2.1 : Reacción de oxidación a siringaldazina por acción de lacasas para dar una quinona violeta<sup>71</sup>.

Se registró el aumento de absorbancia en función del tiempo a 525 nm y se utilizó el coeficiente de extinción de siringaldazina en su estado oxidado ( $\epsilon = 65,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) para calcular los moles de sustrato oxidado por unidad de tiempo en condiciones de velocidades inicial. Se definió la unidad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  de quinona a partir de siringaldazina por minuto a pH=5,7 y 30 °C. La actividad se ajustó por el volumen de sustrato agregado y se expresó como UE/mL.

#### 2.2.1.4.2 Actividad enzimática de Manganese Peroxidase

La actividad manganeso-peroxidasa se midió según la técnica previamente descrita por Castillo et al. 1994 <sup>72</sup>. Esta técnica se basa en el acoplamiento oxidativo de 3-metilbenzotiazolinona-2(3H)-hidrazona (MBTH) con p-dimetilaminobenzaldehído (DMAB) para dar un colorante del tipo azo que absorbe luz a 590 nm (Figura 2.2).

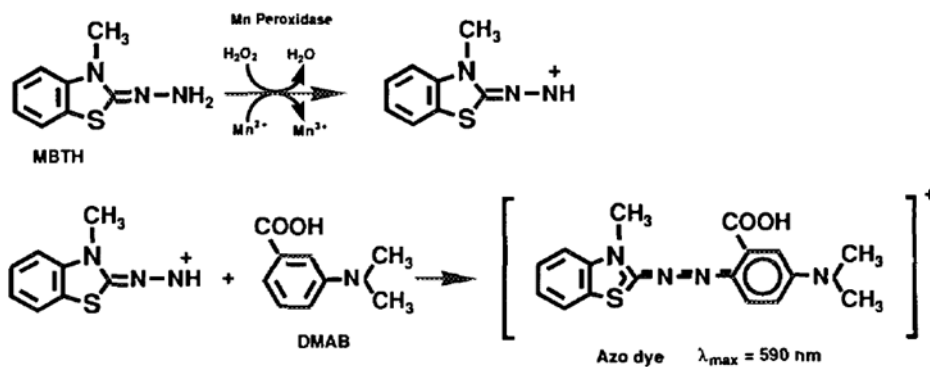


Figura 2.2: Reacción de acoplamiento de MBTH con DMAB para dar un cromóforo azulado por acción de MnP <sup>72</sup>.

Se adicionaron 200  $\mu$ L de sobrenadante de cultivo de una mezcla previamente termostatzada a 37  $^{\circ}$ C conteniendo buffer succínico 0,1 M (pH=4,5), DMAB 0.99 mM, MBTH 0,07 mM, MnSO<sub>4</sub> 0,3mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05 mM (volumen final de 2 mL). Se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ L y se midió la absorbancia en lector de placas (M200 Infinite Pro Microplate Reader, Tecan Life Science) cada 15 segundos durante 10 minutos a 37  $^{\circ}$ C. Las medidas se realizaron por duplicado técnico de tres réplicas biológicas.

Se registró el aumento de absorbancia a 590 nm en función del tiempo. Se calcularon los moles de producto formado por minuto aplicando la ley de Lambert-Beer, aplicando el coeficiente de extinción del colorante azo formado por el acoplamiento oxidativo de MBTH y DMAB ( $\epsilon = 53000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Se definió la unidad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto, a pH=4,5 y 37  $^{\circ}$ C. La actividad se ajustó por el volumen de sustrato agregado y se expresó como UE/mL.

### 2.2.1.4.3 Actividad enzimática Lignino Peroxidasa

La actividad LiP fue medida como describieron Tien & Kirk en 1984<sup>73</sup>. Este método se basa en la determinación de la absorbancia de la oxidación de alcohol veratrílico a veratraldehído (Figura 2.3). Brevemente, se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cultivo a una mezcla termostatazada a 37 °C que contenía tartrato de sodio-ácido tartárico pH=3 0,1 M, alcohol veratrílico 2mM y  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.15 mM (volumen final de 2 mL).

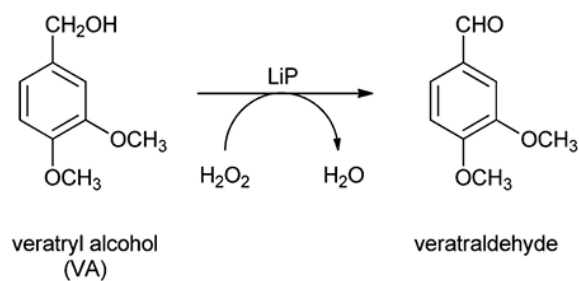


Figura 2.3: Conversión de alcohol veratrílico a veratraldehído por acción de LiP<sup>74</sup>.

Se tomaron alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  por duplicado y se midió la absorbancia (M200 Infinite Pro Microplate Reader, Tecan Life Science) a 310 nm ( $\epsilon=9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) en placa multipocillo a 37 °C en intervalos de 15 segundos por 10 minutos. Las medidas se realizaron por duplicado técnico de tres réplicas biológicas.

La unidad de enzima (UE) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de alcohol veratrílico por minuto a pH 3.0 y 37 °C.

### *2.2.1.5 Determinación de peso de biomasa generada*

Una vez medidas las actividades enzimáticas Lcc, MnP y LiP, las mismas fueron normalizadas por el peso húmedo de la biomasa generada hasta el día de la medición. Para la medida de la biomasa, se filtró el micelio y se lavó 3 veces con agua destilada. El excedente de agua se absorbió con papel secante y se procedió a pesar la biomasa en balanza analítica. En el caso de las medidas de biomasa en madera, el micelio crecido sobre la superficie de los chips fue raspado con espátula. El micelio crecido sobre el medio líquido se filtró en tela y se prosiguió con las medidas al igual que en los frascos sin madera.

## **2.2.2 Análisis moleculares**

### *2.2.2.1 Obtención de muestras para secuenciación masiva (transcriptomas/genoma)*

*P. atropurpurascens* se cultivó en condiciones de inducción y de no-inducción lingolítica a fin de generar el material para la secuenciación de transcriptomas en ambas condiciones. El ADN para secuenciación del genoma se extrajo de cultivo en condiciones de no-inducción. Los ensayos se hicieron por quintuplicado.

Condiciones de no-inducción. El inóculo inicial de conidios se realizó a partir de placas Petri inoculadas con *P. atropurpurascens* en medio de 1,25% EM y agar 1,5% incubadas por 1 semana a 28 °C. Los conidios fueron resuspendidos en 0,01% Tween 80 con punta de espátula autoclavada y filtrados en tela estéril. Esta suspensión se utilizó para inocular matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo líquido con 1,25 % EM y 3% de peptona a pH=5,6, a una concentración final de 10<sup>5</sup> conidios /mL. Los matraces fueron incubados a 28 °C a 150 rpm. El micelio se recolectó al tercer día de crecimiento (fase exponencial), se filtró en tela estéril y se lavó con agua destilada autoclavada.

Condiciones de inducción. El inóculo inicial de conidios se realizó a partir de placas Petri inoculadas con *P. atropurpurascens* con medio de cultivo conteniendo 3 % de agar y 0,5% de EM y un chip de madera de *Eucalyptus spp*, incubadas durante 14 días a 28 °C. Los conidios fueron resuspendidos con 0,01% Tween 80 con punta de espátula autoclavada y filtrados en tela estéril.

Frascos de 500 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo líquido con 0,05% de EM, 20 mL/L de solución salina de medio mínimo y 0,81% de nitrato de sodio a pH=5.6 y cinco chips de madera de *Eucalyptus spp*. de 5 cm x 5 cm x 0,3 cm fueron inoculados con la suspensión de conidios (inóculo inicial) a una concentración final de  $10^5$

conidios/mL e incubados a 28 °C durante 60 días. El micelio se filtró en tela estéril y se lavó con agua destilada autoclavada.

Los micelios se pulverizaron en presencia de nitrógeno líquido en morteros estériles. Se extrajo el ADN total de 150 mg de micelio pulverizado usando Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit (Zymogen research). El ARN se extrajo de 150 mg de micelio pulverizado con Plant RNAeasy Mini Kit (Qiagen). La calidad del RNA fue verificada por determinación del RIN (RNA Integrity Number) y la del ADN fue verificada por electroforesis con gel de agarosa 1%. La concentración de ADN extraído se estimó sobre gel de agarosa, utilizando un estándar de concentración de ADN (1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific). La concentración de RNA se midió en espectrofotómetro de microvolúmenes (Jenway Genova Plus). El secuenciado se realizó con Illumina (Macrogen Inc, Corea). Para el ensamblado se empleó MaSuRCA, comando estándar /MaSuRCA-4.0.3/bin/masurca-t16-i forward\_paired.fq.gz,reverse paired.fq.gz. (a cargo del Lic. Andrés Milano y el Dr. Pablo Smircich, LIM F. Ciencias - Dpto Genómica, IIBCE).

Tabla 2.1: Parámetros del ensamblado genómico

Ensamblado genómico	Parámetros	Ensamblado genómico	Parámetros
<i>Genome Assembly size (Mbp)</i>	62-73	<i>N50 scaffold length</i>	44927
<i>Number of scaffolds</i>	7075	<i>Number of scaffold &gt; 1K nt 3842</i>	54,30%
<i>Total size of scaffolds</i>	62168271	<i>Number of scaffold &gt; 1K nt 1337</i>	18,90%
<i>Longest scaffold</i>	268721		
<i>Shortest scaffold</i>	151		

### 2.2.2.2 Búsqueda de secuencias de genes de referencia, *mnp* y *lcc* en genoma y transcriptoma de *P. atropurpurascens*

Los genes de referencia fueron descargados de la base de datos Joint Genome Institute (JGI) de *P. ostreatus* PC15 v2.0

([https://mycocosm.jgi.doe.gov/PleosPC15\\_2/PleosPC15\\_2.home.html](https://mycocosm.jgi.doe.gov/PleosPC15_2/PleosPC15_2.home.html)) utilizando los números de identificación proporcionados por el artículo de Castanera et al 2015 <sup>16,75-77</sup>. Esas secuencias se usaron para buscar mediante los genes y proteínas homólogos en *P. strigosozonata* v 1.0 (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Punst1/Punst1.home.html>) base de datos JGI <sup>11</sup>.

Para la obtención de las secuencias *lcc*, se realizó una búsqueda de lacasas en el genoma de *Punctularia strigosozonata* v 1.0 en la base de datos JGI (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Punst1/Punst1.home.html>) utilizando la palabra clave "laccase" en el buscador <sup>11</sup>. Se descargaron todas las secuencias genómicas, transcriptómicas y proteómicas correspondientes a lacasas.

Las secuencias *mnp* fueron obtenidas previamente por nuestro equipo de trabajo, con cebadores degenerados (región central) y RACE-PCR (extensión de regiones 5' y 3'), que fueron clonadas y secuenciadas. Por esta metodología se obtuvo la secuencia completa de cuatro genes *mnp* y parcial de otros tres.

Las secuencias de los genes de referencia y *lcc* de *P. strigosozonata*, junto con los 7 genes *mnp* obtenidos previamente, fueron la base para realizar una búsqueda local en el transcriptoma y genoma de *P. atropurpurascens*.

La búsqueda de secuencias se llevó adelante mediante los programas Nucleotide-Nucleotide BLAST 2.9.0 y Protein Query-Translated Subject BLAST 2.9.0+.

Para la verificación de las secuencias se utilizaron aquellos *hits* de identidad mayor al 85% y de cobertura cercana al 100%.

Las secuencias proteicas teóricas fueron obtenidas a partir de la traducción de la secuencia transcriptómica verificada en el programa ExPASy, de SwissProt (<https://web.expasy.org/translate/>).

#### 2.2.2.3 Diseño de cebadores para qPCR

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen usando el programa Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y ajustes posteriores.

En particular para los genes *mnp* y *lcc* se utilizó el programa AlleleID 7 (Primer BioSoft, USA), el cual permite diseñar cebadores específicos para cada isoforma. Los parámetros de los cebadores fueron verificados con el programa Primer3plus y la tendencia a formar horquillas, homodímeros o heterodímeros se analizaron con el programa VectorNTI (Invitrogen).

Tabla 2.2: Cebadores específicos diseñados para qPCR de genes de referencia

Gen	Nombre	Secuencia 5'->3'	Tm (°C)	Amplicón (pb)
<i>act</i>	PaACN_F1q	TGGTATCCACGAGACGACCT	60,5	93
	PaACN_R1q	GTACCACCGGACAGGACAAC	60,3	
<i>cyc</i>	PaCYCi1_F1	ACCCACCTGTCGGTCAAAC	60,8	95
	PaCYCi1_R11q	AGCACTAGTCGGCGGAGAT	60,0	
<i>cyt</i>	PaCYT_F1q	CCCAACCTTCATGGTGTCTT	59,8	88
	PaCYT_R1q	AGGTAATGCCCTTGTTGACG	60,0	
<i>gdpc</i>	PaGDP_R1q	AGGCCATACCAGTGAGCTTG	60,3	94
	PaGDP_F3q	GTC AACGGCAACATCATCC	59,9	
<i>lip</i>	PaLIP_F3	TCGCTCATGCGTATATCAGG	59,8	91
	PaLIP_R3	ATCTGCTTGAACACCCGAAG	60,3	
<i>pep</i>	PaPEP_F1q	GCAAAGCAAACATCCTCTCC	59,8	81
	PaPEP_R2q	TTGATGGCTTGTTCCGTAGAC	60,1	
<i>phos</i>	PaPHOS_F2q	TTTACAGGAAGTGGGGATGC	59,9	96
	PaPHOS_R2q	TGGCAATCAGAGCGTATGAC	59,8	
<i>sarl</i>	PaSAR_F5q	GCCATCAACAGGCTCGTC	60,4	91
	PaSAR_R5q	AAACGCTCGAAGTCTGCACT	60,2	

Tabla 2.3: Cebadores específicos diseñados para qPCR de genes *lcc*

Gen	Nombre	Secuencia 5'->3'	Tm (°C)	Amplificación (pb)
<i>lcc1</i>	PA_ <i>lcc1</i> _cdc_6441_F2	GTTCTCGCTGGAGGTGTCTT	59,5	101
	PA_ <i>lcc1</i> _cdc_6441_R2_3	AACATGGTGGTGTCCGTGA	60,9	
<i>lcc2</i>	PA_ <i>lcc2</i> _CDC_1184_F2	CCAACGCTCACCTGTACGA	60,9	106
	PA_ <i>lcc2</i> _CDC_1184_R2	CGTCGAATCGGCAACAC	59,8	
<i>lcc3</i>	PA_ <i>lcc3</i> _cdc_8102_F1	GAACCGACTACTTCTCAGGATACG	60,5	105
	PA_ <i>lcc3</i> _cdc_8102_R1	AACGCAACGCTGACTGG	59,7	
<i>lcc4</i>	PA_ <i>lcc4</i> _cdc_1000_f3	ACCCTCACGCAAGCCTTT	60,8	105
	PA_ <i>lcc4</i> _cdc_1000_r3	AGTCCGCCACACCAACAG	60,7	
<i>lcc5</i>	PA_ <i>lcc5</i> _cdc_6285_F1	ATCCAGAGTGCCATCCTTAATC	59,4	107
	PA_ <i>lcc5</i> _cdc_6285_R1	GAAGTTATCGCCCTTGTTC	59,7	
<i>lcc6</i>	PA_ <i>lcc6</i> _CDC_1184_F3	CAGGAACGGGTGGAGTTG	60,1	90
	PA_ <i>lcc6</i> _CDC_1184_r3	CGAGTTGGTTGTTGACGTTG	60,2	
<i>lcc7</i>	PA_ <i>lcc7</i> _cdc_9737_F5	TTGGGTGCATTACCTCGTG	60,5	89
	PA_ <i>lcc7</i> _cdc_9737_R5	GGGTTTTCCAAAGGAACGA	59,9	
<i>lcc8</i>	PA_ <i>lcc8</i> _cdc_i1_com_F2_2	ATCGTCAACCAGGTCATCG	59,5	120
	PA_ <i>lcc8</i> _cdc_i1_com_R2_2	CTGAACATTGAGCTTGAATCG	60,1	
<i>lcc9</i>	PA_ <i>lcc9</i> _cdc_i5_F3	TCAACGATCACGGTGACG	60,4	81
	PA_ <i>lcc9</i> _cdc_i5_R3	AGGGAAAACCCCATTTGC	59,7	
<i>lcc10</i>	PA_ <i>lcc10</i> _cdc_R2	CGTTGATCGAGAAGTTGTATGC	59,8	87
	PA_ <i>lcc10</i> _cdc_F2_2	GCTGTCGCAATGTTGAGAAG	58,5	
<i>lcc11</i>	PA_ <i>lcc11</i> _cdc_F2	CTCTTAGAGACCAATCTGCATCC	59,4	100
	PA_ <i>lcc11</i> _cdc_R2	CAGTGAAGTTGAACGCAAGG	59,5	
<i>lcc12</i>	PA_ <i>lcc12</i> _cdc_g5_i5_F2	TTGCTTAGTGCGATCCTCTACC	60,8	109
	PA_ <i>lcc12</i> _cdc_g5_r2	AGGGAAGTGTCCATTCACCA	60,4	

**Tabla 2.4:** Cebadores específicos diseñados para qPCR de genes *mnp*

Gen	Nombre	Secuencia 5'->3'	Tm (°C)	Amplicón (pb)
<i>mnp22C</i>	PA_MnP22cc_F3	GACCGCAAAACGTGCAAC	61,3	106
	PA_MnP22cc_R3	GTTTTGGAAGATGGTCTGCTG	59,7	
<i>mnpA</i>	Pa_MnPA_F1	TGCTGGCGTTTGTCTG	60,6	91
	Pa_MnPA_R1	GGAAGATGGTCGTCTGAAGGT	60,5	
<i>mnpB1,2YF</i>	PA_MNPB1,2,F_F2	GATCAAGACGGCTGTGAAGC	61,0	100
	PA_MNPB1,2,F_R2	GCTGGTAAGGGTGGGGAAC	61,7	
<i>mnpC</i>	PA_MNPC_F4	CCGAGGACCTGATCGATTG	61,6	120
	PA_MNPC_R4	AGGTGGTGTTCAGACGAG	59,9	
<i>mnpD</i>	Lu_PA_MnpD_F1	TCTCCCAGTCTAAGGATGTTGG	60,5	86
	Lu_PA_MnpD_R1_1	ACCGTTCGCATGGAAGTTAG	60,1	
<i>mnpE</i>	Pa_mnpEc_F2	CTCAGGACCTCCAAGAGAATGTT	61,0	106
	Pa_mnpEc_R2	CCGAGGCTCTGACTGATACC	59,8	

#### 2.2.2.4 Extracción de ARN para ensayos de expresión por RT-qPCR

El ARN fue extraído de los micelios obtenidos en los mismos cultivos que se ensayó actividad. Los micelios se filtraron en tela estéril, se lavaron en agua destilada estéril y se secaron en papel secante estéril. Los tejidos se pulverizaron con nitrógeno líquido en mortero estéril. Se extrajo ARN de 150 mg de micelio pulverizado con Plant RNAeasy Mini Kit (Qiagen). La cantidad de RNA fue cuantificada con el instrumento Espectrofotómetro de microvolúmenes (Jenway Genova Plus).

#### 2.2.2.5 Síntesis de ADNc

Previo al paso de retrotranscripción (RT) se debe eliminar todo el posible ADN contaminante. Para ello, se trata 1 µg de ARN con 0,4 µL de DNase I (Amplification Grade, Invitrogen) y 1 µL del buffer 10x de DNase I. Se agregó agua DEPC hasta alcanzar el

volumen final de 9,4  $\mu\text{L}$ . Se incubó 17 minutos a temperatura ambiente y finalmente la enzima se inactiva a 65 °C durante 10 minutos <sup>78</sup>.

Una vez eliminado el ADN se prosiguió a realizar la RT. Se agregaron 4  $\mu\text{L}$  de buffer 5 x First Strand (250 mM Tris-HCl (pH=8,3), 375 mM KCl y 15 mM de cloruro de magnesio) (Invitrogen), junto con 1  $\mu\text{L}$  de inhibidor de ARNasa (RNaseOut, Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de enzima M-MLV RT (200 U/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen), 2  $\mu\text{L}$  de DTT 100 mM (Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (Quiagen) y 1  $\mu\text{L}$  de cebadores aleatorios (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Quiagen). Este mix se agregó al volumen resultante del tratamiento con DNasa (volumen final 20,4  $\mu\text{L}$ )<sup>78</sup>.

El programa para la RT fue de 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 37 °C y 15 minutos a 70 °C (Termociclador Labnet Multi Gene II). Una vez finalizado el programa, el ADNc resultante se diluyó  $\frac{1}{4}$  y se almacenó a 4 °C <sup>78</sup>.

#### *2.2.2.6 Amplificación mediante PCR en tiempo real*

Las reacciones de amplificación de los genes de interés se llevaron a cabo en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ , conteniendo 5  $\mu\text{L}$  de QuantiTect SYBR Green PCR master mix (2x) (Quiagen), 0,5  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (concentración final de 6 mM), 2  $\mu\text{L}$  de ADN molde diluido  $\frac{1}{4}$  y agua mQ. La amplificación se realizó utilizando el siguiente programa de ciclado: 95 °C durante 15 minutos (desnaturalización inicial), 30 ciclos de 15 segundos a 94 °C (desnaturalización) y un minuto a 59 °C (hibridación y extensión) <sup>78</sup>. En este último paso es que se configura al instrumento para que realice la medición de fluorescencia.

Una vez finalizada la amplificación, se realizó una curva de *melting* incrementando la temperatura en 0,5°C cada 5 segundos en un gradiente de temperatura comenzando de 60 °C a 95 °C (termociclador Corbett Rotor-Gene 600). Las mediciones se realizaron por duplicado técnico. La especificidad de los cebadores se verificó inspeccionando los perfiles de la curva de *melting* y comparando las temperaturas de *melting* teóricas y prácticas. Para calcular las temperaturas de *melting* teóricas se utilizó la aplicación web

uMELT3.6.2 "Quartz" (<https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/um.php#close>) <sup>79</sup>

utilizando los parámetros termodinámicas de Blake & Decourt 1998 <sup>80</sup>.

#### 2.2.2.7 Validación de genes de referencia

A partir de la literatura se seleccionaron los genes *phos*, *pep*, *sarl*, *gdpc*, *act*, *cyc*, *cyt* y *lip* <sup>77,78</sup>. La idoneidad de los genes seleccionados a ser utilizados como gen de referencia se evaluó en cinco condiciones de cultivo: medio 0,5 % EM (i) incubado por 3 días, (ii) incubado por 20 días (iii) suplementado con RBBR e incubado 3 días, (iv) suplementado con rojo carmín e incubado por 7 días e (v) incubado por 3 meses con *chips* de madera

La estabilidad de la expresión de los genes fue evaluada mediante los algoritmos geNorm <sup>81</sup> y NormFinder <sup>82</sup>.

#### 2.2.2.8 Análisis de expresión transcripcional

El tratamiento de los datos obtenidos se realizó con el programa REST 2009 <sup>83</sup>, normalizando los valores contra la expresión de los genes de referencia *act* y *phos*.

Para estimar la expresión relativa de un gen determinado, este programa comienza por calcular una concentración absoluta intermedia a través de la fórmula:

$$\text{Concentración} = \text{Eficiencia}^{\text{promedio Cp (condición control)} - \text{promedio Cp (condición problema)}}$$

Donde Cp (ciclo umbral) corresponde al valor donde se acumula la fluorescencia y alcanza un umbral (*threshold*) establecido. Esta fórmula se usa para obtener el promedio estimado de la concentración absoluta sin corregir para cada gen. En esta tesis se asumió el valor de eficiencia de 1.

La expresión relativa se calcula como

$$\text{Expresión relativa} = \frac{\text{Concentración del gen problema}}{\text{Promedio (concentración de gen de referencia 1, concentración del gen de referencia 2, etc)}}$$

En el cálculo de expresión relativa se utiliza el promedio de todos los genes de referencia. Este promedio se utiliza como el factor normalizador <sup>81</sup>

Para cada ensayo se realizó dos réplicas técnicas y dos réplicas biológicas. El análisis estadístico se realizó aplicando test de randomización (REST 2009) <sup>83</sup>.

### 3. Resultados

## 3.1 Análisis de la capacidad decolorante de *P. atropurpurascens*

### 3.1.1 Cribado cualitativo en medio sólido

Un método comúnmente empleado para dilucidar rápidamente si un hongo cuenta con enzimas lignolíticas es realizando cribados de decoloración de colorantes. Esta metodología se basa en el análisis semicuantitativo del cambio de color de colorantes como RBBR (Remazol brilliant blue R) en medio sólido debido a reacciones redox provocadas por enzimas oxidantes <sup>84,85</sup>.

Los cromóforos son moléculas responsables de la absorción de luz en los colorantes y pigmentos orgánicos. Esta propiedad se debe al sistema de deslocalización electrónica de doble enlaces conjugados <sup>86</sup>. Los colorantes azo, son compuestos aromáticos caracterizados por la presencia de uniones tipo azo (N=N) <sup>86</sup>; los colorantes trifenilmetano se caracterizan por la presencia de tres grupos fenilos unidos por el átomo de carbono central <sup>87</sup>, las antraquinonas están formadas por un anillo aromático tricíclico (antraceno) que presenta en las posiciones 9 y 10 grupos carbonilo <sup>88</sup>; los xantenos son aquellos que presentan un núcleo como dibenzo-Y-pirona o *xanthylium* <sup>89</sup> y las tiazinas son colorantes que se caracterizan por la presencia de un anillo aromático tricíclico con un átomo de nitrógeno y uno de sulfuro en su anillo central <sup>90</sup> (Figura 3.1 y Anexo 7.1.1).

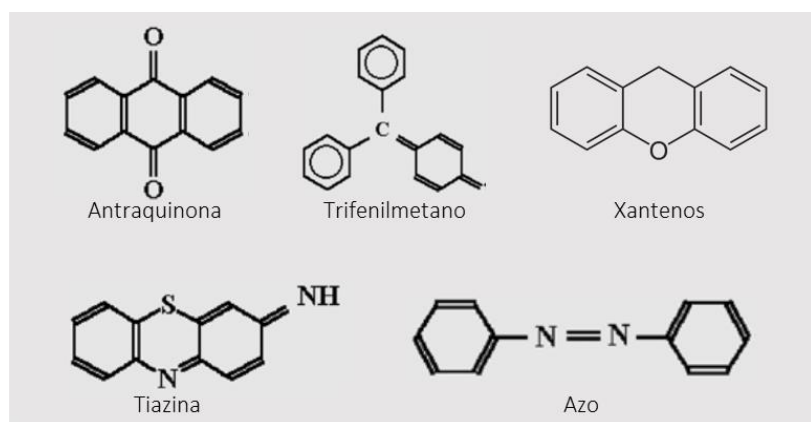


Figura 3.1: Estructura de grupos químicos antraquinona, trifenilmetano, xantenos, tiazina y azo.

En este trabajo se evaluó la capacidad decolorante de *P. atropurpurascens* frente a 28 colorantes, agrupados en cinco categorías según la estructura del cromóforo: 11 colorantes del grupo azo, tres antraquinonas (ANQ), tres xantenos (XNT), nueve trifernilmetanos (TFM) y dos tiazinas (TZN).

Como control positivo se utilizó el HPB *P. chrysosporium*<sup>91-93</sup> y como control negativo el ascomiceto *A. nidulans*, por no ser considerado un HPB debido a que no presenta genes *mnp*, *lip* o *vp*<sup>94,95</sup>.

En términos generales, *P. atropurpurascens* fue capaz de decolorar, y crecer, los 24 colorantes analizados pertenecientes a los diferentes grupos (ANQ, XNT, TFM, AZO y TZN) (Figura 3.2, 3.3 y 3.4).

El control *P. chrysosporium* fue capaz de degradar 19 de los 24 colorantes; en presencia de los cinco colorantes restantes, no pudo crecer en: tres TFM (verde malaquita, verde brillante y azul victoria 4R), un AZO (Crisoidina) y un XNT (Dibromo fluoresceína) (Figura 3.3.B).

Como era de esperar *A. nidulans*, control negativo, no fue capaz de degradar la mayoría de los colorantes, sin embargo, se observó crecimiento y decoloración parcial de cinco colorantes ensayados. Por ejemplo, se observó crecimiento de *A. nidulans* en presencia de Crisoidina y un halo de menor de coloración que rodea el micelio del hongo (Figura 3.3.B). El mismo efecto se observó en presencia de Rojo congo, Rojo bordó, Rojo metilo y Alizarina S (Figura 3.4).

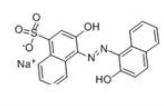

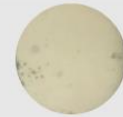


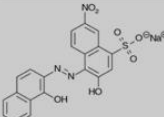
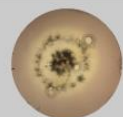



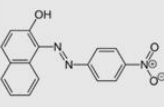




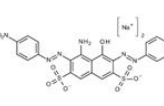




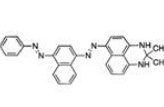
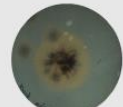



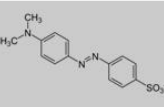
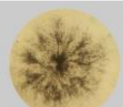

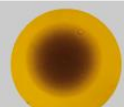
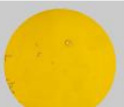
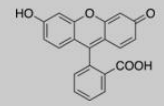
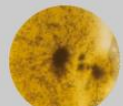



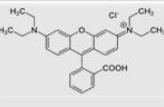




Colorante	Estructura colorante	<i>Punctularia atropurpurascens</i>	<i>Phanerochaete chysosporium</i>	<i>Apergillius nidulans</i>	Control
AZO					
Azul Eriocromo RSS					
Negro eriocromo T					
Rojo PNA					
Amido black 10B					
Negro sudán					
Naranja metilo					
XNT					
Fluoresceína					
Rodamina B					

Figura 3.2.1: Colorantes químicos del grupo AZO y XNT empleados para el cribado de la capacidad de decoloración de *P. atropurpurascens*. Control positivo: *P. chysosporium*. Control negativo: *A. nidulans*. Control de crecimiento: Control (EM con colorante y sin microorganismo).

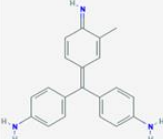




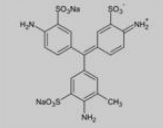




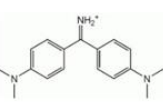
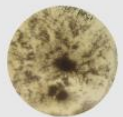


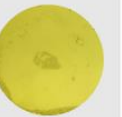
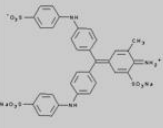
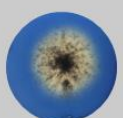



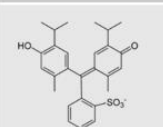
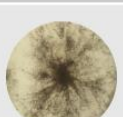



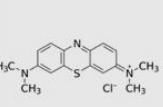

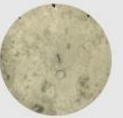


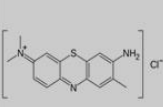

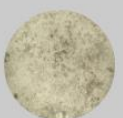


Colorante	Estructura colorante	<i>Punctularia atropurpurascens</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Apergillius nidulans</i>	Control
TFM					
Diamante fucsina					
Fucsina ácida					
Auramnina					
Azul de anilina					
Azul de Timol					
TZN					
Azul de metileno					
Azul de tolouidina					

Figura 3.2.2: Colorantes químicos del grupo TFM y TZN empleados para el cribado de la capacidad de decoloración de *P. atropurpurascens*. Control positivo: *P. chrysosporium*. Control negativo: *A. nidulans*. Control de crecimiento: Control (EM con colorante y sin microorganismo).

A

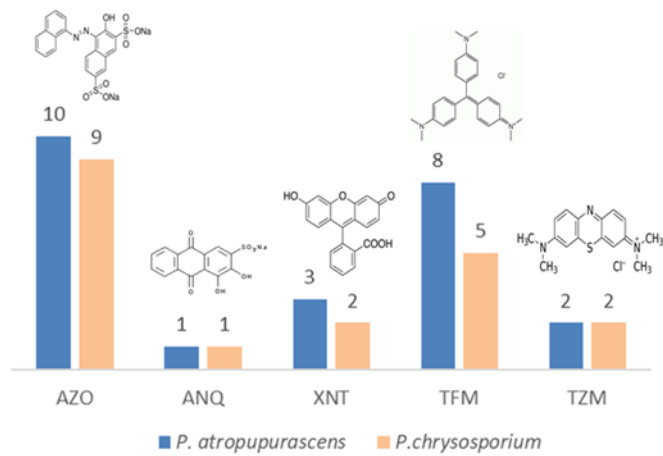
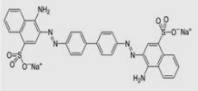
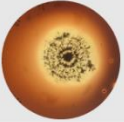
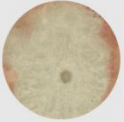
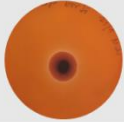

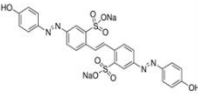
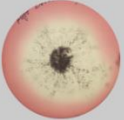



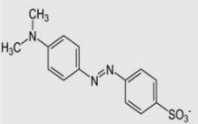
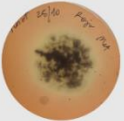
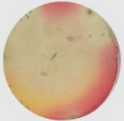
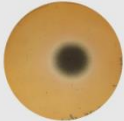

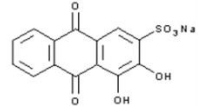

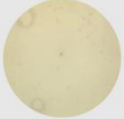
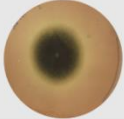



Figura 3.3: A - Colorantes químicos degradados por *P. atropurpurascens* y *P. chrysosporium*. Se evaluaron un total de 24 colorantes clasificados en AZO (10), AN1 (1), TFM (8), XNT (3) y TZN (2). El número arriba de las gráficas de barra indica la cantidad de colorantes sobre los que el hongo puede crecer y decolorar. B - Ensayo de decoloración en placa. Se muestran los cinco colorantes degradados por *P. atropurpurascens* que no son alterados por el modelo biológico *P. chrysosporium*. Control: medio de cultivo con colorante sin inocular e incubado en las mismas condiciones que los demás ensayos.

B

Colorante	Estructura colorante	<i>Punctularia atropurpurascens</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	Control
AZO					
Crisoidina					
TFM					
Azul Victoria 4R					
Verde brillante					
Verde malaquita					
XNT					
Dibromo fluoresceína					

Colorante	Estructura colorante	<i>Punctularia atropurpurascens</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Apergillus nidulans</i>	Control
AZO					
Rojo congo					
Rojo bordó					
Rojo metilo					
ANQ					
Alizarina S					

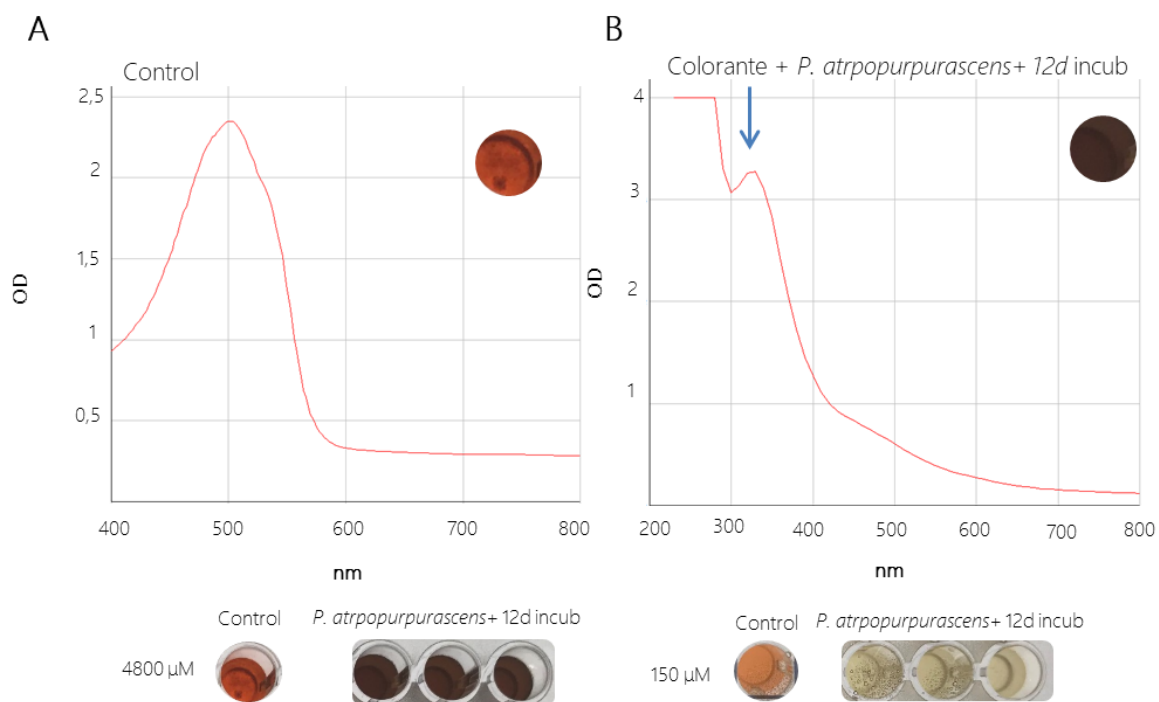
**Figura 3.4:** Colorantes susceptibles a la degradación en *A. nidulans*. Se muestran los cuatros colorantes que, junto a Crisoidina (Figura 3.2.B) presentan un halo de decoloración alrededor del micelio del control *A. nidulans*.

La decoloración por parte del control negativo se puede deber a la adsorción inespecífica de colorante sobre el micelio del hongo o también debido a la acción de lacasas <sup>96,97</sup>. Este hongo contiene en su genoma secuencias que codifican lacasas pero no así peroxidasas específicas del sistema lignolítico <sup>94,95</sup>.

La degradación de ciertos colorantes, tanto por *P. atropurpurascens* como *P. chrysosporium*, da lugar a coloraciones intermedias. Así, el Rojo metilo, pasa por un color rosa intermedio, antes de decolorarse completamente. Lo mismo sucede en colorantes como Rojo congo, que pasa por tonalidades cobre, para luego suavizarse hacia colores más beige y terminar en la decoloración total (Figura 3.4). Estas observaciones también aplican para colorantes como Rodamina B y Fluoresceína (Figura 3.2.1), Azul Victoria 4R

(Figura 3.3), Cristal violeta y Rojo carmín (datos no mostrados), donde antes de perder totalmente la coloración, se observan cambios en los tonos de coloración.

En el caso de Naranja de metilo, no se observa cambio de coloración en placa con 150  $\mu\text{M}$  (Figura 3.2.1) ni en cultivos líquidos con la misma concentración de colorante. Sin embargo, a mayores concentraciones el colorante se torna más oscuro, hacia las tonalidades marrones (Figura 3.5). Se registró el espectro de absorbancia del sobrenadante de cultivos de *P. atropurpurascens* en medio EM líquido y 4800  $\mu\text{M}$  de Naranja de metilo luego del cambio de coloración a marrón (12 días de incubación) y se comparó con el espectro del mismo medio y las mismas condiciones de incubación, pero sin inocular (control de oxidación química) (Figura 3.5).



**Figura 3.5:** Espectro de absorbancia de cultivos de *P. atropurpurascens* con Naranja de metilo. Medio 0,5% EM líquido con 4800  $\mu\text{M}$  de colorante a incubado a 28 °C por 12 días. A- Control sin inocular, B-inoculado con *P. atropurpurascens*. Pie de figura: imágenes de cultivos líquidos con 4800  $\mu\text{M}$  y 150  $\mu\text{M}$  de colorante y sus controles sin inocular.

En la Figura 3.5 se observa el cambio de perfil; con un corrimiento en el pico de máxima absorbancia de 500 nm a 375 nm en el cultivo con *P. atropurpurascens* respecto al

control. En el pie de la figura se muestra una imagen cultivos líquidos con 4800  $\mu\text{M}$  y 150  $\mu\text{M}$  de Naranja de metilo y sus controles sin inocular. Es de destacar que a la menor concentración no se observó cambio de coloración ninguno de los días previos, probablemente porque a esa concentración no sea detectable a simple vista. Para corroborar si se detecta cambio en el máximo de absorbancia también a menor concentración de colorante, se podría también hacer un barrido de absorbancia en el rango UV-visible.

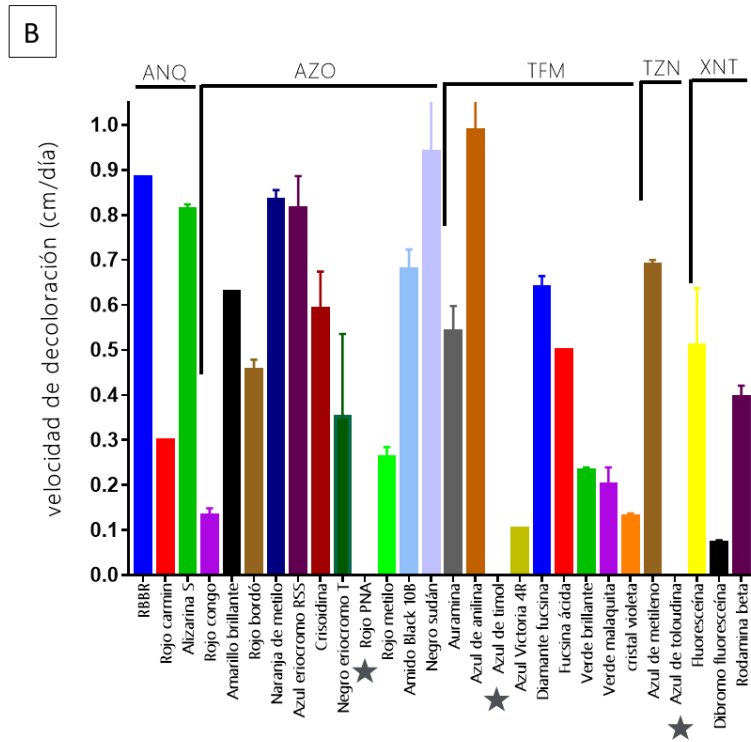
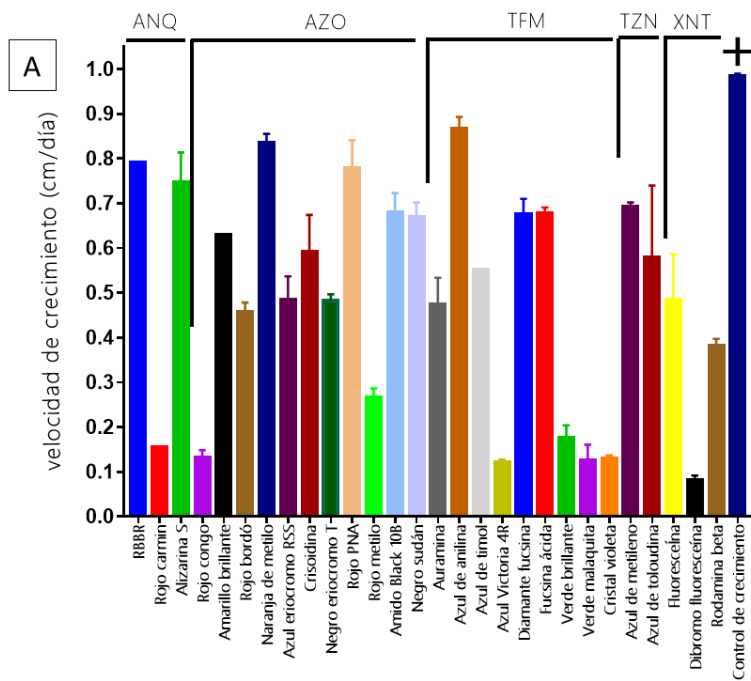
La transformación a otras estructuras coloreadas puede deberse a la oxidación del compuesto hacia conformaciones oxidadas intermedias que luego continúan oxidándose hasta perder completamente su capacidad de absorción de luz por ruptura de los cromóforos. La elucidación de intermediarios a través de técnicas como LC-MS/MS permitiría profundizar en los mecanismos oxidativos que van sucediendo en el proceso<sup>98</sup>. Otra razón por la que se podría dar el cambio de coloración, podría ser un cambio de pH en el medio, por lo que una posible corrección en el ensayo sería realizar los medios de cultivo con solución tampón.

Una observación general es que el micelio de *P. atropurpurascens* crece de forma diferente en presencia de los distintos colorantes (Figuras 3.2, 3.3 y 3.4). En presencia de TFM se observa un micelio más compacto con alta densidad de esporas. Por otro lado, en presencia de Rojo bordó, las esporas se centran en la zona de inoculación, mientras que con Dibromo fluoresceína, las esporas se encuentran dispersas en todo el micelio. Estos resultados podrían indicar que la presencia de colorantes afecta en cierta medida la morfología o el ciclo de vida de *P. atropurpurascens*.

### 3.1.2 Cinéticas de decoloración y de crecimiento

Como parte de la evaluación del comportamiento de *P. atropurpurascens* en presencia de colorante, se hicieron medidas periódicas del crecimiento del micelio, así como del halo de decoloración. En este estudio no se incluyó *P. chrysosporium* debido a su crecimiento no compacto, con hifas dispersas que alcanzan rápidamente los límites de la placa y a que, como consecuencia de la forma de crecimiento, la decoloración se da de forma homogénea en toda la placa.

En la Figura 3.6 se muestran las velocidades de crecimiento ( $V_{cre}$ ) y de decoloración ( $V_{dec}$ ) de *P. atropurpurascens* cuando crece en medio sólido (AEM) con colorantes. Las velocidades surgen de la pendiente del gráfico diámetro del micelio/halo de decoloración (cm) en función del tiempo (días) (Figura A.4 y Figura A.5).



**Figura 3.6:** A- Velocidad de crecimiento ( $V_{cre}$ ); B- Velocidad de decoloración ( $V_{dec}$ ) de *P. atropurpurascens*. Cultivos en medio sólido 0,5% AEM y 150  $\mu$ M de colorante. Los valores  $V_{cre}$  y  $V_{dec}$  corresponden a las pendientes de los gráficos: diámetro micelio/halo de decoloración (cm) en función del tiempo (días). El control de crecimiento no incluye colorante. ★ $V_{dec}$  no determinadas. El alto de las barras representa el promedio de  $V_{cre}/V_{dec}$  y las líneas truncas, el desvío estándar.

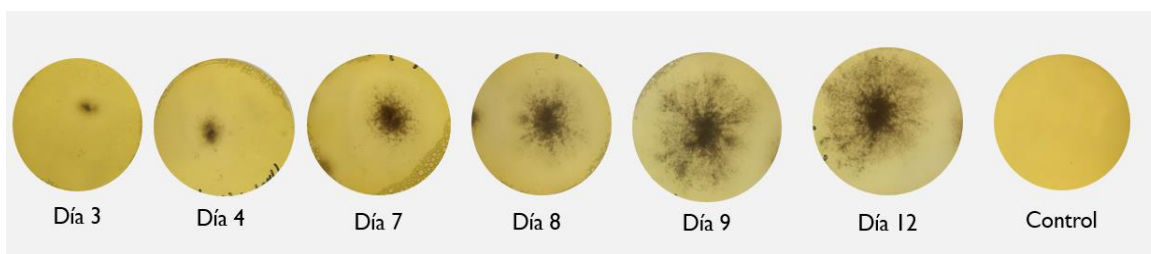
Todos los colorantes afectan en mayor o menor grado el crecimiento (reducción de  $V_{cre}$ ) de *P. atropurpurascens*; como era de esperar ninguno de los colorantes analizados estimula el crecimiento del hongo. Dentro de cada categoría química se observa diferentes velocidades de crecimiento y de decoloración no evidenciándose una tendencia relacionada a la química del cromóforo.

En proporción, 4 de 9 colorantes TFM reducen la velocidad de crecimiento del hongo por debajo de 30% de la velocidad del control de crecimiento (0,98 cm/día). Estos cuatro colorantes (Verde malaquita, Verde brillante, Azul victoria 4R y Cristal violeta) fueron sustratos en los cuales *P. chrysosporium* no pudo crecer (Figura 3.3). Velocidades reducidas al 30% o inferiores también se observan en presencia de dos de los 11 colorantes AZO (Rojo Congo y Rojo de metilo) y uno de los tres colorantes ANQ (Rojo carmín) y XNT (Fluoresceína diBromo). En particular, la Dibromo fluoresceína es el colorante que mayor efecto tiene sobre la velocidad de crecimiento, reduciéndola a 0,08 cm/día. Estructuralmente hablando, este colorante es muy similar a la Fluoresceína (Figura 3.2, Figura 3.3 y Anexo 7.1.1) pero con la diferencia de contener bromo y mercurio en su conformación. Sin embargo, el hongo en presencia de la Fluoresceína crece en promedio a 0,46 cm/día. Del grupo TZN se analizaron solo dos colorantes y ambos mostraron menor efecto sobre el crecimiento. En presencia de Azul de metileno y Azul de toluidina, *P. atropurpurascens* creció a 0,69 cm/ y 0,58 cm/día respectivamente, una reducción cercana al 30 y 40% de la velocidad del control. El resto de los colorantes afectaron la velocidad de crecimiento en diferentes grados con reducciones que van desde 10 al 60%.

En cuanto a las velocidades de decoloración, el colorante con  $V_{dec}$  más alta fue el Azul de anilina (0,98 cm/día), que también fue el colorante sobre el cual el hongo tuvo una mayor velocidad de crecimiento (0,86 cm/día). En segundo y tercer puesto, se encuentran los colorantes AZO; RBBR y Alizarina S, cuya velocidad de decoloración fue de 0,88 cm/día y 0,80 cm/día. A pesar de que dentro de los grupos de los TFM se encuentre el

colorante de mayor velocidad de decoloración, este grupo también contiene en proporción la mayor cantidad de colorantes más lentamente degradados. En general, la velocidad de decoloración se acompaña con la velocidad de crecimiento, excepto para el colorante Negro sudán, cuya velocidad de decoloración es de 0,94 cm/día y el de crecimiento es de 0,67 cm/día.

Cabe destacar que el seguimiento del halo de la decoloración en Azul de Timol, Rojo PNA y Azul de toluidina no se pudo realizar, porque la decoloración no tuvo un comportamiento geométrico definido o porque la intensidad de decoloración no era tan fácilmente detectable a simple vista (Figura 3.7).



**Figura 3.7:** Seguimiento de la decoloración de Azul de Timol por *P. atropurpurascens* en función de los días.

El día de inicio (visible) de decoloración (ID) también fueron diferentes entre los cromóforos. En la Tabla 3.1 se muestra el día del comienzo de decoloración o cambio de coloración para los medios con colorante sembrados con punción de *P. atropurpurascens* y *P. chrysosporium*.

Debido a que no se puede calcular la velocidad de decoloración y crecimiento de *P. chrysosporium* se determinó el parámetro TTD (tiempo total de decoloración), que indica la cantidad de días que transcurrieron desde que se observa decoloración o cambio de coloración, hasta la decoloración total de la placa. Este parámetro permite comparar los cultivos de *P. atropurpurascens* y *P. chrysosporium* y conocer cuál de los dos organismos logra decolorar más rápido una vez que comienza la decoloración.

**Tabla 3.1:** Parámetros de decoloración de *P. atropurascens* y *P. chrysosporium* en medio sólido AEM a 28 °C. Vcrec: velocidad de crecimiento (cm/día), Vdec: velocidad de decoloración (cm/día), ID: Inicio de decoloración o \*cambio de color, TTD: Tiempo total de decoloración (días), ND: No determinado, NC: No creció

		<i>P. atropurascens</i>				<i>P. chrysosporium</i>	
Colorante	Observaciones	Vcrec	Vdec	ID	TTD	ID	TTD
<b>TZN</b>							
Azul de metileno		0,69	0,68	8	6	4	3
Azul de toluidina	Inicio de decoloración indefinido	0,56	ND	ND	35	4	3
<b>ANQ</b>							
RBRR		0,79	0,88	4	13	ND	ND
Rojo carmin	Coloración intermedia cobre	0,15	0,30	3	33	ND	ND
Alizarina S		0,76	0,81	3	8	3	7
<b>XNT</b>							
Fluoresceína	Coloración intermedia naranja*	0,47	0,49	7	12	5	20
Dibromo fluoresceína	Patrón de decoloración inusual, no uniforme, por sectores	0,08	0,07	27	41	NC	NC
Rodamina beta	Coloración intermedia naranja	0,38	0,42	8	17	4	3
<b>AZO</b>							
Rojo congo	Coloración intermedia cobre	0,13	0,13	10	56	8	15
Amarillo brillante		0,63	0,63	4	16	ND	ND
Rojo bordó		0,45	0,45	4	17	7	3
Naranja de metilo	Coloración intermedia cobre	0,60	0,82	8	7	6	2
Azul eriocromo RSS 140%		0,50	0,80	4	17	ND	11
Crisoidina	Inicio de decoloración indefinido	0,52	0,52	ND	ND	NC	NC
Negro eriocromo T		0,48	0,56	4	15	3	15
Rojo PNA	Inicio de decoloración indefinido	0,85	ND	ND	15	ND	11
Rojo metilo		0,26	0,27	6	28	ND	5
Amido Black 10B		0,66	0,66	6	12	6	5
Negro sudán		0,63	0,83	4	8	ND	5
<b>TFM</b>							
Cristal violeta	Coloración intermedia rosa	0,13	0,13	10	59	ND	ND
Auramina		0,51	0,55	7	11	4	6
Azul de anilina		0,87	0,99	7	4	5	2
Azul de timol		0,55	ND	ND	12	5	2
Azul victoria 4R	Coloración intermedia rosa	0,12	0,10	14	76	NC	NC
Diamante fucsina		0,68	0,64	7	13	ND	5
Fucsina ácida		0,68	0,42	7	7	ND	5
Verde brillante		0,19	0,23	5	28	NC	NC
Verde malaquita		0,14	0,19	6	40	NC	NC

A pesar de que *P. chrysosporium* no pudiera crecer en presencia de cinco colorantes, en aquellos que fue capaz de crecer, logró decolorar (mayoritariamente) a un tiempo menor que el *P. atropurpurascens* en estudio.

En un total de 17/24 colorantes, el control positivo fue capaz de decolorar completamente la placa a un TTD menor que *P. atropurpurascens* (Tabla 3.1). En colorantes como Rojo congo o Rojo de metilo, *P. chrysosporium* fue capaz de decolorar el colorante en su totalidad en menos de 15 y 5 días respectivamente, frente a *P. atropurpurascens* que lo logró al día 56 y 28 de iniciada la decoloración. Únicamente en el medio inoculado con Fluoresceína, *P. chrysosporium* fue más lento en la decoloración (22 días en comparación con los 12 días que le tomó decolorar *P. atropurpurascens*). Además, el inicio de la decoloración fue visualmente más notorio en los cultivos con *P. chrysosporium* y más temprano que con *P. atropurpurascens*, lo cual disminuye posibles errores de apreciación.

Es importante resaltar que en este trabajo se evaluaron 24 colorantes; los datos correspondientes a Cristal violeta, Amarillo brillante, RBBR y Rojo carmín, que se incluyen en la Tabla 3.1, habían sido obtenidos previamente en el laboratorio.

### 3.1.3 Potencial de reducción de los colorantes a circuito abierto

En la sección 3.1.2 vimos que los colorantes tienen diferentes  $V_{dec}$ , inclusive dentro de la misma categoría química. Esta diferencia de  $V_{dec}$  podría deberse a la diferencia entre los potenciales redox de los cromóforos. A potenciales de reducción más bajos, el colorante podría tener una mayor tendencia a ser oxidado.

En este trabajo nos centramos principalmente en el estudio de lacasas y peroxidasas, especialmente en MnP y LiP. Las enzimas tipo lacasas tienen un potencial de reducción de 420-790 mV mientras que MnP y LiP puede llegar a tener potenciales  $>1,3$  V<sup>14,22</sup>. Entendiendo que, si un colorante presenta un potencial de reducción entre 0,8 V y 1,3 V,

no podría ser oxidado por una lacasa pero sí por una peroxidasas y que la diferencia de potencial entre los cromóforos puede determinar la facilidad en que el colorante puede ser oxidado-reducido, decidimos medir el potencial redox de los colorantes a circuito abierto.

El potencial de circuito abierto (PCA), es una medida muy útil para la estimación de la facilidad de oxidoreducción de un compuesto. Las reacciones redox en medios acuosos son procesos electroquímicos donde ocurren intercambios de electrones. Este flujo de carga eléctrica puede ser monitoreada en una celda electroquímica, donde el potencial del electrodo se relaciona con las variables termodinámicas que determinan la espontaneidad del proceso. En las reacciones redox existen dos tipos de reacciones electródicas, la oxidación y la reducción, que suceden de forma simultánea en el ánodo y cátodo respectivamente. Asumiendo que el electrodo tiene el mismo potencial en toda su superficie y que la especie a oxidarse-reducirse tiende a asumir un único potencial del electrodo, entonces las áreas catódicas y anódicas se polarizarán entre sí hasta alcanzar un solo valor de potencial. Esto se conoce como potencial de circuito abierto (PCA) <sup>99</sup>.

A partir del cribado de capacidad decolorante, seleccionamos de cada grupo un par de colorantes con velocidades de crecimiento o decoloración diferentes, uno mayor y otro menor a 0,3 cm/día y se incluyó en el estudio también el colorante Azul Victoria 4R, por tener un  $V_{dec}$  especialmente baja dentro de los grupos TFM. Se midió el potencial a PCA en un sistema de tres electrodos de los colorantes seleccionados (Tabla 3.2).

Todos los potenciales de reducción son menores a 700 mV, por lo que en teoría podrían ser oxidados tanto por Lcc como por MnP y LiP. Dentro del grupo de los TFM, el Diamante fucsina fue aquel con mayor potencial ( $E=556,1$  mV). Los dos colorantes AZO tienen un potencial muy cercano, siendo  $E=557,7$  mV para Amido black B y 540 mV para Rojo congo. Los colorantes del grupo ANQ, Rojo carmín y RBBR, también tienen un potencial de reducción cercano entre ellos de 543,4 mV y 562,6 mV respectivamente. Finalmente,

dentro del grupo XNT, la fluoresceína dibromo tiene un potencial de reducción superior ( $E=547,4$  mV) al de Fluoresceína ( $E=512,9$  mV). Estos resultados no explican las diferencias entre las  $V_{dec}$ . Por ejemplo, la  $V_{dec}$  de Diamante fucsina fue de  $0,64$  cm/día ( $556,1$  mV) mientras que la de Verde malaquita y Azul victoria 4R fue de  $0,23$  y  $0,10$  cm/día ( $435,9$  mV y  $466,9$  mV respectivamente).

**Tabla 3.2:** Potencial de reducción colorantes medido a potencial abierto.

Colorante	Grupo	$V_{dec}$ (cm/día)	Potencial trabajo (mV)	Potencial reducción (mV)
RBBR	ANQ	0,88	342,6	562,6
Rojo carmín	ANQ	0,3	323,4	543,4
Amido black B	AZO	0,68	337,7	557,7
Rojo congo	AZO	0,13	320	540
Azul Victoria 4R	TFM	0,10	246,9	466,9
Diamante fucsina	TFM	0,64	336,1	556,1
Verde malaquita	TFM	0,23	215,9	435,9
Fluoresceína	XNT	0,5	292,9	512,9
Dibromo fluoresceína	XNT	0,07	327,4	547,4

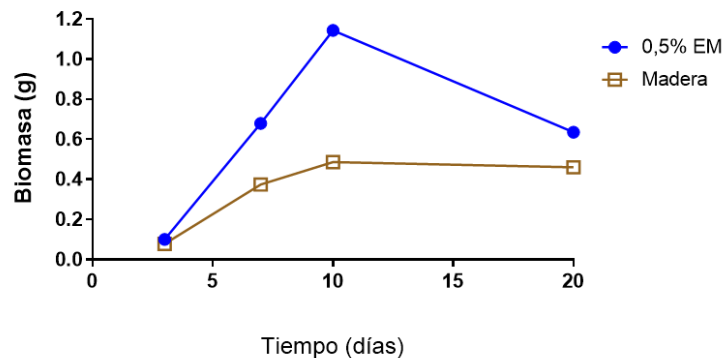
### 3.2 Actividad enzimática de enzimas lignolíticas

Los hongos han sido postulados como potenciales herramientas a utilizar en la biorremediación de efluentes industriales, principalmente en la industria textil <sup>32,57,62,86,100</sup>, debido a la expresión y excreción de peroxidasas y oxidasas de alto poder redox, que actúan de forma inespecífica. Estas enzimas son capaces de oxidar y degradar una amplia gama de compuestos fenólicos como colorantes textiles tóxicos.

Partiendo de la hipótesis de que la degradación de los colorantes observados en el cribado se debe principalmente a enzimas lignolíticas presentes en los hongos, procedimos a evaluar el comportamiento de la actividad enzimática de MnP, Lcc y Lip cuando se cultiva a *P. atropurpurascens* en medio líquido, con los ocho colorantes seleccionados en función de  $V_{dec}$  (Tabla 3.2, Sección 3.1.3) excepto Azul Victoria 4R. Los

ensayos se realizaron a partir de cultivos de 100 mL en medio EM con colorante, incubados sin agitación a 28 °C (Materiales y métodos; Sección 2.1.5) de los cuales se tomaron muestras del sobrenadante de forma periódica para evaluar las actividades enzimáticas.

Se realizaron curvas de biomasa húmeda en función del tiempo de crecimiento de *P. atropurpurascens* incubado en EM y en presencia de *chips* de madera de *Eucalyptus* (Figura 3.8). Se observa que la biomasa producida en ambos cultivos varía notablemente entre ambas condiciones de cultivo. Al día 10 se alcanza el máximo de masa de micelio en gramos, para luego comenzar a reducirse hacia el final del día 20 (medio EM) o mantenerse estable (con madera). Esta diferencia en la biomasa puede deberse a que las hifas crecen penetrando la madera, por lo que la presencia de biomasa en el sobrenadante es muy reducida.



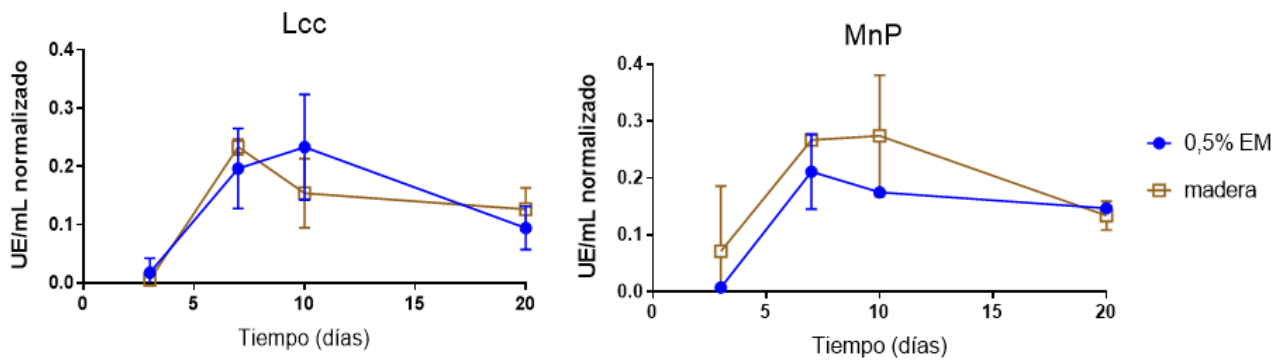
**Figura 3.8:** Biomasa (g) producida en medio de cultivo EM y suplementado con *chips* de madera en función del tiempo (días).

Se midieron las actividades MnP, LiP y Lcc en los sobrenadantes de cultivo los días 3,7,10 y 20 de incubación. Debido a las diferencias de biomasa generados en cada condición se normalizó la actividad enzimática por el peso de micelio.

En ninguna de las condiciones ensayadas se detectó actividad LiP, lo que coincide con lo reportado por Alborés et al. 2014<sup>68</sup>. Se realizó de forma complementaria una búsqueda

sobre el genoma de *P. strigosozonata* depositado en JGI, con resultados negativos. Estos datos refuerzan la idea de que *P. atropurpurascens* tampoco contenga secuencias *lip* en su genoma.

*P. atropurpurascens* es capaz de producir Lcc y MnP en medio EM, sin la necesidad del agregado de un inductor específico ya que la actividad normalizada no muestra una diferencia notoria entre las dos condiciones de cultivo (Figura 3.9). Los perfiles de actividad enzimática Lcc y MnP son similares con máximos entre los días 7 y 10 de cultivo, para luego disminuir hacia el día 20.

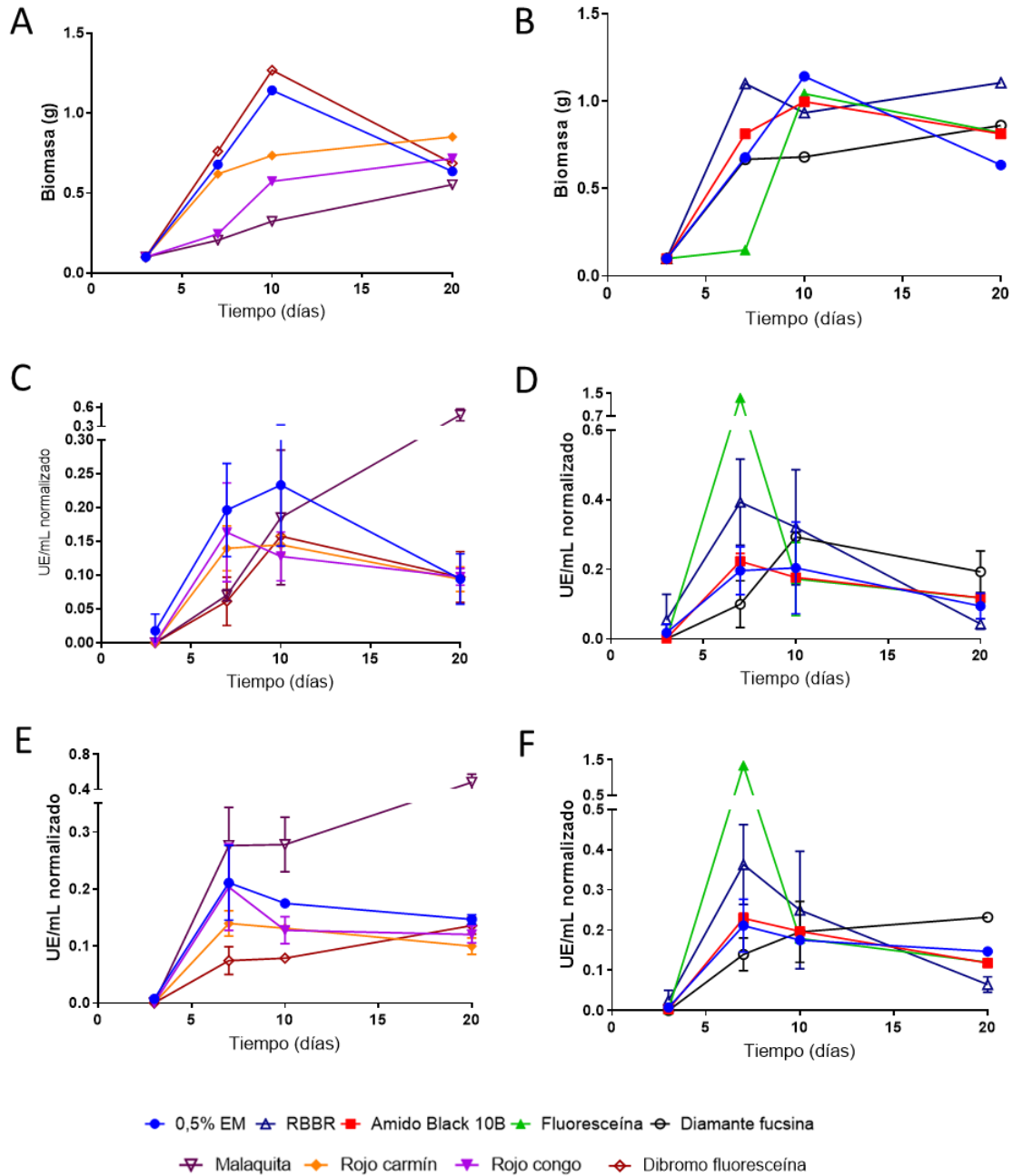


**Figura 3.9:** Actividad enzimática MnP y Lcc de *P. atropurpurascens* en presencia de madera. Se midió la actividad enzimática (UE/mL) en los sobrenadantes de cultivos en medio líquido con 0,5% de extracto de malta (EM) y *chips* de madera, a los 3, 7, 10 y 20 días de incubación. La actividad enzimática se normalizó por la biomasa (g).

En la sección 3.1.2 se evaluaron las cinéticas de crecimiento y decoloración de *P. atropurpurascens* en medio sólido con el agregado de colorantes. Se observó que todos los colorantes afectaban la velocidad de crecimiento del basidiomicete. Para continuar con el estudio de comportamiento de *P. atropurpurascens* en presencia de colorantes, se evaluó el crecimiento y la actividad enzimática (normalizada a la biomasa) en medio líquido (Figura 3.10).

En estas condiciones (medio líquido), la biomasa correspondiente al cultivo sin colorantes aumentó hasta valores de 1,1 gr (día 10) y luego disminuye a la mitad (día 20). Este

comportamiento ya había sido observado en medio líquido con diferentes composiciones, difiriendo en el rendimiento según la composición del medio.



**Figura 3.10:** Cuantificación de biomasa y de actividad enzimática MnP y Lcc de *P. atropurpurascens* en presencia de colorantes. Medio EM líquido. A y B- Biomasa en presencia de colorantes que reducen la Vcre a valores: A- menores al 30% (tóxicos) y B- entre 50% y 90% (no tóxicos). 0,5% EM: control sin colorantes. Actividad enzimática medida en los sobrenadantes a los 3, 7, 10 y 20 días de incubación: C y D- Lcc; E y F- MnP. La actividad enzimática se normalizó por la biomasa (g). Los ejes no son proporcionales.

El análisis de los resultados hasta el día 10 indica que la mayoría de los colorantes tienen efectos similares a los observados en el crecimiento en placa (sección 3.1.2). Aquellos definidos como "no tóxicos" tienen bajo efecto sobre el crecimiento en ambas condiciones, mientras que los definidos como "tóxicos" reducen significativamente el crecimiento independiente del tipo de medio. Sin embargo, se observaron diferentes comportamientos en presencia de Dibromo fluoresceína y Diamante fucsina. La presencia de Dibromo fluoresceína no afecta el crecimiento en medio líquido, mostrando un perfil y rendimiento similar a los del control. Cabe recordar que, en medio sólido, la reducción de  $V_{cre}$  fue cercana al 90% (0,08 cm/día) (Figura 3.6 y Figura A.2). Por otra parte, y siempre evaluando hasta el día 10, la presencia de Diamante fucsina no afectó el crecimiento en medio sólido, mientras que se obtuvo una disminución de la  $V_{cre}$  y del rendimiento en biomasa (~0,7 g) con relación al control (Figura 3.6 y Figura A.2).

En términos generales la actividad MnP (normalizada por la biomasa) en presencia de colorantes "tóxicos" se ve reducida en relación a la actividad del control, excepto con Verde malaquita (Figura 3.10.C y E) que mostró un aumento desde el día 10. La actividad Lcc parecería tener la misma tendencia que la MnP, en Verde malaquita incluido, pero los valores no son significativos como en el caso anterior. Sobre el día 20 de incubación, este en presencia de Verde malaquita la actividad MnP y Lcc tienen un aumento significativo ( $0,48 \pm 0,09$  UE\*g/mL y  $0,48 \pm 0,09$  g/mL respectivamente) en comparación con el control ( $0,15 \pm 0,01$  UE\*g/mL y  $0,09 \pm 0,04$  UE\*g/mL respectivamente).

En el caso de colorantes "no tóxicos", los perfiles de actividad Lcc y Mnp son similares (Figura 3.10.D y F). La Fluoresceína es el colorante que más se destaca sobre el día 7, ya que su biomasa es muy baja y las actividades altas ( $1,13 \pm 0,001$  UE\*g/mL tanto para Lcc como MnP) en relación al control ( $0,20 \pm 0,07$  UE\*g/mL y  $0,21 \pm 0,07$  UE\*g/mL respectivamente), seguido del RBBR ( $0,39 \pm 0,12$  y  $0,36 \pm 0,01$  UE\*g/mL respectivamente). Al día 20, Diamante fucsina es el único de estos colorantes con niveles de actividad por

encima del control ( $0,19 \pm 0,06$  UE\*g/mL y  $0,23 \pm 0,01$  UE\*g/mL). Con Amido black B, no se observaron diferencias en las actividades enzimáticas en relación al control.

Como era de esperar, estos resultados indican que la presencia de colorantes además de afectar el crecimiento, altera el perfil de actividad enzimática MnP y Lcc.

Hay que resaltar que la siringaldazina en presencia de peróxido de oxígeno puede ser oxidada por peroxidasas<sup>101</sup>. Esta molécula puede encontrarse en el sobrenadante de cultivo debido al propio metabolismo del hongo. Debido a que no detectamos actividad LiP y que la MnP requiere del agregado de  $Mn^{2+}$  para actuar, se descarta la posibilidad de que estas enzimas estén interfiriendo en la medida de actividad de lacasas. Pero, por otra parte, no se puede descartar la opción de que haya otras peroxidasas genéricas en el medio, por lo que sería importante agregar catalasa a la muestra a la que se le va a medir la actividad. De esta forma, nos aseguraríamos de que el cambio de color violeta se debe exclusivamente a la acción de lacasas.

### 3.3 Identificación de secuencias lignolíticas y genes de referencia

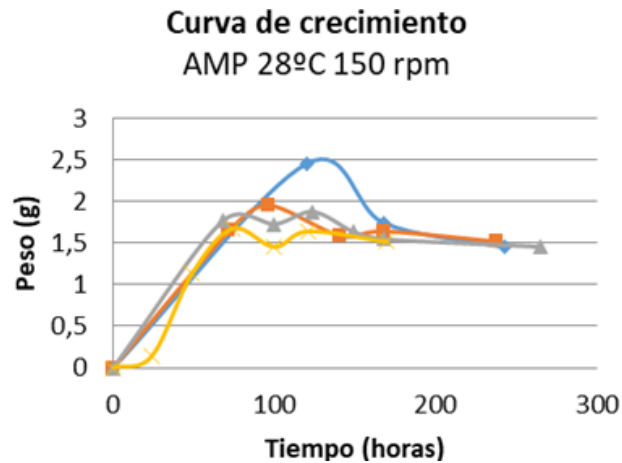
Las enzimas lignolíticas como manganeso peroxidasa, lignino peroxidasa, lacasas entre otras tienen un rol preponderante en la capacidad de los HPB en mineralizar la lignina y poder acceder a fuentes de carbono. Su importancia ecológica se ve reflejada en redundancia de genes lignolíticos que presentan estos hongos produciendo isoformas que se diferencian en su regulación y propiedades fisicoquímicas y cinéticas que corresponderían a su rol biológico<sup>20,24</sup>.

Con el objetivo de indagar las capacidades oxidoreductoras de *P. atropurpurascens*, se buscaron las secuencias *lcc*, *mnp* y *lip* en su genoma, así como en transcryptomas en condiciones de inducción (medio lingolítico, madera como fuente de nutrientes) y no-

inducción (medio de cultivo con alta concentración de nutrientes sin madera). La obtención del material biológico implicó ensayar diferentes estrategias:

Cultivos en madera. Se probaron diferentes condiciones de crecimiento en EM 0,05% y madera de *Eucalyptus*. Se evaluó madera en diferentes formatos, *chips* de 5 x 5 x 0,5cm, aserrín y polvo de cepillado en cantidades equivalentes en gramos y distintos acondicionamientos del cultivo: (i) placas de Petri con 1 chip /placa y medio semisólido por agregado de agar 7%; (ii) frascos con 5 *chips* (o equivalente) /frasco y medio líquido, (iii) frascos con 5 *chips* fijados en medio sólido y una sobrecapa de medio líquido. Para todos los ensayos, hechos por quintuplicado, se evaluó el peso de micelio obtenido y la facilidad de manipulación para su recuperación. A partir de los resultados se hicieron los cultivos para extracción de ARN a secuenciar por triplicado en las condiciones (ii) con 5 *chips*/frasco y medio líquido.

Cultivos en medio rico. Para obtener un cultivo no inducido se buscaron condiciones de alta velocidad de crecimiento en la fase exponencial. Se evaluaron distintas composiciones del medio líquido variando las concentraciones de EM suplementado con 3% peptona o 1,5% de glucosa incubados sin agitación y con agitación (150, 180 rpm). El crecimiento se siguió durante 9 días. El mayor rendimiento de micelio (peso húmedo) en fase exponencial se obtuvo a las 72 horas en medio 1,25% EM, 3% peptona y pH=5.6 con agitación (150 rpm) (Figura 3.11). En estas condiciones se obtuvieron tres muestras independientes de ARN en cantidad y calidad suficiente para secuenciado masivo.



**Figura 3.11.** Curva de crecimiento *P. atropurpurascens* en AMP (12.5 g/L extracto de malta, 30 g/L peptona pH=5.6) a 28°C y 150 rpm correspondiente a cuatro réplicas.

Las secuencias de interés se buscaron en los ensamblados (genoma y transcriptomas) mediante BLAST por homología con secuencias de otros organismos, disponibles en las bases de datos de la plataforma del *Joint Genome Institute* (JGI, <https://jgi.doe.gov>). En el caso de las manganeso-peroxidasas, se usaron como “sondas” las secuencias de *P. atropurpurascens* previamente clonadas en el laboratorio.

Para cada gen o familia de genes, se alinearon todas las secuencias genómicas por un lado y transcriptos por otro, eliminando los redundantes y los incompletos (Blast NCBI y Clustal, <https://npsa-prabi.ibcp.fr>). Una vez depurados, se alinearon las secuencias de cada gen con su transcripto, se corrigió manualmente en base a los motivos pie de intrón tanto el alineamiento como las secuencias proteicas deducidas automáticamente (Expasy, <https://web.expasy.org/translate/>).

### 3.3.1 Secuencias LiP

Se descargaron y usaron como sondas todas las secuencias LiP (genes, transcriptos y proteínas) de *P. chrysosporium*<sup>102</sup>, anotadas con la palabra clave LiP; en el genoma anotado de *P. strigosozonata* no se encontró este tipo de secuencias.

Los resultados mostraron que *P. atropurpurascens* no tendría secuencias *lip* en su genoma. Los *hits* encontrados tienen baja homología global y porcentajes de cobertura

menores al 50% concentrando la homología en fragmentos aislados. Esto concuerda con los resultados de la actividad enzimática (Sección 3.2), donde no se detectó actividad LiP en ninguna de las condiciones ensayadas.

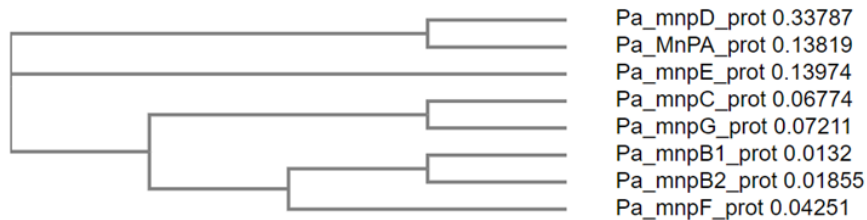
### **3.3.2 Secuencias MnP**

Previamente, nuestro equipo de trabajo obtuvo siete secuencias *mnp* mediante PCR con cebadores degenerados (región central) y RACE-PCR (extensión de regiones 5' y 3'), que fueron clonadas y secuenciadas: cuatro genes con secuencia completa y tres secuencias parciales.

En este trabajo, se utilizaron esas secuencias como base de la búsqueda por homología. Se confirmaron los cuatro genes previamente clonados (*mnpB1*, *B2*, *D* y *E*), lo cual es indicativo de la calidad de los ensamblados. Se completaron las secuencias de *mnpA*, *mnpC* y *mnpF*. En este último caso, se obtuvo el transcrito completo, sin embargo, la secuencia genómica fue parcial. Finalmente, se encontró un octavo gen con 100% de identidad con un clon (clon 22) obtenido en trabajos previos que por su tamaño y no se podía confirmar que fuera un gen *mnp* diferente. En este trabajo este gen fue designado como *mnpG*.

MnPB1 y B2 son proteínas prácticamente idénticas (96.83 % residuos idénticos, 2.64 % residuos similares y 0.53 % residuos diferentes) (Tabla 3.3). Las diferencias a nivel de secuencia genómica se acumulan en los intrones y UTRs (*UnTranslated Region*), lo que confirma que se trata de genes diferentes.

Las proteínas deducidas cuentan con los motivos típicos de las enzimas MnP, tres residuos ácidos equivalentes a Glu35 y Glu39 y Asp175 de MnP1 de *P. chrysosporium* (Secuencias completas en Anexo 7.2.1) <sup>11</sup>. En cuanto a la similitud de la estructura primaria, MnpE se separa del resto por tener menor homología, siendo con MnPF el porcentaje de identidad más alto (78,22%) (Figura 3.12)



**Figura 3.12:** Árbol de similitud de las secuencias proteicas de manganeso-peroxidadas obtenido en el programa ClustalW a partir del alineamiento de las secuencias.

Por su tamaño podrían categorizarse dentro del grupo de Manganeso peroxidadas del tipo extra largo, excepto MnPD que se clasificaría como MnP larga <sup>31</sup>.

**Tabla 3.3:** Tamaño teórico de MnP de *P. atropurpurascens*.

	Cantidad total de residuos de proteína deducida	Clasificación MnP según tamaño
MnPA	380	Extra larga
MnPB1	378	Extra larga
MnPB2	378	Extra larga
MnPC	379	Extra larga
MnPD	359	Larga
MnPE	394	Extra larga
MnPF	381	Extra larga
MnPG	381	Extra larga

Las MnP largas son aquellas que tienen entre 348-361 aminoácidos, mientras que las MnP extra largas tienen más de 362 aminoácidos y se caracterizan por tener un C-terminal más largo <sup>31</sup>. No existen muchas diferencias bioquímicas entre MnP largas y extralargas, excepto que las últimas tienen una termoestabilidad más alta que las primeras <sup>11,103</sup>. A pesar de que el principal mecanismo de acción de las MnP, sea la oxidación de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ , las MnP cortas (menos de 348 AA) pueden tener también actividad Mn-independiente <sup>103</sup>. Las MnP largas y extra largas no tendrían esta capacidad, ya que la presencia de la cola en el C-terminal bloquearía el canal de ingreso al grupo hemo, impidiendo la oxidación directa de pequeñas moléculas con bajo potencial redox (como por ejemplo ABTS, 0,472 V) <sup>31</sup>.

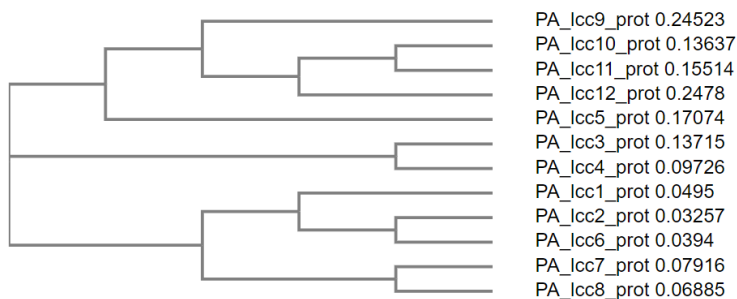
### 3.3.3 Secuencias Lcc

Para la obtención de las secuencias *lcc*, se empleó como secuencias “sonda” para BLAST todas las secuencias transcriptómicas, genómicas y proteómicas de *P. strigosozonata*<sup>11</sup>.

Se obtuvieron 12 secuencias completas (Secuencias completas en Anexo 7.2.3). En el caso del gen *lcc5*, se obtuvo la secuencia transcriptómica completa y la del genoma fue parcial. El tamaño de las proteínas deducidas ronda entre los 518- 551 aminoácidos a excepción de Lcc12 que tiene un tamaño considerablemente menor de 318 aminoácidos (Tabla 3.4 y Figura 3.13).

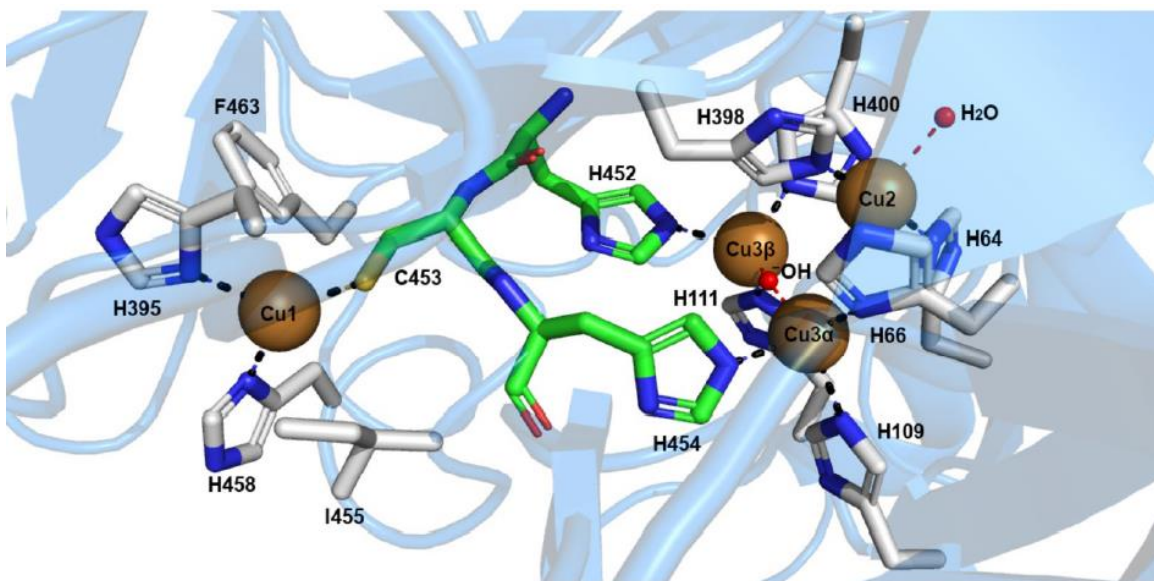
**Tabla 3.4:** Tamaño teórico de Lcc de *P. atropurpurascens*.

	Cantidad total de residuos de proteína deducida	Clasificación Lcc según potencial redox T1 teórico
Lcc1	529	Alto
Lcc2	528	Alto
Lcc3	551	Alto
Lcc4	537	Alto
Lcc5	524	Alto
Lcc6	534	Alto
Lcc7	527	Alto
Lcc8	528	Alto
Lcc9	530	Medio
Lcc10	533	Alto
Lcc11	518	Alto
Lcc12	311	SLAC



**Figura 3.13:** Árbol de similitud de las secuencias proteicas de lacasas obtenido en el programa ClustalW a partir del alineamiento de las secuencias.

Lcc1-3 y Lcc5-8, se catalogan dentro de las llamadas lacasas de alto potencial redox, ya que en su secuencia contienen el motivo HCHIDWHLEAGF (Figura A.8) <sup>104,105</sup>. La secuencia HCH corresponde a dos histidinas que coordinan el *cluster* T2/T3 y la cisteína a uno de los ligandos de cobre en T1 <sup>106</sup>. El último residuo de la secuencia corresponde a una fenilalanina que actúa de ligando axial al sitio T1 (Figura 3.14).



**Figura 3.14:** Representación de aminoácidos del sitio activo de Lcc de *Trametes versicolor* que coordinan los átomos de cobre en T1, T2 y T3<sup>107</sup>. Se aprecia una cisteína coordinante al sitio T1 (C453) entre dos histidinas (H424 y H454) que coordinan el *cluster* T2/T3. Se aprecia una fenilalanina no-coordinante en posición axial a T1 (F463). En esta posición también se puede encontrar una leucina o una metionina incidiendo sobre el potencial redox de la lacasa <sup>107,108</sup>. Imagen extraída de <sup>107</sup>.

Este tipo de secuencias ha sido encontrado en lacasas que tienen potencial redox superior a +0,71 V. Lcc4, 10 y 11 presentan los motivos (HCHIDWHLQAGF, HCHIDDHLNRGF y HCHIDPHLNAGF respectivamente) que, si bien no están perfectamente conservados, contienen las secuencias HCH y la fenilalanina en la posición del ligando axial, por lo que según Mot et al. también podrían ser lacasas de alto potencial redox <sup>105</sup>. Por otra parte la Lcc9, tiene una leucina no-coordinante en la posición del ligando axial (HCHIDWHFNAGL), lo que la clasificaría dentro de las lacasas de potencial medio (460 - 710 mV)<sup>105</sup>. Cabe aclarar que la presencia de una secuencia conservada no es suficiente

para establecer con certeza el potencial redox de las enzimas. Para ello, se deberían de realizar ensayos fisicoquímicos debido que el resto de la estructura proteica podría tener influencia sobre la capacidad oxidativa, especialmente el entorno a T1 <sup>104,108</sup>.

El peso molecular (MW) teórico de Lcc12 (Compute pI/Mw tool, Expasy, [https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) es de 34,3 kDa, lo cual la sitúa dentro de las enzimas lacasas pequeñas (SLAC) que tienen un rango de peso molecular entre 30-40 kDa <sup>105,108</sup>. Recordemos que las lacasas son glicoproteínas, por lo que este cálculo correspondería únicamente al peso molecular teórico del esqueleto proteico <sup>108</sup>. Al parecer, este tipo de enzimas tienen la capacidad de oxidar un amplio espectro de compuestos y son altamente estables frente a condiciones desnaturalizantes, pero estructuralmente se asimilan a las lacasas bacterianas que suelen tener potencial redox más bajo <sup>106-108</sup>. Las enzimas SLAC, tienen dos dominios (al contrario de las lacasa fúngicas más comunes que tienen tres dominios) donde el sitio T1 puede existir tanto en el dominio 1 como en el 2, pero la formación del *cluster* trinuclear requiere de la oligomerización en forma de homotrímero. Sólo en esta conformación se forma el sitio catalítico <sup>107</sup>.

### 3.4 Estudio de la expresión transcripcional de genes *mnp* y *lcc*

Uno de los objetivos de esta tesis es relacionar la actividad MnP y Lcc observada cuando *P. atropurpurascens* crece en presencia de colorantes/madera con los genes expresados en las mismas condiciones como forma de identificar cuál/es enzimas aportan a dicha actividad. En esta sección, se estudió la expresión de los genes *mnp* y *lcc* mediante cuantificación relativa por RT-qPCR. La cuantificación relativa permite medir cambios de la expresión de genes de interés en una condición problema en relación a su expresión en una condición control y normalizada mediante genes de expresión estable (genes de referencia) <sup>109</sup>.

### 3.4.1 Validación de genes de referencia

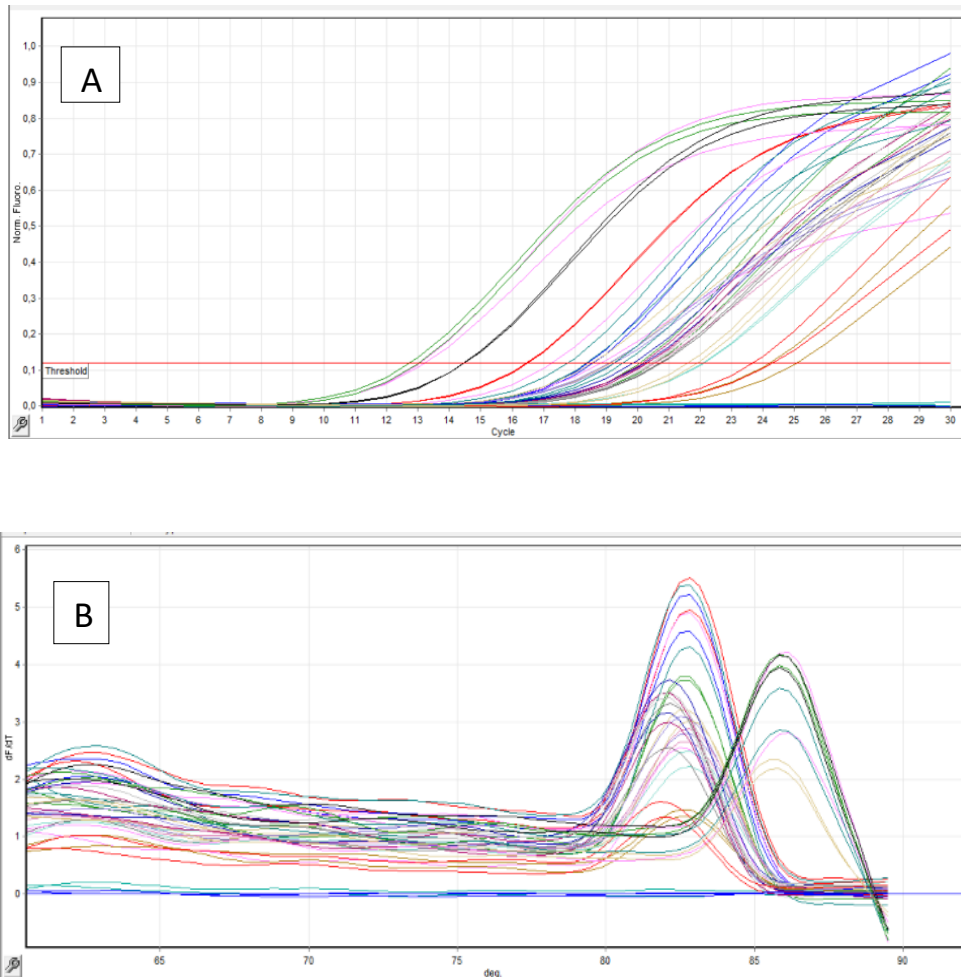
La elección de los genes a utilizar como control interno es un punto crucial de la metodología de cuantificación relativa de la expresión génica, requiriéndose entre dos y tres genes que se expresen constitutivamente en todas las condiciones en estudio. La estrategia por lo tanto fue seleccionar un conjunto de genes (no vinculados al metabolismo lignolítico) cuyos transcritos estén presentes tanto en transcriptomas inducidos como no inducido y evaluar su expresión por qPCR en las diferentes condiciones de interés.

Con el fin de encontrar genes que se expresen de manera estable en diferentes condiciones de cultivo y en distintas etapas del crecimiento fúngico, se estudió la expresión de los ocho candidatos en cinco condiciones de crecimiento.

Los genes candidatos se seleccionaron en base a bibliografía <sup>77</sup> y a la experiencia del grupo: (1) *housekeeping* como el gen *actin1* (actina), *cyt-c* (citocromo c) y *gdpc* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa); (2) de expresión estable verificado por varios análisis de RNA-seq y qPCR como el gen *lip* (lipasa), *phos* (metiltioadenosina fosforilasa), *cyc* (proteína de unión) y *pep* (peptidasa) <sup>110</sup>; y (3) el gen *sarl* (proteína de unión a GTP) descrito como buen gen de referencia en *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei* <sup>77</sup>. El proceso de identificación de las secuencias de *P. atropurpurascens* de estos genes, sus secuencias codificantes y de las proteínas correspondientes fue el mismo empleado para *mnp* y *lcc*. En este caso, se descargaron las secuencias de los diferentes genes reportadas en bibliografía, es decir de los organismos *P. ostreatus* o *P. chrysosporium*, las que se usaron para identificar sus homólogas en *P. strigosozonata* <sup>11</sup>, las que a su vez se utilizaron para buscar las correspondientes a *P. atropurpurascens* en el genoma y transcriptomas ensamblados (Secuencias completas en Anexo 7.2.3).

Se evaluaron las expresiones de los genes *phos*, *pep*, *sarl*, *gdpc*, *act*, *cyc*, *cyt* y *lip* cultivos de *P. atropurpurascens* en 0,5% EM (i) incubado por 3 días, (ii) incubado por 20 días (iii)

suplementado con RBBR e incubado 3 días, (iv) suplementado con rojo carmín e incubado por 7 días e (v) incubado por 3 meses con *chips* de madera. Las amplificaciones se hicieron con cebadores específicos diseñados para cada gen (Tabla 2.2, Sección 2.2.2.3).



**Figura 3.15:** qPCR con cebadores específicos de los genes *gdpc*, *sarl*, *phos* y *pep*. A-Curvas de amplificación y B- curvas de *melting*. ADNc sintetizados a partir de cultivos de *P. atropurpurascens* incubados entre 3 y 7 días en 0,5%EM, 0,5%EM con RBBR, 0,5%EM con Rojo carmín y 0,5%EM con *chips* de maderas (3 meses). Se obtuvo amplificación en todos los ensayos; la Figura 3.15 muestra como ejemplo las curvas para los genes *gdpc*, *sarl*, *phos* y *pep* en cinco condiciones. No se observaron amplificaciones inespecíficas o formación de dímeros de cebadores. Las temperaturas, experimental y teórica, de los amplicones siguen el mismo patrón, con aproximadamente 2°C de diferencia, indicando la especificidad de los cebadores (Figura 3.15.B y Tabla 3.5).

Cabe destacar que las muestras de madera tuvieron una muy baja amplificación en los dos duplicados biológicos por lo que se descartó esta muestra. Existe bibliografía que indica que los subproductos de la biotransformación de lignocelulosa como fenoles, aldehídos de furano, ácidos orgánicos, etc. son fuertes inhibidores enzimáticos<sup>111,112</sup>. Estos inhibidores podrían tener repercusión sobre la retro-transcriptasa utilizada resultando en bajos rendimientos de ADNc, como sobre la polimerasa utilizada en los ciclos de qPCR. Estos inhibidores podrían eliminarse con *kits* comerciales específicos.

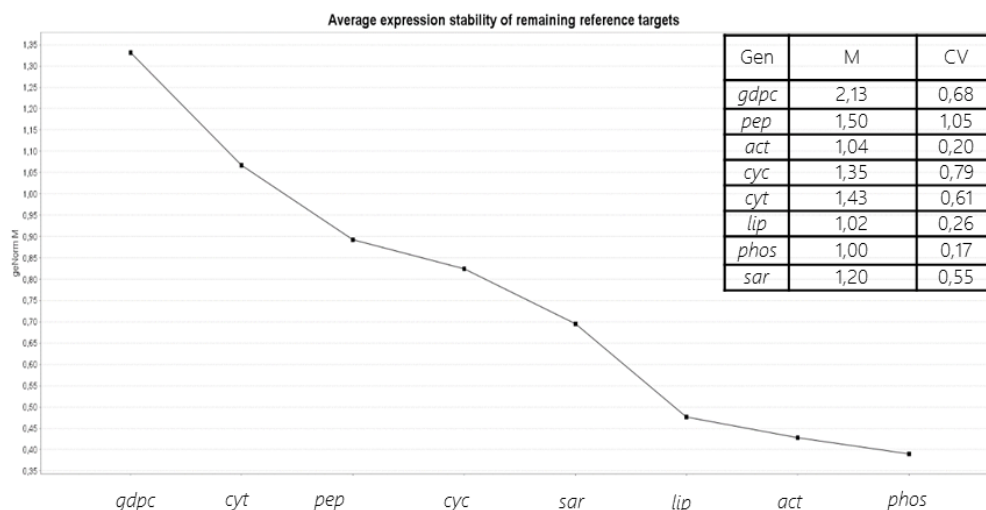
**Tabla 3.5:** Temperatura de *melting* de los amplicones de los genes de referencia candidatos

Gen	Nombre	Secuencia 5'->3'	Tm amplicón (°C) (práctica)	Tm amplicón (°C) (teórica)
<i>act</i>	PaACN_F1q	TGGTATCCACGAGACGACCT	82,7	84,0
	PaACN_R1q	GTACCACCGGACAGGACAAC		
<i>cyc</i>	PaCYC1_F1	ACCCACCTGTCCGTCAAAC	84,0	86,0
	PaCYC1_R11q	AGCACTAGTCGGCGGAGAT		
<i>cyt</i>	PaCYT_F1q	CCCAACCTTCATGGTGTCTT	83,6	85,5
	PaCYT_R1q	AGGTAATGCCCTTGTTGACG		
<i>gdpc</i>	PaGDP_R1q	AGGCCATACCAGTGAGCTTG	86,0	88,0
	PaGDP_F3q	GTCAACGGCAACATCATCC		
<i>lip</i>	PaLIP_F3	TCGCTCATGCGTATATCAGG	80,3	82,0
	PaLIP_R3	ATCTGCTTGAACACCCGAAG		
<i>pep</i>	PaPEP_F1q	GCAAAGCAAACATCCTCTCC	82,0	84,0
	PaPEP_R2q	TTGATGGCTTGTCCGTAGAC		
<i>phos</i>	PaPHOS_F2q	TTTACAGGAACTGGGGATGC	82,7	84,5
	PaPHOS_R2q	TGGCAATCAGAGCGTATGAC		
<i>sarl</i>	PaSAR_F5q	GCCATCAACAGGCTCGTC	82,8	84,5
	PaSAR_R5q	AAACGCTCGAAGTCTGCACT		

La estabilidad de la expresión de cada gen se evaluó mediante los algoritmos NormFinder<sup>82</sup> (Tabla 3.6) y geNorm<sup>81</sup> (Figura 3.16).

El algoritmo geNorm calcula la estabilidad para cada gen en base a la variación de su expresión con relación a los otros genes ensayados. Compara la expresión de cada uno por pares con todos los genes en estudio en todas en las condiciones ensayadas. A partir

de estos valores se calcula la desviación estándar de las relaciones de expresión transformados logarítmicamente. El valor de estabilidad M es la variación media por pares de un gen en relación a los demás genes de control, por lo tanto a menor valor M más estable es la expresión del gen <sup>81</sup>.



**Figura 3.16:** Análisis de la estabilidad de los genes de referencia evaluados por el algoritmo geNorm. La tabla muestra los resultados de Valor de estabilidad (M) y el Coeficiente de variación (CV) para los genes de referencia *act*, *cyc*, *cyt*, *lip*, *sar*, *phos*, *pep* y *gdpc*. El gráfico muestra los valores medios de estabilidad M de los genes remanentes (geNorm M) calculados como el promedio del valor M cuando se elimina del cálculo el valor M del gen indicado.

El algoritmo NormFinder por otro lado, basa su estrategia de cálculo de estabilidad en un modelo matemático que permite estimar la variación global y entre subgrupos de cada muestra <sup>82</sup>.

**Tabla 3.6:** Análisis de la expresión génica por NormFinder.

Gen	Valor de estabilidad	Error estándar	Mejor gen
<i>act</i>	0,096	0,252	<i>act</i>
<i>cyc</i>	0,755	0,226	
<i>cyt</i>	0,703	0,215	
<i>lip</i>	0,174	0,171	
<i>sar</i>	0,579	0,189	
<i>phos</i>	0,096	0,252	
<i>pep</i>	0,894	0,258	
<i>gdpc</i>	1,330	0,365	

Los genes de expresión más estables según ambos algoritmos fueron *act* y *phos*, por lo que se seleccionaron como genes de referencia para los ensayos de expresión relativa de genes *mnp* y *lcc*.

#### 3.4.2 Diseño y verificación de cebadores para genes *mnp* y *lcc*

Se diseñó un par de cebadores específicos para cada gen *mnp* y *lcc*, con la excepción de *mnpB1* y *B2* que no pueden diferenciarse a nivel de secuencia codificante (Ver Anexo 7.3.4) y *mnpF*, por su alta homología con *mnpB1* y *mnpB2*. Por lo tanto, la expresión de estos tres genes se analizó en conjunto a partir de un único par de cebadores. Para el diseño se utilizaron los programas Primer3plus y Allele ID y los parámetros termodinámicos y estructurales se verificaron tanto en Primer3plus como en VectorNTI. Se buscaron cebadores con temperaturas de *melting* entre 59,5-60,5°C, que no formaran horquillas ni homo- o hetero-dímeros, que en lo posible se situaran en la unión exón-exón y que el tamaño del amplicón se ubicara entre los 80-110 pb.

Se verificaron todos los cebadores y las condiciones de amplificación usando una única muestra. En todos los casos se obtuvo un único amplicón verificado por la formación de un solo pico en la curva de *melting* cuyo máximo (temperatura de *melting* experimental) dista 2°C de la teórica (Tabla 3.7).

**Tabla 3.7:** Temperatura de *melting* (Tm) de los productos de PCR para los diferentes genes *lcc* y *mnp*.

Gen	Tm amplificación °C (práctica)	Tm amplificación °C (teórica)	Gen	Tm amplificación °C (práctica)	Tm amplificación °C (teórica)
<i>mnpA</i>	85	87	<i>lcc1</i>	83	85
<i>mnpB1,2YF</i>	88,2	90,5	<i>lcc2</i>	85,5	87
<i>mnpC</i>	88	90,5	<i>lcc3</i>	85	87,5
<i>mnpD</i>	79,5	80,5	<i>lcc4</i>	83,5	85
<i>mnpE</i>	87,6	85	<i>lcc5</i>	85,6	88
<i>mnpG</i>	84,2	86	<i>lcc6</i>	82	83
			<i>lcc7</i>	83,5	86
			<i>lcc8</i>	86	88
			<i>lcc9</i>	80,7	83
			<i>lcc10</i>	82	83,5
			<i>lcc11</i>	82	84,5
			<i>lcc12</i>	82,5	84,5

### 3.4.3 Expresión relativa por RT-qPCR

Las condiciones de cultivo para esta etapa fueron seleccionadas en base a los resultados del cribado de capacidad decolorante y de crecimiento. Los días de incubación del micelio fueron elegidas en base a los resultados de mayor actividad enzimática, obtenidos de la curva de seguimiento enzimático:

- día 7 de incubación con Fluoresceína
- día 10 de incubación con Dibromo fluoresceína (Vdec y Vcre reducidas)
- día 20 de incubación con los colorantes TFM Verde Malaquita (Vdec y Vcre reducida) y Diamante fucsina

Como condición control se utilizaron los cultivos correspondientes al día 3 de cultivo sin colorante (definido para este trabajo como nivel basal) y *phos* y *act* como genes de referencia verificados previamente. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y con dos réplicas técnicas. Los resultados se analizaron mediante el programa REST 2009, utilizando los datos Cp obtenidos por qPCR en un *threshold* fijo para todas las condiciones y estimando la eficiencia de amplificación a 1.

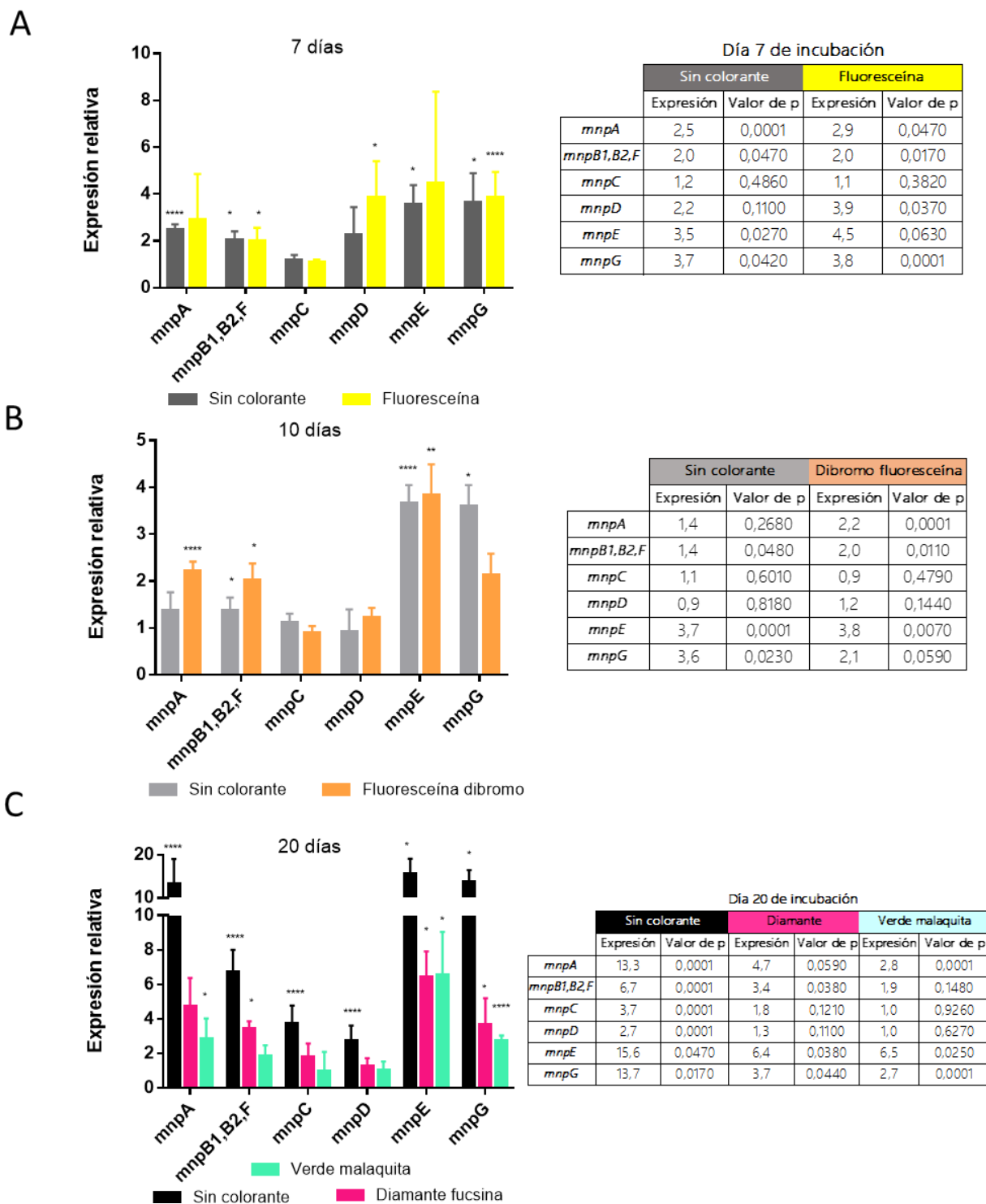
### 3.4.3.1 Estudio de la expresión de genes *mnp*

Se estudió la expresión de los genes *mnpA*, *mnpC*, *mnpD*, *mnpE* y *mnpG* por separado y de *mnpB1*, *mnpB2* y *mnpF* (*mnpB12F*) de forma conjunta (Figura 3.17). Dado que los máximos de actividad, muestras en las que se estudió la expresión, se dan a distintos tiempos de incubación, se analizó tanto la acumulación de ARNm en presencia como en ausencia de colorante respecto a la del día 3 de incubación sin colorante (Figura 3.17). Se tomó la expresión en este día como la expresión "basal". Para mejor visualización de que tan significativo es el efecto de la presencia de colorante, se calculó la expresión relativa al cultivo sin colorante al mismo día de la medida (Figura 3.18, Tabla 3.8).

La expresión de los diferentes genes *mnp* tiene comportamientos distintos frente a las condiciones de crecimiento (disminución de nutrientes, acumulación de productos metabólicos de desecho, etc.).

En las muestras sin colorante, puede observarse que al día 20 todos los genes *mnp* se encuentran "sobreeexpresados" con diferentes niveles de acumulación de ARNm. *mnpA*, *mnpE* y *mnpG* presentan los mayores valores, 13,3, 15,6 y 13,7 respectivamente. Les sigue *mnpB12F* con 6,7, *mnpC* con 3,7 y *mnpD* con 2,7.

Al día 10, siempre en las muestras sin colorantes, la acumulación de mensajeros *mnpC* y *mnpD* se mantiene al mismo nivel que el día 3. *mnpA* y *mnpB1,2,F* tienen apenas un aumento de 1,4 mientras que para *mnpE* y *mnpG*, la expresión relativa aumenta en un factor medio de 3,7 y 3,6 respecto al día 3 de incubación. Por otro lado, al día 7 los niveles de expresión de *mnpA*, de *mnpB1,2,F*, *mnpC* aumentaron 2, 2,5, 1,2 veces.



**Figura 3.17:** Expresión relativa de genes *mnp* referida a 0,5%EM incubado 3 días (condición control). A- Incubado por 7 días con Fluoresceína o sin colorante, B- Incubado por 10 días con Dibromo fluoresceína o sin colorante e C- Incubado por 20 días con Verde Malaquita, Diamante fucsina o sin colorante. El alto de la gráfica de barra representa la mediana de la expresión génica. Las líneas trunco representan las observaciones mínimas y máximas. Los asteriscos representan el valor de p:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,0005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). A la derecha de las gráficas se muestran tablas con los valores calculados en REST

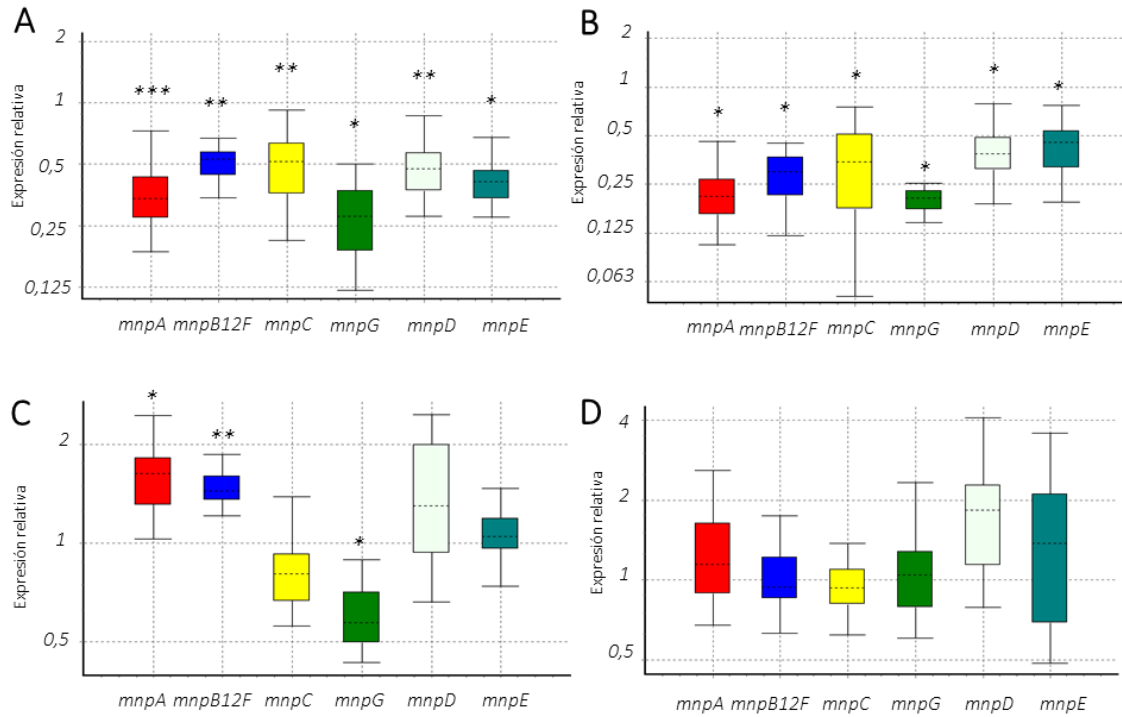
Al igual que a los días 10 y 20, en las muestras del día 7 también se observa un aumento en los niveles de expresión en los genes *mntE* (3,5) y *mntG* (3,7). Los ARNm *mntE* y *mntG* parecerían aumentar de forma coordinada, ya que presentan valores similares sobre todo los días 7 y 10. Es de resaltar, además que estos dos genes mostraron los mayores niveles de acumulación de mensajeros, especialmente al día 20. Estos resultados indicarían que estos genes son los más dinámicos en su respuesta frente al estrés nutricional. En el otro extremo estarían *mntB12F*, *mntC* y *mntD* con baja respuesta a las condiciones nutricionales del ensayo. Finalmente, el ARNm *mntA*, tiene una respuesta leve hasta estadios más tardíos, cuando el déficit nutricional es más marcado.

Respecto a las variaciones cuando el medio contiene colorantes, se puede observar que en presencia de Verde Malaquita y de Diamante fucsina (día 20), el nivel de ARNm de todos los genes disminuyó respecto a los niveles observados en las muestras del mismo día sin colorante (Figura 3.17.C, Figura 3.18.A y B, Tabla 3.8). Esa disminución es más acentuada en los cultivos con Verde malaquita, excepto en el caso de *mntE*. En particular *mntC* y *mntD* disminuyen a la mitad de la máxima acumulación observada (sin colorante) en presencia de Diamante fucsina y 3,7 y 2,6 veces presencia de Verde malaquita, respectivamente. *mntA* y *mntG* disminuyen a un tercio de su máxima acumulación (sin colorante) en Diamante fucsina y casi a un quinto en Verde malaquita.

La presencia de Fluoresceína (día 7) no provoca cambios significativos en la expresión relativa de genes *mnt* (Figura 3.17.A, Figura 3.18.D y Tabla 3.8) respecto al mismo día sin colorante. Esto es, al igual que en ausencia de colorante, los niveles de ARNm aumentan aproximadamente entre 2 y 4 veces en relación a la condición control (día 3 sin colorante) con excepción de *mntC* que se mantiene a nivel basal.

Con el agregado de Dibromo fluoresceína (día 10), los niveles de ARNm *mntA* y *mntB1,2,F* aumentaron en un factor de ~1,5 respecto a la muestra del mismo día sin colorante mientras que *mntG* disminuyó casi a la mitad. *mntC*, *mntD* y *mntE* se

mantuvieron incambiados, los dos primeros a nivel basal y el último corresponde al de mayor acumulación en estas muestras (Figura 3.17. B, Figura 3.18.C y Tabla 3.8).



**Figura 3.18:** Expresión relativa de los genes *mnp* de *P. atropurpurascens* en presencia de colorantes *versus* ausencia de colorante. A-Diamante fucsina día 20, B- Verde malaquita día 20, C-Dibromo fluoresceína día 10 y D- Fluoresceína día 7. Condiciones control: 0,5% EM sin colorante al mismo día 20, 10 y respectivamente. Los recuadros representan el rango intercuartil o el 50% medio de las observaciones. La línea de puntos representa la mediana de la expresión génica. Las líneas truncas representan las observaciones mínimas y máximas. Los asteriscos representan el valor de p:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,0005$  (\*\*\*)

**Tabla 3.8:** Expresión relativa de genes *mnp* en presencia de colorantes.

	Día 20 de incubación				10 días de incubación		7 días incubación	
	Diamante		Verde malaquita		Dibromo fluoresceína		Fluoresceína	
	Expresión	Valor de p	Expresión	Valor de p	Expresión	Valor de p	Expresión	Valor de p
<i>mnpA</i>	0,35	0,0001	0,21	0,0170	1,62	0,0200	1,18	0,5790
<i>mnpB1,B2,F</i>	0,51	0,0030	0,28	0,0100	1,48	0,0020	0,99	0,9890
<i>mnpC</i>	0,48	0,0020	0,27	0,0190	0,81	0,2040	0,93	0,6550
<i>mnpD</i>	0,47	0,0040	0,38	0,0220	1,34	0,3120	1,73	0,1290
<i>mnpE</i>	0,41	0,0220	0,42	0,0300	1,05	0,7210	1,26	0,5000
<i>mnpG</i>	0,27	0,0130	0,20	0,0240	0,59	0,0070	1,05	0,7640

En términos generales los resultados reportados en la Figura 3.17 y 3.18 indican que la expresión de estos genes está sujeta a diferentes factores ambientales entre los que se encuentran los colorantes ensayados, cada gen con diferentes respuestas a los diferentes factores, y que estos mecanismos parecen competir entre ellos como se observa en condiciones más estresantes (día 20).

Finalmente, se consideraron dos aspectos como indicativos de la contribución de cada enzima a la actividad Manganeso-peroxidasa observada en cada condición de cultivo. Por un lado, la presencia y abundancia de ARNm y por otro la variación de los niveles de mensajeros en presencia y ausencia de colorante. Esto no permite determinar cuál/es enzimas actúan sobre cada colorante, pero podría contribuir a reducir la cantidad de candidatos para estudios posteriores.

En la Tabla 3.9 se resumen los resultados de la actividad normalizada (sección 3.2) correspondiente únicamente a los colorantes seleccionados en esta sección. La actividad MnP es más alta en las muestras con colorante en los días 7 y 20, y en las muestras sin colorante en el día 10.

**Tabla 3.9:** Actividad enzimática MnP (AE, UE/mL) del sobrenadante de cultivo con y sin colorantes, normalizada por la masa del micelio (g). SD: desviación estándar.

día 7			día 10			día 20		
Muestra	AE normalizada (UE*g/mL)	SD	Muestra	AE normalizada (UE*g/mL)	SD	Muestra	AE normalizada (UE*g/mL)	SD
0,5%EM	0,211	0,066	0,5%EM	0,175	0,001	0,5%EM	0,147	0,008
Fluoresceína	1,117	0,001	Dibromo fluoresceína	0,079	0,001	Verde malaquita	0,482	0,093
						Diamante fucsina	0,232	0,001

Los niveles de ARNm al día 7 no acompañan el aumento de la actividad observada en presencia de Fluoresceína respecto a las muestras sin colorante. Quizás la dispersión de los datos correspondientes a los mensajeros de *mnpA*, *mnpE* y *mnpD* enmascare alguna diferencia que permita relacionar los datos.

Con Dibromo fluoresceína (Figura 3.17.B) destaca *mnpE* como el transcrito más abundante, seguido *mnpA*, *mnpG* y el grupo *mnpB12F*; siendo el ARNm *mnpG* el único que acompaña la disminución (reduce la expresión en 1,7 veces respecto al control,  $p < 0,007$ ) de la actividad enzimática en presencia ( $0,079 \pm 0,001$  UE\*g/mL) respecto a ausencia ( $0,175 \pm 0,001$  UE\*g/mL) de colorante. Por su parte, los mensajeros *mnpA* y *mnpB12F* van en sentido contrario aumentando en presencia del colorante. Cabe recordar, que se desconoce cuánto aporta cada gen del grupo *mnpB12F*, por lo que solo se puede analizar el comportamiento global del grupo.

En presencia de Diamante fucsina y Verde malaquita, los mayores niveles corresponden al ARNm *mnpE* (con valores similares) seguido de *mnpA* y *mnpG* (con valores mayores en Diamante fucsina que en Verde malaquita). Con excepción de *mnpE* y *mnpD*, los valores de ARNm acumulado son ligeramente mayores en Diamante fucsina. En relación a la actividad enzimática global llama la atención el aumento de la misma en presencia de colorantes ( $0,482 \pm 0,093$  UE\*g/mL en Verde Malaquita,  $0,232 \pm 0,001$  UE\*g /mL en Diamante fucsina y  $0,147 \pm 0,008$  UE\*g/mL en el control), cuando la abundancia de los mensajeros está claramente disminuida.

### 3.4.3.2 Estudio de la expresión de genes *lcc*

Se seleccionaron cinco genes *lcc* (*lcc 2, 4, 5, 10 y 11*), uno o dos representantes de cada grupo formado en base a la homología de las secuencias proteicas (Figura 3.13) y debido a que en la prueba de verificación de los cebadores diseñados (Sección 3.4.2) mostraron diferencias en los niveles de expresión: *lcc2* y *lcc4* alta (bajo Cp) y *lcc5, lcc10* y *lcc11* de mediana a baja (Figura 3.19). Para los cinco genes seleccionados se realizó el mismo análisis que para los genes *mnp* en la sección anterior (Figura 3.20 y Figura 3.21).

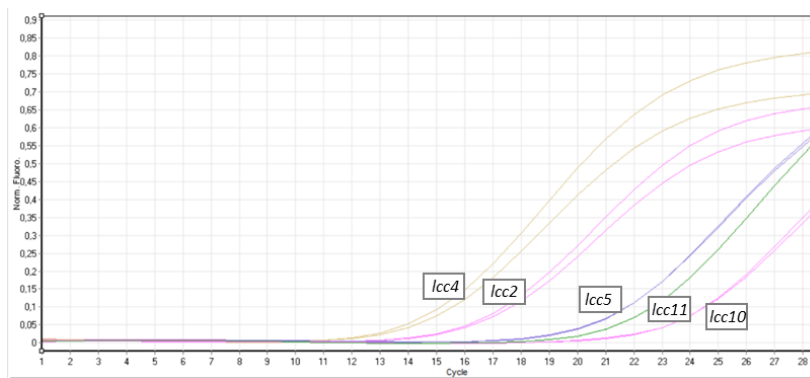


Figura 3.19: Curva de fluorescencia de la amplificación de los genes *lcc4, lcc2, lcc5, lcc11* y *lcc10*. Medio EM incubado durante 3 días.

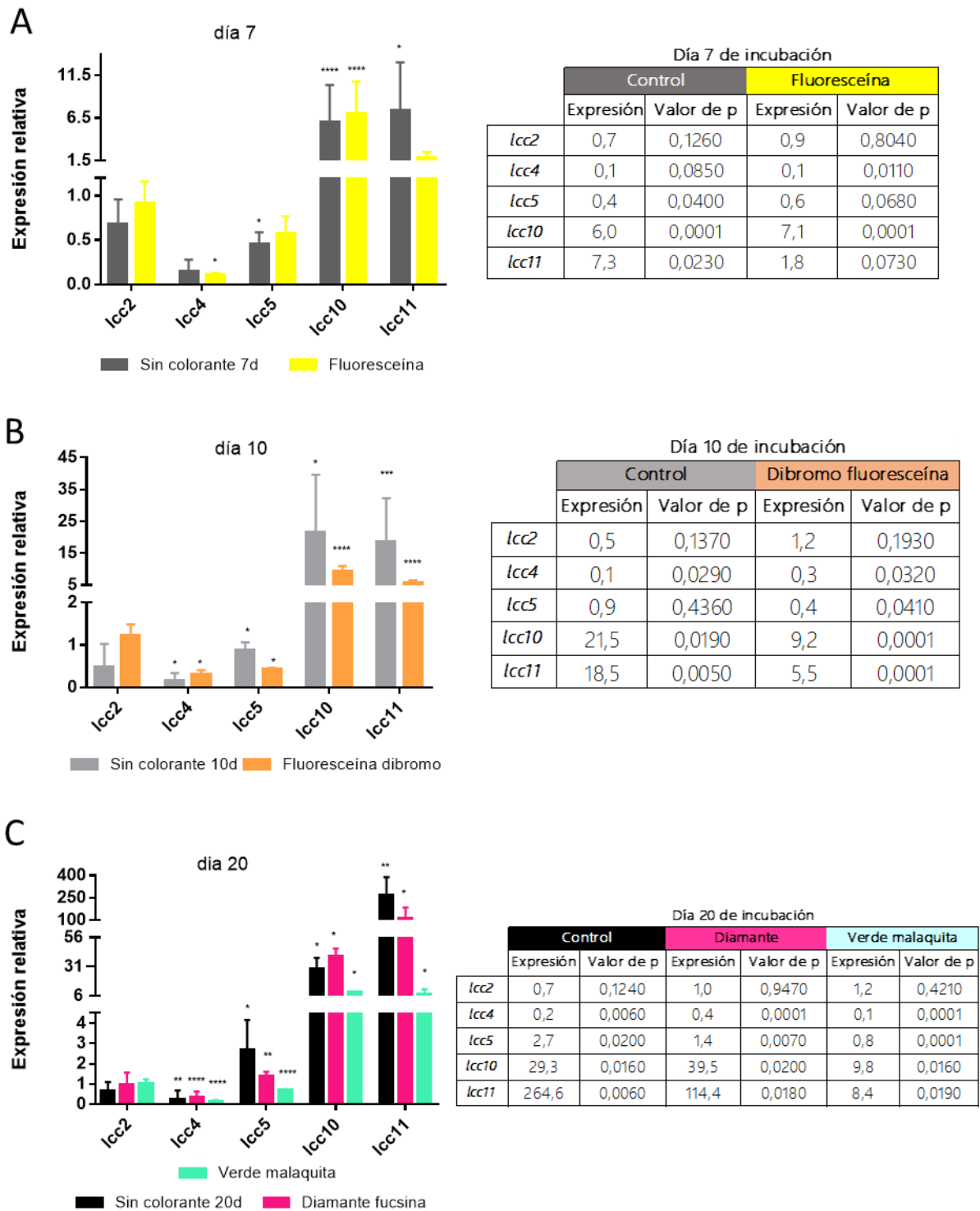
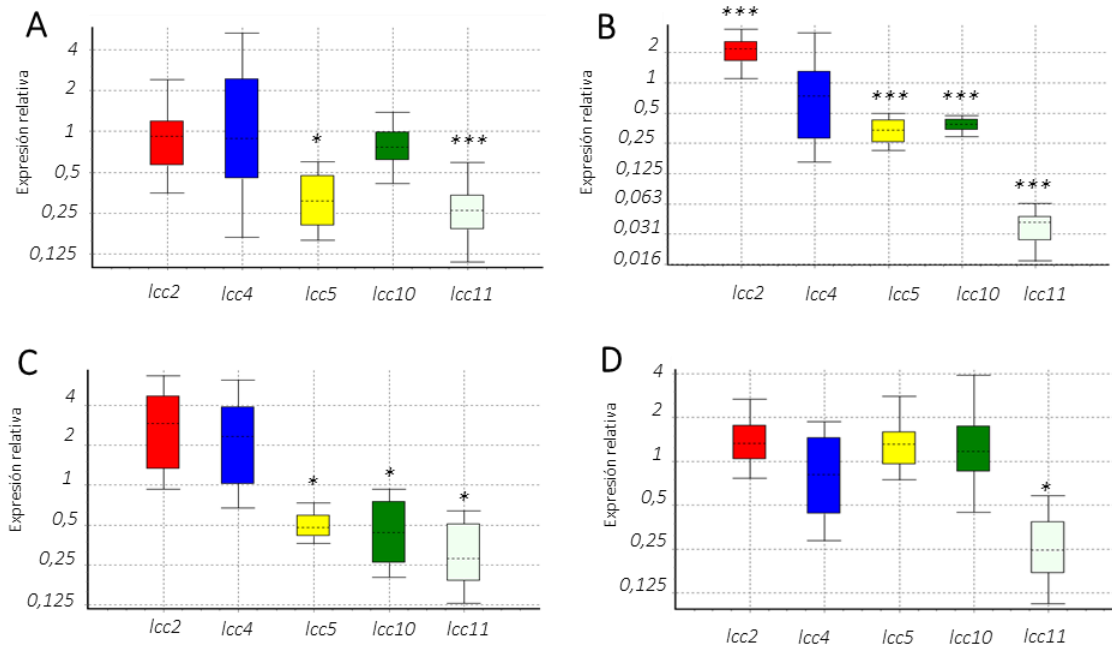


Figura 3.20: Expresión relativa de genes *lcc* referida a 0,5%EM incubado 3 días (condición control). A- Incubado por 7 días con Fluoresceína o sin colorante, B- Incubado por 10 días con Dibromo fluoresceína o sin colorante e C- Incubado por 20 días con Verde Malaquita, Diamante fucsina o sin colorante. El alto de la gráfica de barra representa la mediana de la expresión génica. Las líneas trunco representan las observaciones mínimas y máximas. Los asteriscos representan el valor de p:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,0005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). Las tablas muestran los valores calculados en REST.

Los resultados muestran que estos genes tienen diferencias muy marcadas de expresión en respuesta a las condiciones de crecimiento (ausencia de colorantes) (Figura 3.20). Mientras que los niveles de ARNm *lcc2* se mantienen próximos al nivel basal, los correspondientes a *lcc4* están por lo menos 5 veces por debajo: 0,1 ( $p < 0,029$ ) y 0,2 ( $p < 0,0006$ ) días 10 y 20 respectivamente, en las muestras sin colorante. Los niveles de ARNm *lcc5*, *lcc10* y *lcc11* aumentaron con el tiempo de cultivo, si bien *lcc5* está lejos de tener una expresión tan notable como los dos últimos. De hecho, el nivel ARNm *lcc5* comienza (día 7) por debajo del nivel basal (0,4  $p < 0,0400$ ), aumenta al día 10 (0,9  $p < 0,4360$ ) alcanzando al día 20 un factor medio de 2,7 ( $p < 0,00200$ ). Los mensajeros *lcc10* y *lcc11* aumentan de forma importante con la disminución de nutrientes, alcanzando factores de 29,3 ( $p < 0,0001$ ) y 264,6 ( $p < 0,0001$ ) respectivamente el día 20, siendo el ARNm *lcc11* acumulado al final del cultivo particularmente alto. En los días 7 y 10 ya se observan incrementos significativos de ambos con factores de 6,0 ( $p < 0,0001$ , para *lcc10*) y 7,3 ( $p < 0,023$ , para *lcc11*) en el día 7 y de 21,5 ( $p < 0,0190$ ) y 18,5 ( $p < 0,005$ ) en el día 10 respectivamente. Al parecer, la expresión de estos dos genes, que a nivel de secuencias son muy similares entre sí, se regularía de forma paralela (similar) hasta ciertos niveles de stress nutricional (día 10) diferenciándose en condiciones más extremas ya sea por el déficit de nutrientes o por la acumulación de productos de desecho, cambios de pH, etc (día 20).

La presencia de colorantes también tiene diferentes efectos sobre la expresión de los genes *lcc* (Figura 3.20, Figura 3.21 y Tabla 3.10). Al igual que las demás condiciones, *lcc4* no cambia su perfil de expresión en presencia del colorante. Al parecer, la expresión de este gen no estaría condicionada ni por las condiciones nutricionales ni por la presencia de colorantes. En el otro extremo, los niveles de ARNm *lcc11* disminuyen en las cuatro condiciones, pero de forma más significativa en las muestras de Verde malaquita donde se registra una disminución de la expresión relativa de casi 30 veces.

Por su parte, *lcc5*, se mantiene al mismo nivel en presencia de Fluoresceína, y disminuye 2, 1,25 y 3 veces con la adición de Dibromo fluoresceína, Diamante fucsina y Verde malaquita respectivamente. Los ARNm *lcc10* al día 7 y 20 se mantiene en presencia de Fluoresceína y Diamante Fucsina, pero disminuyen casi 2,5 veces en presencia de Dibromo fluoresceína y Verde malaquita (Tabla 3.10 y Figura 3.21) en relación a los respectivos en los cultivos sin colorante. Estos dos últimos colorantes reducen notablemente la velocidad de crecimiento del hongo. Finalmente, la expresión de *lcc2* se ve aumentada casi dos veces en presencia de Verde malaquita (día 20) y no se observaron cambios significativos en presencia de los otros tres colorantes.



**Figura 3.21:** Expresión relativa de los genes *lcc* de *P. atropurpurascens* en presencia de colorantes *versus* ausencia de colorante. A-Diamante fucsina día 20, B- Verde malaquita día 20, C-Dibromo fluoresceína día 10 y D- Fluoresceína día 7. Condiciones control: 0,5% EM sin colorante al mismo día 20, 10 y respectivamente. Los recuadros representan el rango intercuartil o el 50% medio de las observaciones. La línea de puntos representa la mediana de la expresión génica. Las líneas truncas representan las observaciones mínimas y máximas. Los asteriscos representan el valor de p: p<0,05 (\*), p<0,005 (\*\*), p<0,0005 (\*\*\*).

**Tabla 3.10:** Expresión relativa de genes *lcc* en presencia de colorante *versus* ausencia de colorante

	Día 20 de incubación				10 días de incubación		7 días incubación	
	Diamante		Verde malaquita		Dibromo fluoresceína		Fluoresceína	
	Expresión	Valor de p	Expresión	Valor de p	Expresión	Valor de p	Expresión	Valor de p
<i>lcc 2</i>	0,87	0,7020	2,1	0,0120	2,6	0,08	1,3	0,2320
<i>lcc4</i>	0,93	0,8650	0,6	0,5050	2,1	0,23	0,8	0,5080
<i>lcc5</i>	0,31	0,0280	0,3	0,0001	0,5	0,01	1,3	0,3020
<i>lcc10</i>	0,80	0,2650	0,4	0,0001	0,4	0,01	1,2	0,6370
<i>lcc11</i>	0,26	0,0050	0,0	0,0001	0,3	0,02	0,2	0,0200

Nuevamente, los niveles de ARNm *lcc* analizados no acompañan a los correspondientes valores de la actividad enzimática global (Tabla 3.11).

**Tabla 3.11:** Actividad enzimática Lcc (AE, UE/mL) normalizada por la masa del micelio (g) de las muestras en las que se analizó la expresión relativa de los genes. SD: desviación estándar.

Muestra	día 7		Muestra	día 10		Muestra	día 20	
	AE normalizada (UE*g/mL)	SD		AE normalizada (UE*g/mL)	SD		AE normalizada (UE*g/mL)	SD
0,5%EM	0,196	0,069	0,5%EM	0,233	0,090	0,5%EM	0,094	0,037
Fluoresceína	1,117	0,547	Dibromo fluoresceína	0,158	0,001	Verde malaquita	0,482	0,093
						Diamante fucsina	0,193	0,060

Aumentos tan importantes como los observados en *lcc10* y *lcc11* al día 20, no se reflejan en la actividad, por el contrario, en las muestras sin colorante las actividades enzimáticas son mínimas sobre el final del ensayo ( $0,094 \pm 0,037$  UE\*g/mL), mientras que la actividad máxima se ubicaría al día 10 ( $0,233 \pm 0,09$  UE\*g/mL). Más allá de algún desfasaje debido al tiempo de síntesis y procesamiento de proteínas a partir del *pool* de ARNm disponible, estos resultados podrían reflejar la incidencia de otros mecanismos de regulación o simplemente que la contribución de Lcc10 y Lcc11 a la actividad global no es tan destacable. Cabe recordar, que se identificaron 12 genes *lcc* en *P. atropurpurascens*, de los cuales se seleccionaron 5, por lo que las expresiones de otras isoformas Lcc también pueden estar influyendo las actividades observadas.

El mayor cambio de actividad se obtuvo en presencia de Fluoresceína (día 10), casi 5 veces superior a la del cultivo sin colorante. Sin embargo, la única expresión de transcritos *lcc* que se expresó de forma diferencial fue *lcc11*, y su expresión fue casi cuatro veces más baja que en la correspondiente muestra sin colorante. En el otro extremo, con Dibromo fluoresceína la actividad prácticamente no cambia; sin embargo, hay bajadas significativas en la expresión de *lcc5*, *lcc10* y *lcc11* como ya fue mencionado previamente.

En presencia de Diamante fucsina (día 20) la actividad fue casi dos veces superior a la de las muestras sin colorante y los únicos niveles de mensajeros que cambiaron su expresión de forma significativa fueron los son *lcc5* y *lcc11* en sentido inverso (disminuyen) (Figura 3.21 y Tabla 3.10). Por otra parte, en presencia de Verde malaquita y al mismo día de incubación, si bien la actividad es el doble de la registrada en Diamante fucsina y cuatro veces mayor a la muestra sin colorante (Tabla 3.11), los niveles de ARNm *lcc5* y *11* son incluso aún más bajos, además hay una disminución significativa de un tercer gen (*lcc10*) (Figura 3.21 y Tabla 3.10).

## 4. Discusión

Los hongos degradadores de la madera son los principales organismos responsables del reciclaje de carbono en la tierra <sup>113</sup>. Mediante una batería de enzimas logran descomponer el material lignocelulósico. En especial, los hongos de la podredumbre blanca tienen la capacidad de mineralizar efectivamente la lignina, uno de los materiales orgánicos más recalcitrantes, mientras que los hongos de la podredumbre marrón pueden únicamente modificar esta estructura <sup>14</sup>. Los HPB ganaron esa capacidad hace millones de años, al lograr generar enzimas de alto poder redox, capaces de oxidar de forma inespecífica, estructuras fenólicas y no-fenólicas de la lignina. Estas características enzimáticas, postulan a las proteínas lignolíticas como potenciales agentes biorremediadores a emplearse para degradar una amplia cantidad de sustratos aromáticos como polihidrocarburos aromáticos, pesticidas, herbicidas y colorantes <sup>11</sup>.

*Punctularia atropurpurascens* H2126, es un HPB perteneciente a la división Basidiomycota orden Coriticiales, capaz de crecer y degradar madera de *Eucalyptus*, materia prima de la cuál fue aislada en nuestra región. Este hongo tiene la particularidad de degradar lignina de forma específica, utilizar hemicelulosa preferentemente como fuente de carbono frente a la celulosa y de producir manganeso peroxidasas y lacasas en su metabolismo primario <sup>68,114</sup>.

En un estudio realizado por Bettucci et al. 1998 <sup>114</sup>, *P. atropurpurascens* fue más eficiente en la degradación de lignina en *Eucalyptus globulus* que *P. chrysosporium* luego de 30 días de inoculación, pero este último fue más eficiente en la degradación de lignina de *E. grandis*. *P. chrysosporium* es un basidiomicete, perteneciente al orden de los *Polyporales*, que ha sido altamente estudiado por su capacidad de degradación de la madera. De hecho, fue de este microorganismo que se aisló y caracterizó por primera vez las enzimas LiP y MnP <sup>25,73,115</sup>. Por el contrario, muy poca información se tiene acerca de *P.*

*atropurpurascens* y su capacidad lignolítica. Su genoma no se encuentra depositado en banco de datos y hasta la fecha existe muy poca bibliografía al respecto.

#### 4.1 Cribado de la capacidad decolorante:

##### *P. atropurpurascens* vs *P. chrysosporium*

En este trabajo se estudió la capacidad de degradar una batería de colorantes con diferentes cromóforos y sustituyentes, en comparación con la de *P. chrysosporium* que actuó de control positivo, mientras que *Aspergillus nidulans* se utilizó como control negativo por no pertenecer al grupo de hongos degradadores de madera. El cribado de capacidad decolorante se usa de forma rutinaria para conocer de forma rápida si el microorganismo de trabajo cuenta con enzimas oxidoreductoras <sup>84,85,116</sup>.

Nuestros resultados muestran que *P. atropurpurascens* fue capaz de crecer y degradar los 28 colorantes ofrecidos, mientras que *P. chrysosporium* no logró crecer en 5/24 colorantes ensayados: Verde malaquita (TFM), Verde brillante (TFM), Azul Victoria 4R (TFM), Crisoidina (AZO) y Dibromo fluoresceína (XNT). Por el contrario, *A. nidulans* logró decolorar parcialmente solo 3 colorantes AZO (Rojo congo, Rojo bordó y Rojo de metilo) y un ANQ (Alizarina S). Resultados similares han sido reportados previamente, en los cuales se evaluó su capacidad de degradar Rojo congo y Rojo de metilo, en cultivo o a través de tratamientos a 40°C con lacasas purificadas de *A. nidulans*, obteniendo altos porcentajes de decoloración <sup>97</sup>.

Un resultado interesante fue la identificación de sustratos degradables por *P. atropurpurascens*, no degradables por *P. chrysosporium* en las mismas condiciones (Crisoidina, Verde malaquita, Verde brillante, Azul vitoria 4R y Dibromo fluoresceína). Así, en las condiciones ensayadas en esta tesis, no se observó crecimiento de *P. chrysosporium* en Crisoidina (Basic Orange II), mientras que *P. atropurpurascens* fue capaz de degradar y crecer en su presencia (Figura 3.3.B). Estudios de decoloración con *P. chrysosporium*

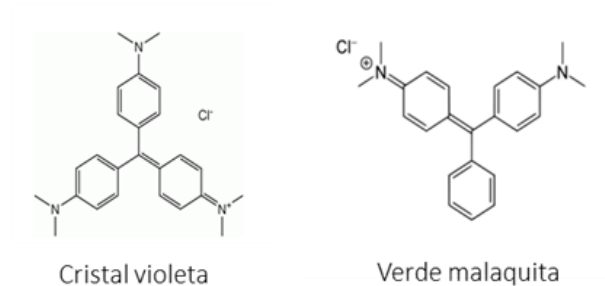
previamente publicados muestran que *P. chrysosporium* no es capaz de degradar este colorante incluso en condiciones más favorables (agregado del colorante al octavo día de incubación y en menor concentración) <sup>117</sup>.

Los colorantes Verde malaquita, Verde brillante y Cristal violeta (TFM) son fungicidas muy potentes, inclusive a bajas concentraciones. Su mecanismo de acción estaría relacionado a la inhibición de enzimas respiratorias. En particular el Verde malaquita (VM) se une fuertemente a enzimas que contienen tioles y tiene efectos nocivos a niveles mitocondriales. Esta destrucción, al parecer, podría ser prevenida con el agregado de la enzima citocromo C <sup>118</sup>. Un estudio realizado por Papinutti y Forchiassin <sup>119</sup>, demuestra que *P. chrysosporium* presenta una alta sensibilidad frente a este colorante, siendo incapaz de crecer con concentraciones superiores a 64  $\mu$ M. Por debajo de esta concentración, el hongo logró crecer y decolorar a tasas reducidas. Una explicación de la diferencia de tolerancia entre *P. atropurpurascens* (por lo menos 150  $\mu$ M) y *P. chrysosporium* podría ser la fase en la que se producen las enzimas, trofofase e idiofase respectivamente. Un comportamiento similar al de *P. atropurpurascens* se observó en el HPB *Fomes sclerdermeus*, que tolera concentraciones de VM hasta 128  $\mu$ M y la producción de enzimas lignolíticas también ocurre en trofofase <sup>119</sup>.

Otro factor que podría contribuir a la tolerancia a VM es la presencia de lacasas, ya que *P. chrysosporium* no cuenta con estas enzimas en su repertorio lignolítico en el sentido estricto, aunque sí cuenta en su genoma con AA1\_dist de la subfamilia de multicobre oxidasas <sup>11,16</sup>. *P. atropurpurascens* cuenta con un repertorio de 12 isoformas Lcc (Sección 3.3.3) y la actividad lacasa también fue detectada en *F. sclerdermeus*. De hecho, sobrenadantes de cultivos de este último en los cuales se detectó actividad Lac (sin actividad manganeso- o lignino peroxidasa) se utilizaron para decolorar soluciones de hasta 400  $\mu$ M de VM <sup>119</sup>. Por otro lado, *A. nidulans* no fue capaz de crecer en presencia

de 150  $\mu\text{M}$  VM (Figura 3.3.B), si bien cuenta en su repertorio con enzimas lacasas, quizás por una producción tardía de dichas enzimas <sup>94,95</sup>.

Bumpus y Brock, reportaron que la degradación tanto de VM como de Cristal violeta, por parte de *P. chrysosporium* en condiciones lignolíticas y presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (Figura 4.1), mediante la N-dimetilación secuencial catalizada por LiP. En estos ensayos se empleó una concentración 12,3  $\mu\text{M}$  de colorante agregado al sexto día de incubación. En el mismo estudio se demostró que *P. chrysosporium* puede degradar Cristal violeta bajo condiciones no lignolíticas (exceso de nitrógeno) sin formación detectable de productos de N-dimetilación, sugiriendo otros sistema de degradación <sup>120</sup>.



**Figura 4.1:** Estructuras de los colorantes Cristal violeta y Verde malaquita.

Basándose en los resultados obtenidos en el artículo de Bumpus y Brock, Cha et. al ensayó la capacidad de degradación del VM con el microorganismo *Cunninghamella elegans*, un hongo no-lignolítico utilizado como modelo en el metabolismo de xenobióticos <sup>121</sup>. El hongo fue capaz de transformar hasta 54  $\mu\text{M}$  de Verde malaquita, pero concentraciones superiores a los 108  $\mu\text{M}$  inhibían completamente su crecimiento. El agregado de metirapona, un inhibidor de la enzima citocromo P450 anuló completamente la reacción de decoloración en el medio de cultivo, por lo que este estudio sugiere que esta enzima puede ser la responsable de la transformación de VM mediante reducción a leucomalaquita y N-dimetilación secuencial <sup>121</sup>. Varios artículos sugieren que la enzima citosólica P450 tiene cierta competencia en la degradación de lignina ya que se han

encontrado en el secretoma de HPB en condiciones lignolíticas, pero no se tiene en claro cuál es su rol <sup>11,50,122,123</sup>.

Otros estudios sugieren que la razón de la tolerancia de xenobióticos por parte de los hongos sería la producción de enzimas antioxidantes como glutatión transferasa, ya que se ha visto que se sobreexpresan en situaciones de estrés oxidativo como es la degradación de la lignina donde se producen grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno <sup>124</sup>.

La lignina juega un papel primordial en la defensa celular de las plantas, pero además de esta barrera física y química, se ha visto que los árboles pueden activar sistemas como la producción de metabolitos secundarios ya sean terpenos, fenoles, flavonoides estilbenos o lignanos <sup>125</sup>. Estas moléculas tienen la capacidad de afectar de cierta forma la capacidad de eficiencia de la degradación de la madera, por lo que es comprensible, que la presencia de ciertas estructuras fenólicas como colorantes, afecten el metabolismo de los hongos. Los sistemas xenobióticos como las enzimas citocromo P450 y glutatión transferasa, forman parte del sistema de defensa del hongo frente a las respuestas de ataque de las plantas y también como sistema de detoxificación de radicales libres formados durante la lignólisis <sup>125</sup>.

En resumen, los hongos tienen variados mecanismos que pueden contribuir a la degradación de xenobióticos entre los que se incluyen los colorantes, sin desmedro de la preponderancia de las enzimas del sistema lignolítico.

El medio de cultivo también puede tener una gran influencia en la producción de enzimas lignolíticas. En este trabajo se demostró que *P. atropurascens* fue capaz de producir MnP y Lac en medio EM. Sin embargo, estudios previos demuestran que el medio AEM no es un buen inductor para la decoloración de colorantes AZO en *P. chrysosporium* <sup>126</sup>. Se ha visto que la presencia de enzimas lignolíticas, además de tener un rol en la deconstrucción de la pared celular, también tiene funciones detoxificantes <sup>119</sup>. Esta

también podría ser otra de las razones por las cuales, el hongo no fue capaz de crecer en los colorantes, donde quizá no pudo producir la suficiente cantidad de oxidorreductasas para oxidar compuestos altamente tóxicos para su metabolismo. Este mecanismo no sucede con *P. atropurpurascens* que puede generar enzimas lignolíticas inclusive en medios con altas concentraciones de nutrientes.

Cabe resaltar, que a pesar de que *P. chrysosporium* no haya podido crecer en presencia de cinco colorantes, sobre aquellos que sí pudo decolorar, lo realizó en un período de tiempo más corto (Tabla 3.1). Ambos hongos cuentan en su repertorio con MnP, pero *P. atropurpurascens* cuenta con Lcc, a diferencia de *P. chrysosporium*, que no produce estas enzimas. Sin embargo, este último puede secretar lignino-peroxidasas, enzimas de potencial redox más alto que las enzimas Lcc<sup>14</sup>.

## 4.2 Cinéticas de decoloración y potencial redox de colorantes

La capacidad de biodegradar colorantes está determinada por distintos factores como la temperatura y pH de trabajo, la estructura del colorante, naturaleza y posición de sustituyentes y la diferencia de potencial redox entre biocatalizador y colorante<sup>126,127</sup>.

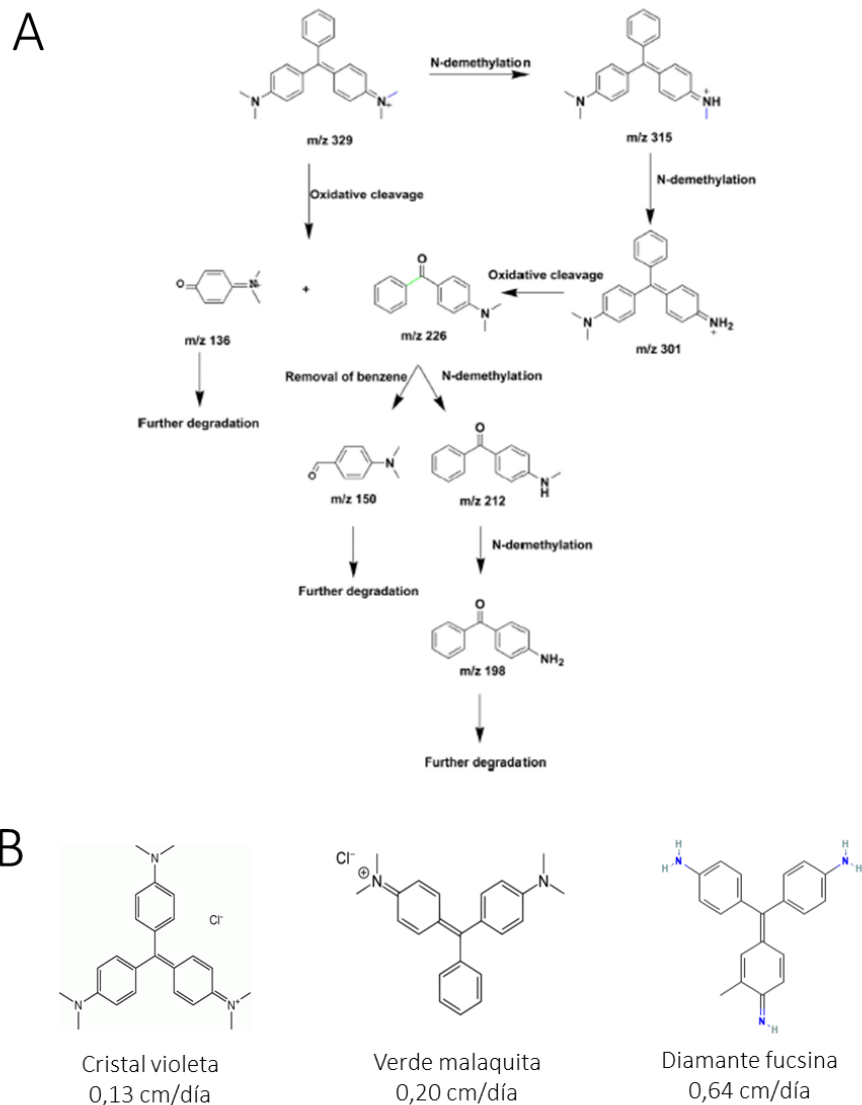
Las lacasas verificadas en este trabajo (Sección 3.3.3) en teoría tendrían un potencial redox entre +420 y +790 mV, mientras las MnP tendrían un potencial cercano a los 1.5 V, por lo que es de esperar que si el potencial de un colorante se ubica entre 1,5 V y 0,79 V pueda ser degradado por MnP pero no por lacasas<sup>22,128</sup>. Frente a esta hipótesis realizamos medidas de potencial a circuito abierto de colorantes AZO, ANQ, TFM, TZN y XNT, como una aproximación para evaluar cual/es tipo/s de enzima/s (lacasa o peroxidasa) podría actuar sobre cada sustrato y eventualmente vincularlas con la velocidad de decoloración, entendiendo que potenciales redox bajos se correlacionan con mayor susceptibilidad a ser oxidados. Todos los potenciales evaluados se ubicaron entre +435 y +563 mV por lo que en teoría todos podrían ser oxidados por MnP y las

lacasas de alto potencial redox. Aquellas lacasas con potencial redox cercano a +0,42 mV no podrían decolorar por sí solas sin la ayuda de un mediador redox.

Los resultados mostraron que aquellos con menores potenciales, Verde malaquita (435 mV) y Azul Victoria 4R (466,9 mV) que serían los más lábiles, también son los de menores  $V_{dec}$  (Figura 3.6) y aquellos con mayores potenciales, Amido black B (557,7 mV) y Diamante fucsina (556,1 mV) son degradados más rápidamente.

Estos resultados podrían deberse a que las diferencias de potencial entre los sustratos analizados no sean suficiente para incidir en la susceptibilidad o también a que el potencial de reducción medido a circuito abierto debería de haber sido medido hasta se cumpla  $I=0$  (equilibrio electroquímico). Esto podría ayudar a obtener datos más precisos, ya que la diferencia de potencial entre los colorantes puede ser mínima y que en las condiciones del ensayo (600-1200s) no se haya podido determinar con exactitud. En un artículo publicado por Zille et al. se informa que existe una relación directa entre la medida de la diferencia del potencial redox de un biocatalizador y colorantes AZO, y el porcentaje de decoloración <sup>127</sup>. Estas medidas fueron realizadas mediante voltimetría cíclica, la cual, según el trabajo, serían una medida más confiable de la habilidad de cierta enzima o microorganismo para oxidar/reducir un colorante. En un futuro se podría realizar este tipo de curvas para poder relacionar la velocidad de decoloración y el potencial de reducción, ya que dan una idea de la cinética de la reacción, mientras que el potencial a circuito abierto brinda información de las propiedades termodinámicas. La cinética de degradación de los colorantes podría explicar la diferencia de velocidad de decoloración entre el Cristal violeta, el Verde malaquita y el Diamante fucsina, ya que sus estructuras difieren en la cantidad de N-metilaciones. El mecanismo de oxidación por parte de MnP y lacasas estaría regido por N-dimetilaciones sucesivas y la oxidación del enlace C=C que une a los tres anillos aromáticos (Figura 4.2) <sup>96,120,121,129</sup>. Estos mecanismos

podrían explicar las diferencias de velocidad de decoloración obtenidas en la sección 3.1.12.



**Figura 4.2:** Degradación de Verde malaquita por MnP. A- Mecanismo de *Irpex lacteus* propuesto por Young et al. 2016 <sup>129</sup>. B- Estructuras de los colorantes TFM y sus respectivas velocidades de decoloración (Sección 3.1.2).

Una forma más específica de medir la velocidad de decoloración, sería realizar medidas del cambio de absorbancia en los sobrenadantes de cultivos en función del tiempo, teniendo en cuenta la posible adsorción del colorante en las paredes del micelio (empleando como blanco micelio autoclavado en medio de cultivo con colorante) y las diferencias de crecimiento en

presencia de cada colorante. Esto se debe a que las medidas en placa de Vdec están sujetas Vcre (Figura 3.6). Por este motivo, en el ejemplo que se muestra en la Figura 4.2, se eligieron colorantes cuyas Vcre están dentro del mismo orden. Otra posible metodología es realizar la decoloración con las enzimas purificadas, ya que se evitaría tener que realizar el control de adsorción por parte del micelio.

### 4.3 Actividad lignolítica y expresión de genes *mnp* y *lcc*

Los mecanismos de expresión de enzimas lignolíticas son muy diversos y varían entre especies. Su producción está regulada por numerosas señales ambientales vinculadas con las funciones biológicas de estas enzimas como la presencia de xenobióticos, fuentes de carbono y nitrógeno, metales divalentes, temperatura, inclusive distintas luz de distintas longitudes de onda <sup>130</sup>.

En los HPB, se ha visto que las lacasas tienen diversas funciones que van desde la producción de pigmentos a la inducción del cuerpo fructífero. Las manganeso-peroxidasas, por otra parte, además de participar activamente de la metabolización de la lignina, podrían tener otros roles como la detoxificación de xenobióticos <sup>20,22,130</sup>. La inmensa importancia de estas enzimas se confirma por la redundancia de las mismas, dada por la presencia en el genoma de hongos lignolíticos de varios genes con alta homología <sup>130</sup>.

En esta tesis, se verificó la presencia de 12 *lcc* y 8 *mnp* (Sección 3.3). Basándose en motivos conservados, se encontró que *P. atropurascens* cuenta con diez Lcc de alto potencial redox, una Lcc de potencial redox intermedio y una SLAC. Las ocho *mnp* verificadas, corresponden a siete MnP exta largas y una MnP larga.

No se encontraron secuencias con homología relevante con genes *lip* en el genoma y transcriptomas de *P. atropurascens* (Sección 3.3.1); tampoco se registró actividad LiP en ninguna de las condiciones ensayadas (Sección 3.2). Estos resultados confirman los

datos obtenidos por Alborés et al quien no detectó actividad LiP en ninguna de las condiciones ensayadas <sup>68</sup>

Los perfiles de actividad enzimática (Sección 3.2) muestran que *P. atropurpurascens* expresa MnP y Lcc durante la trofofase, una característica diferente a la mayoría de HPB estudiados. Por lo general, el consenso es que las enzimas lignolíticas se producen durante el metabolismo secundario, en condiciones de déficit de nitrógeno y/o carbono <sup>130</sup>. *P. atropurpurascens*, sin embargo, es capaz de producir enzimas MnP y Lcc en etapas tempranas aún en medio rico y la presencia de madera no pareciera tener un efecto inductor en el tiempo ensayado (Figura 3.9). En este momento se está analizando la expresión diferencial de enzimas en presencia de material lignocelulósica por comparación de los transcriptomas en medio rico (cultivos de 3 días) y en madera (cultivos de 3 meses).

A partir del cribado de la capacidad de crecimiento y decoloración (Sección 3.1.1) se seleccionaron colorantes de interés como aquellos que, a diferencia del HPB control *P. chrysosporium*, *P. atropurpurascens* pudo crecer y degradar. Otro criterio de selección fue el grado de influencia del colorante en la reducción de Vcre y Vdec. Dentro de cada grupo químico se eligió un par, teniendo en cuenta aquellos que reducen la cinética de crecimiento por debajo del 30% (considerados en este trabajo como colorantes "tóxicos") y entre 50 y 80% (considerados como "no tóxicos"). La actividad medida en el sobrenadante a los 3, 7, 10 y 20 días de incubación, se normalizó por la biomasa producida en cada cultivo ya que cada colorante tiene un efecto diferente sobre el crecimiento del micelio (Sección 3.2).

Los colorantes seleccionados dentro del grupo "no tóxico" (que inhiben el crecimiento del micelio, pero no al nivel de los "tóxicos") tuvieron diferentes efectos en medio líquido. Como era de esperar, estos colorantes tuvieron un menor impacto sobre el peso de la biomasa en comparación a los tóxicos (Figura 3.10). La acumulación de biomasa

conforme el tiempo de incubación se mantuvo similar a la del medio sin colorante excepto para el medio suplementado con Fluoresceína cuyo crecimiento se vio enlentecido hasta el día 7 pero luego, la biomasa creció a la par que en el control. Teniendo en cuenta el error de los ensayos, sobre el día 7 y 10 de incubación, las actividades normalizadas en los sobrenadantes se mantuvieron constante en presencia y ausencia de colorantes no tóxicos. La única excepción, fue la actividad MnP y Lcc en presencia de Fluoresceína que fue casi 5 veces mayor al control (Figura 3.10). Sobre el día 20 de incubación, las condiciones sin colorantes, con RBBR, Amido Black B10, Fluoresceína y Diamante fucsina tuvieron la misma actividad Lac ( $\sim 0,1$  UE\*g/mL). Se observó un perfil similar en la actividad MnP en las mismas muestras, a excepción de la muestra con Diamante fucsina en la cual se detectó un aumento en la actividad de casi el doble ( $0,23$  UE\*g/mL) que la actividad en el sobrenadante sin colorante ( $0,147$  UE\*g/mL)

Dentro del grupo "tóxicos", Rojo congo y Verde malaquita enlentecieron el crecimiento de biomasa durante los días 7 y 10 respectivamente (Figura 3.10). Mientras que el colorante Rojo carmín, mantuvo el crecimiento a la par que el medio sin colorante hasta el día 7. Luego de esta fecha, el peso de la biomasa se mantuvo constante. A excepción de lo observado en placa (Figura 3.6), el colorante Dibromo fluoresceína no afectó el crecimiento en medio líquido (Figura 3.10). Sin embargo, la actividad MnP se vio disminuida sobre el día 7 y 10 de incubación en presencia de este colorante. Esta disminución puede deberse a la inhibición de la expresión de genes *mnp* como también a la inhibición/inactivación a nivel de proteínas MnP. Se ha visto que algunos metales (como por ejemplo metales trivalentes como el  $Ce^{+3}$  o  $Gd^{+3}$ ), se puede unir al sitio de unión de Mn, no permitiendo el correcto funcionamiento de la enzima<sup>131</sup>. En particular, Dibromo fluoresceína, contiene bromo y mercurio en su estructura, los cuales podrían ser la razón de la disminución de la actividad. Por otro lado, los colorantes Rojo congo y Rojo carmín, no parecieron tener diferencia en la actividad enzimática MnP sobre los días 7 y 20 de incubación, aunque se aprecia una leve disminución en la actividad sobre el día 10.

En presencia Verde malaquita, la actividad MnP fue notoriamente superior a partir del día 10, llegando a ser casi cuatro veces superior al medio sin colorante sobre el final de la fermentación (día 20).

En cuando a la actividad Lac en presencia de colorantes "tóxicos", se ve reducida sobre el día 7 en presencia de los colorantes Dibromo fluoresceína y Verde Malaquita, no así para los colorantes rojo congo y Rojo carmín cuya actividad fue similar al medio sin colorante. La inhibición de enzimas Lcc también está reportada. Componentes como el ión azida ( $N_3^-$ ), el cianuro o el ión flúor, se pueden unir fuertemente al sitio T2, inactivando la enzima <sup>20</sup>.

Sobre el día 10, sin embargo, todas las actividades parecerían igualarse, pero al final del cultivo, nuevamente, la actividad Lcc de la muestra con Verde malaquita vuelve a aumentar de forma notoria, mientras el resto de las condiciones mantienen su actividad cercana a 0,1 UE\*g/mL. Este resultado podría sugerir que la presencia de Verde malaquita puede tener un efecto inductor de genes lignolíticos en *P. atropurascens*.

La expresión de los genes *mnp* y *lcc* (seleccionados), se estudió en micelios correspondientes a los días de máxima actividad para los colorantes Diamante fucsina, Verde malaquita, Fluoresceína y Fluoresceína di bromo, con el fin de evaluar la influencia de estos colorantes sobre la expresión génica y de identificar, si los hubiera, aquellos de mayor contribución a actividad. De hecho la inducción de la expresión de genes lignolíticos por fenoles y estructuras aromáticas está documentado en los HPB <sup>55</sup>. Debido a las altas actividades en los sobrenadantes de Verde malaquita (día 20) y Fluoresceína (día 7) era de esperar, que la expresión relativa de genes *lcc* y *mnp* acompañaran esta tendencia. Por otro lado, era de esperar que la expresión *mnp* sobre el día 20 de incubación con Diamante fucsina aumentara (debido a mayor actividad enzimática que el control) y que la de Dibromo fluoresceína disminuyera (debido a baja actividad enzimática) pero que la expresión *lcc* se mantuviera estable en ambos casos.

Los resultados mostraron que todos los genes *mnp* redujeron su expresión relativa en las muestras incubadas con Diamante fucsina y Verde malaquita (ambos TFM) en relación a la muestra sin colorante al día 20, al contrario de lo esperado ya que ambas muestras exhibían actividad MnP superior. Especialmente Verde malaquita mostró una reducción mayor en los niveles de expresión globales de los genes *mnp* en relación a Diamante fucsina, cuando la actividad del primero fue claramente superior. Por otra parte, al día 7, las muestras con Fluoresceína (quienes exhibían mayor actividad sobre esta fecha) no demostraron tener una diferencia en la expresión relativa de los genes *mnp*. Finalmente, la muestra incubada durante 10 días en presencia de Dibromo fluoresceína, mostró una reducción leve de los niveles de expresión del gen *mnpG*, siendo coherente con la actividad enzimática reducida, pero sin embargo, sobre esta misma muestra se observó un aumento significativo del grupo *mnpB12F* y del gen *mnpA*.

Estos resultados indican que la regulación de genes *mnp* por parte de los colorantes, puede estar sujeta a diferentes mecanismos incluyendo quizá regulaciones a nivel postranscripcional y postraduccional. Por ejemplo, en algunos hongos se ha visto que el ion  $Mn^{2+}$  no afecta la expresión de genes *mnp* pero está vinculado a la inducción postraduccional, pero muy poco se conoce acerca de los mecanismos que subyacen las regulaciones a este nivel en HPB <sup>45</sup>. Mancilla et al, encontró que  $Mn^{2+}$  funciona como inductor de la secreción de MnP en *Ceriporiopsis subvermispora*. En ausencia de manganeso, observaron altas tasas de expresión de los genes *mnp*, sin embargo, la actividad enzimática MnP fue nula. La falta de MnP en el sobrenadante de cultivo, se corroboró por *western blot*. A través de inmunodetección con microscopía electrónica, se detectaron alto niveles de la proteína en compartimentos intracelulares. El agregado de manganeso al medio de cultivo, no alteraba los niveles de expresión génica, pero

aumentaba los niveles de proteína en el sobrenadante de cultivo, indicando que la presencia de manganeso estaría relacionada a la secreción de las proteínas <sup>45</sup>.

En otro orden, la expresión de genes *mnp* en medio sin colorante se mantuvo constante hasta el día 10, para luego aumentar de forma importante hacia el día 20. Sin embargo, sobre el día 20, la actividad MnP registrada en el sobrenadante fue mínima en comparación con la actividad del día 7 y día 10. El comportamiento de la actividad enzimática a lo largo de los días acompañó el crecimiento del micelio, por lo que la producción de MnP podría estar relacionada al déficit nutricional y al estadio de crecimiento del hongo. Sobre el día 20 de incubación, el micelio ya se encuentra en fase de muerte, donde la escasez de fuentes de nitrógeno y carbono es marcada. La inducción de genes puede estar regulada vía mecanismos de cAMP, ya que esta molécula tiene un rol preponderante en procesos de desarrollo y morfogénesis de hongos y se han encontrado motivos creA en promotores de enzimas lignolíticas, inclusive en numerosas copias <sup>130</sup>. A pesar de haber un aumento en los transcriptos *mnp* a lo largo del tiempo de fermentación, la traducción parecería estar bloqueada o por el exceso de transcriptos o por otros mecanismos regulatorios, ya que la actividad no acompaña el incremento de la expresión génica.

Estos mismos resultados se observan en la expresión de enzimas Lcc en medio sin colorante, donde el aumento de la expresión relativa de ARNm de *lcc* (en relación al día 3 de incubación) va creciendo hasta llegar a un impresionante aumento de 265 veces en *lcc11* y de 30 veces para *lcc10*. Sin embargo, la actividad enzimática Lcc, al igual que en MnP, es mínima sobre el final de la curva de actividad. El hecho de que este aumento tan importante en la expresión no se vea reflejada en la actividad, nuevamente sugiere que la inducción de transcriptos *lcc* puede estar regido por el déficit nutricional, donde un aumento de producción de proteínas tan importante para el microorganismo estresado por la falta de nutrientes puede ser deletéreo. Por esta razón, la traducción o la secreción

podría estar inhibida. Resultados similares, fueron reportados para las lignino-peroxidasas en *P. chrysosporium*, que registraron altos niveles de expresión *lip* en medios de cultivo con baja concentración de glucosa, pero muy baja actividad en el sobrenadante de cultivo <sup>132</sup>.

También hay que considerar que la producción enzimática puede estar ocurriendo, pero estas enzimas estén en una forma inactiva. Se ha visto que el peróxido de hidrógeno actúa de inductor en la expresión *mnp*, pero a altas concentraciones inactivan la actividad enzimática <sup>130</sup>. Esto tendría sentido sobre el final del cultivo, ya que durante el metabolismo lignolítico enzimas como la glioxal oxidasas y aril alcohol oxidasas producen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estas enzimas generalmente se encuentran co-expresadas junto a enzimas lignolíticas, siendo la base de la producción de peróxido de hidrógeno <sup>14</sup>. La acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podría provocar la inactivación tanto de MnP como de Lcc.

En cuanto a la expresión de las isoformas de *lcc* en presencia de colorantes, sobre el día 20 de incubación con Verde malaquita, los niveles de expresión de *lcc11* está reducida unas 27 veces, los de *lcc10* unas 2,6 veces y la de *lcc5* unas 3 veces. Por otra parte, *lcc4* mantiene los mismos niveles de expresión que el control, mientras que *lcc2*, tiene un aumento del doble (Figura 3.21). En cuanto a las actividades enzimáticas, en presencia de este colorante la actividad es superior a la muestra sin colorante al día 20 (0,4 UE\*g/mL contra 0,09 UE\*g/mL del control). Una explicación sencilla podría ser que la actividad global en el sobrenadante tuviera la contribución de otras isoformas Lcc que no fueron evaluadas, pero no puede descartarse que la presencia de Verde malaquita induzca mecanismos de regulación que compitan, directa o indirectamente, con la inducción producida por el déficit nutricional. Por otra parte, Diamante fucsina, tiene una actividad enzimática intermedia, pero los niveles de inhibición del transcripto *lcc11* y *lcc5* son más moderados, mientras que no se detectó un cambio significativo en la expresión de *lcc5* (Figura 3.21). La actividad Lcc registrada más alta, corresponde a Fluoresceína, sin

embargo, las expresiones de todos los transcritos *lcc* (excepto *lcc11*), no tienen diferencia con el control. La expresión de *lcc11* es de cerca de 1,8 en relación al día 3 de incubación mientras que la del control es de 7,3 (Figura 3.20). Este valor de expresión relativa corresponde al valor más bajo de todas las condiciones, a pesar de ser la actividad enzimática más alta. Por otra parte, la actividad en la muestra con Dibromo fluoresceína no tienen diferencia con la actividad del control (teniendo en cuenta la desviación de la medida). Pero nuevamente se observa una baja en los niveles de expresión *lcc11*, *10* y *5* (en un factor de 0,3, 0,43 y 0,39 respectivamente) en relación a la muestra sin colorante incubada por 10 días.

La ausencia de correlación entre expresión génica y actividad enzimática, en presencia de estructuras aromáticas, fue previamente reportada. Por ejemplo, en *Trametes sp.* I62 se observó que si bien la adición de guayacol resultó en un incremento tanto a nivel transcripcional como en la actividad Lcc, el agregado de ácido ferúlico o p-cumárico, provocaron un aumento de actividad enzimática que no se concuerdan con los bajos niveles de los ARNm<sup>55</sup>.

El conjunto de los resultados indica que la presencia de colorantes modifica la expresión y actividad Lcc y MnP, donde cada colorante tiene niveles de incidencia diferente sobre la regulación de cada isoforma. Los mecanismos a través de los cuales los colorantes inciden en la regulación parecen actuar tanto a nivel transcripcional como traduccional y/o postraduccional. Diferentes aproximaciones permitirían profundizar en estos aspectos como: la búsqueda de secuencias de unión a factores transcripcionales en los promotores de cada gen; evaluación de la presencia de las enzimas en los sobrenadantes a través de *western-blot* con anticuerpos específicos; evaluación de la retención de las proteínas sintetizadas en las hifas, a través de estudios por inmunodetección con microscopía confocal o microscopía electrónica, entre otras.

## 5. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se analizó la capacidad de decoloración y de crecimiento de *P. atropurpurascens* frente a diferentes cromóforos y las posibles enzimas lignolíticas involucradas en dicho proceso, a través del análisis de la actividad y de la expresión génica.

*P. atropurpurascens* fue capaz de crecer y degradar todos los colorantes ofrecidos, esto es colorantes con cromóforos de distintas estructuras químicas, azo, antraquinona, trifenilmetano, tiazina y xantenos, demostrando una gran capacidad oxidante.

Todos los colorantes afectaron en diferente medida la velocidad de crecimiento y son degradados a diferentes velocidades en placa, las cuales no parecen tener una relación directa con el potencial de los sustratos medido a circuito abierto.

Se identificaron cinco sustratos, Crisoidina, Verde malaquita, Verde brillante, Azul victoria 4R y Dibromo fluoresceína, degradables por *P. atropurpurascens*, no degradables por *P. chrysosporium* en las mismas condiciones, en las cuales este último no presenta crecimiento observable. Estos resultados indican que *P. atropurpurascens* tiene particularidades en su metabolismo, interesantes para su análisis. Estos resultados postulan a *P. atropurpurascens* como un gran candidato a ser utilizado en la biorremediación, ya que tolera altas concentraciones de colorantes tóxicos.

Por otra parte, con el fin de profundizar en el estudio de la capacidad lignolítica, se secuenció el genoma de *P. atropurpurascens* y dos transcriptomas, uno a partir de cultivos jóvenes en medio rico y otro a partir de cultivos de tres meses en presencia de madera. Con esta información se realizó una búsqueda por homología de genes MnP, LiP y Lcc.

Se encontró que *P. atropurpurascens* cuenta con 8 secuencias *mnp* y 12 secuencias *lcc*. No se encontraron secuencias correspondientes a lignino-peroxidasas.

Los transcriptomas, además de servir para la identificación de los genes de interés para este trabajo, está siendo utilizada para estudios de expresión diferencial con el fin de generar un panorama más completo de los genes, y sus respectivas proteínas, involucradas en el sistema lignolítico en sentido más amplio. Este estudio también permitiría estudiar más en detalle las alteraciones metabólicas que suceden en cada condición y sería una guía para la selección de otras isoformas *Lcc* interesantes a analizar por qPCR. También, a partir del ensamblado del genoma, se abre la posibilidad de identificar elementos regulatorios a nivel de promotores (ej. SRE, MRE, HSE, entre otros). La identificación de estas secuencias podría dar pistas acerca de los posibles mecanismos de regulación a nivel transcripcional.

Por otra parte, se estableció un sistema de referencia para estudios de expresión relativa por RT-qPCR constituido por los genes *phos* y *act*, de expresión estable en las diferentes condiciones evaluadas. Se diseñaron cebadores específicos tanto para dichos genes como para cinco *lcc* y 5 *mnp*. La alta similitud a nivel de secuencias nucleotídicas de los restantes genes *mnp* (*mnpB1*, *mnpB2* y *mnpF*) no permite su análisis por separado con este tipo de técnica.

Las actividades enzimáticas de MnP y *Lcc* aumentaron de forma notoria en presencia de Verde malaquita al día y Fluoresceína, mientras que con Diamante fucsina también se observó leve aumento de la actividad MnP. En presencia de Fluoresceína di bromo, se registró un descenso en la actividad enzimática MnP. El hecho de que *P. atropurpurascens* logre producir enzimas MnP y *Lcc* activas en durante su metabolismo primario es una buena característica para su empleo en la remediación de efluentes con alta carga de nutricional.

Los niveles de ARNm de la mayoría de los transcritos *mnp* en los cultivos sin colorante sufrieron un fuerte incremento. Los genes *lcc 10* y *lcc11*, tuvieron un impactante aumento al final del ensayo, mientras que los demás genes *lcc* no mostraron tener una expresión diferencial en función del tiempo de incubación. No se observó correlación alguna entre la expresión de los transcritos y las actividades enzimáticas. En términos generales, los niveles de expresión de *lcc* y *mnp* en presencia de colorantes fueron menores que en ausencia de colorantes. Por ejemplo, los mayores niveles de transcritos *lcc* y *mnp* corresponden a muestras en las cuales la actividad enzimática fue mínima. Los niveles de transcritos parecen estar sujetos más fuertemente al estado nutricional o a la etapa de desarrollo del micelio que a la presencia de colorantes. En este sentido, sería interesante evaluar la cantidad de proteínas presentes en cada condición (*western blot*) y hacer un seguimiento de su secreción mediante inmunodetección con microscopía.

Este trabajo demuestra que *P. atropurpurascens* es una gran herramienta biotecnológica a utilizar en la biorremediación de efluentes y abre nuevas posibilidades de responder preguntas acerca de los mecanismos de expresión y regulación de enzimas lignolíticas. Con el fin de mejorar los procesos de biotransformación de colorantes, es importante conocer en detalle el funcionamiento del sistema lignolítico y los factores ambientales que afectan a la producción de las enzimas que lo conforman. Por este motivo, sería interesante estudiar si este hongo cuenta con otras enzimas peroxidasas como DyP (*dye peroxidases*) o peroxidasas versátiles, así como también otras enzimas del grupo de oxidasas del tipo multicobre. Con el fin de evaluar la hipótesis de las diferencias en el sistema de detoxificación, se podrían estudiar y comparar la cantidad de genes *cytP450* y glutatión transferasas de *P. atropurpurascens* y *P. chrysosporium*.

Otro aspecto relevante o interesante sería evaluar la capacidad de cada enzima por separado. En este sentido, una vez verificadas las secuencias, se llevó a cabo la expresión

heteróloga de dos MnP en *A. nidulans*. Los resultados obtenidos muestran que en las condiciones se producen MnP, pero no son secretadas.

Para la continuación de este trabajo, en las etapas siguientes de este se buscará verificar que las proteínas producidas sean activas; también se realizarán ensayos con expresión con diferentes concentraciones de  $\text{MnSO}_4$  y según los resultados, se buscará agregar a la construcción de un péptido señal de exportación de *A. nidulans*.

## 6. Bibliografía

1. Renault, H., Werck-Reichhart, D. & Weng, J. K. Harnessing lignin evolution for biotechnological applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **56**, 105–111 (2019).
2. Weng, J. K. & Chapple, C. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol.* **187**, 273–285 (2010).
3. Martone, P. T. *et al.* Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. *Curr. Biol.* **19**, 169–175 (2009).
4. Ward, G., Hadar, Y. & Dosoretz, C. The Biodegradation Of Lignocellulose By White Rot Fungi. in *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications* 393–407 (2003).
5. Feulner, G. Formation of most of our coal brought Earth close to global glaciation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 11333 LP – 11337 (2017).
6. Zhao, Y., Man, Y., Wen, J., Guo, Y. & Lin, J. Advances in Imaging Plant Cell Walls. *Trends Plant Sci.* **24**, 867–878 (2019).
7. Espiñeira, J. M. *et al.* Distribution of lignin monomers and the evolution of lignification among lower plants. *Plant Biol.* **13**, 59–68 (2011).
8. Zhao, X., Zhang, L. & Liu, D. Biomass recalcitrance . Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. (2012)
9. Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 519–46 (2003).
10. National Science Foundation. Study on Fungi Evolution Answers Questions About Ancient Coal Formation and May Help Advance Future Biofuels Production. [https://www.nsf.gov/news/news\\_summ.jsp?cntn\\_id=124570](https://www.nsf.gov/news/news_summ.jsp?cntn_id=124570) (2012).
11. Floudas, D., Riley, R., Barry, K., Berkeley, L. & Blanchette, R. The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. (2012)
12. Nelsen, M. P., DiMichele, W. A., Peters, S. E. & Boyce, C. K. Delayed fungal evolution did not cause the Paleozoic peak in coal production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 2442 LP – 2447 (2016).
13. Kojima, Y., Várnai, A., Eijsink, V. G. H. & Yoshida, M. The Role of Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Wood Rotting The Role of Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Wood Rotting Basidiomycetes. (2020)
14. Bissaro, B., Várnai, A., Røhr, Å. K. & Eijsink, V. G. H. Oxidoreductases and Reactive Oxygen Species in Conversion of Lignocellulosic Biomass. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **82**, 1–51 (2018).
15. Weng, C., Peng, X. & Han, Y. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. *Biotechnol. Biofuels* **14**, 1–22 (2021).
16. Riley, R. *et al.* Erratum: Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 14959 (2014).
17. Ruiz-Deñas, F. J. *et al.* Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J. Exp. Bot.* **60**, 441–452 (2009).

18. Jarosz-wilkolazka, A., Janusz, G., Mazur, A., Gr, M. & Kubik-komar, A. Transcriptome-based analysis of the saprophytic fungus *Abortiporus biennis* – response to oxalic acid. **199**, 79–88 (2017).
19. Janusz, G., Kucharzyk, K. H., Pawlik, A., Staszczak, M. & Paszczyński, A. J. Enzyme and Microbial Technology Fungal laccase , manganese peroxidase and lignin peroxidase : Gene expression and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* **52**, 1–12 (2013).
20. Wong, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol* **157**, 174–209 (2009).
21. Kunamneni, A., Ballesteros, A., Plou, F. J. & Alcalde, M. Fungal laccase - a versatile enzyme for biotechnological applications. *Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol.* 233–245 (2007).
22. Gioia Fabre, L. Producción, caracterización e inmovilización de lacasas para uso en biocatálisis y biorremediación. (Universidad de la República, 2017).
23. Asina, F. Biodegradation Of Lignin By Fungi , Bacteria And Laccases. (University of North Dakota, 2016).
24. Janusz, G. *et al.* Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 941–962 (2017).
25. Glenn, J. & Gold, M. Purification and characterization of an extracellular Mn (II) dependent peroxidase from the lignin degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* **242**, 329–341 (1985).
26. Knop, D., Yarden, O. & Hadar, Y. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities , expression , and potential applications. 1025–1038 (2015).
27. Hofrichter, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase ( MnP ). *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 454–466 (2002).
28. Kirk, T. & Farrell, R. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol* **41**, Rev Microbiol 41, 465 505 (1987).
29. Martinez, A. *et al.* Biodegradation of lignocellulosics: microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. *Int J Microbiol* **8**, 195 204 (2005).
30. Zapanta, L. & Tien, M. The roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. *J. Biotechnol.* **53**, 93–102 (1997).
31. Bronikowski, A., Koschorreck, K. & Urlacher, V. B. Redesign of a New Manganese Peroxidase Highly Expressed in *Pichia pastoris* towards a Lignin-Degrading Versatile Peroxidase. *Chembiochem* **19**, 2481–2489 (2018).
32. Pozdnyakova, N. N. Involvement of the Ligninolytic System of White-Rot and Litter-Decomposing Fungi in the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biotechnol. Res. Int.* **2012**, 1–20 (2012).
33. Knop, D. *et al.* Limits of versatility of versatile peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 4070–4080 (2016).
34. Fernández-fueyo, E. *et al.* Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression , molecular structure , catalytic and stability properties , and lignin-degrading ability. 1–23 (2014).
35. Kuhar, F., Castiglia, V. & Levin, L. Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **104**, 238–243 (2015).

36. Piscitelli, A. *et al.* Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. *Curr. Genomics* **12**, 104–112 (2011).
37. Ohga, S. & Royse, D. J. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. **201**, 111–115 (2001).
38. Piscitelli, A. *et al.* Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. 104–112 (2011).
39. Kamitsuji, H., Honda, Y., Watanabe, T. & Kuwahara, M. Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 287–294 (2004).
40. Kuhar, F. & Papinutti, L. Optimización de la producción de lacasa por dos cepas de *Ganoderma lucidum* utilizando inductores fenólicos y metálicos. *Rev. Argent. Microbiol.* **46**, 144–149 (2014).
41. Galhaup, C. & Haltrich, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl Microbiol Biotechnol* 225–32 (2001)
42. Kannaiyan, R., Mahinpey, N., Mani, T., Martinuzzi, R. & Kostenko, V. Enhancement of *Dichomitus squalens* tolerance to copper and copper-associated laccase activity by carbon and nitrogen sources. *Biochem Eng J* **67**, 140–7 (2012).
43. Fomina, M. *et al.* Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. *Appl Env. Microbiol* **71**, 371–81 (2005).
44. Brown, J., Glenn, J. & Gold, M. Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **172**, 3125–30 (1990).
45. Mancilla, R., Canessa, P., Manubens, A. & Vicuña, R. Effect of manganese on the secretion of manganese-peroxidase by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Fungal Genet Biol* **47**, 656–61 (2010).
46. MESTER, T., JONG, E. DE & FIELD, J. A. Manganese Regulation of Veratryl Alcohol in White Rot Fungus and Its Indirect Effect on Lignin Peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1881–1887 (1995).
47. Belinky, P. A., Flikshtein, N. & Dosoretz, C. G. Induction of lignin peroxidase via reactive oxygen species in manganese-deficient cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 222–228 (2006).
48. Young, D. *et al.* Degradation of bunker C fuel oil by white-rot fungi in sawdust cultures suggests potential applications in bioremediation. *PLoS One* **10**, 1–15 (2015).
49. Janusz, G. *et al.* Comparative transcriptomic analysis of *Cerrena unicolor* revealed differential expression of genes engaged in degradation of various kinds of wood. *Microbiol. Res.* **207**, 256–268 (2018).
50. Couturier, M. *et al.* Biotechnology for Biofuels Enhanced degradation of softwood versus hardwood by the white - rot fungus *Pycnoporus coccineus*. *Biotechnol. Biofuels* 1–16 (2015)
51. Nuryana, I., Ilmiah, Z., Andriani, A. & Yopi, Y. Laccase and Manganese Peroxidase (MnP) Activities in the White-Rot Fungus *Trametes hirsuta* in Response to Aromatic Compounds. *Ann. Bogor.* **23**, 66 (2020).
52. Cancel, A. M., Orth, A. B. & Tien, M. Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2909–2913 (1993).
53. Thanh Mai Pham, L., Eom, M.-H. & Kim, Y. H. Inactivating effect of phenolic unit structures

- on the biodegradation of lignin by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* **61–62**, 48–54 (2014).
54. Borin, G. P. *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals different strategies for degradation of steam-exploded sugarcane bagasse by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. *BMC Genomics* **18**, 1–21 (2017).
  55. Terrón, M. C. *et al.* Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 954–962 (2004).
  56. Saldarriaga-Hernández, S. *et al.* Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. *Int. J. Biol. Macromol.* **161**, 1099–1116 (2020).
  57. Zhuo, R. & Fan, F. A comprehensive insight into the application of white rot fungi and their lignocellulolytic enzymes in the removal of organic pollutants. *Sci. Total Environ.* **778**, 146132 (2021).
  58. Kumar, A., Bilal, M., Iqbal, M. N., Meyer, A. S. & Raj, A. Science of the Total Environment Bioremediation of lignin derivatives and phenolics in wastewater with lignin modifying enzymes: Status, opportunities and challenges. **777**, (2021).
  59. Plácido, J. & Capareda, S. Ligninolytic enzymes: A biotechnological alternative for bioethanol production. *Bioresour. Bioprocess.* **2**, (2015).
  60. Paramjeet, S., Manasa, P. & Korrapati, N. Biofuels: Production of fungal-mediated ligninolytic enzymes and the modes of bioprocesses utilizing agro-based residues. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **14**, 57–71 (2018).
  61. Gnanesh Kumar, B. S. & Surolia, A. Site specific N-glycan profiling of NeuAc( $\alpha$ 2-6)-Gal/GalNAc-binding bark *Sambucus nigra* agglutinin using LC–MSn revealed differential glycosylation. *Glycoconj. J.* **33**, 907–915 (2016).
  62. Chang, Y., Yang, D., Li, R., Wang, T. & Zhu, Y. Textile dye biodecolorization by manganese peroxidase: A review. *Molecules* **26**, 1–15 (2021).
  63. Yang, J. *et al.* Laccase-Catalyzed Decolorization of Malachite Green: Performance Optimization and Degradation Mechanism. *PLoS One* **10**, 1–14 (2015).
  64. Saravanakumar, T., Palvannan, T., Kim, D.-H. & Park, S.-M. Manganese Peroxidase H4 Isozyme Mediated Degradation and Detoxification of Triarylmethane Dye Malachite Green: Optimization of Decolorization by Response Surface Methodology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171**, 1178–1193 (2013).
  65. Chatha, S. A. S., Asgher, M. & Iqbal, H. M. N. Enzyme-based solutions for textile processing and dye contaminant biodegradation—a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24**, 14005–14018 (2017).
  66. Kózka, B., Nałęcz-Jawecki, G., Turło, J. & Giebułtowicz, J. Application of *Pleurotus ostreatus* to efficient removal of selected antidepressants and immunosuppressants. *J. Environ. Manage.* **273**, (2020).
  67. Rivero Machado, A. *et al.* Selección de basidiomicetos con capacidad degradativa de xenobioticos. *Rev. del Lab. Tecnológico Uruguay.* **12**, 27–33 (2016).
  68. Alborés, S., Bustamante, M. J., Fraguas, L. F. & Cerdeiras, M. P. Proteins from *Punctularia atropurpurascens* with Biotechnological Applications. *Nat. Resour.* **5**, 915–925 (2014).
  69. Ferraz, Â. *et al.* Biodegradation of *Pinus radiata* softwood by white- and brown-rot fungi.

- 1, 1998–2001 (2001).
70. Criquet, S., Tagger, S., Vogt, G., Iacazio, G. & Le Petit, J. Laccase activity of forest litter. *Soil Biol. & Biochem.* **31**, 1239–1244 (1999).
  71. Holm, K. A., Nielsen, D. M. & Eriksen, J. Automated colorimetric determination of recombinant fungal laccase activity in fermentation samples using syringaldazine as chromogenic substrate. *J. Automat. Chem.* **20**, 199–203 (1998).
  72. Castillo, M. P., Stenström, J. & Ander, P. Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-(dimethylamino)benzoic acid. *Anal. Biochem.* **218**, 399–404 (1994).
  73. Tien, M. & Kirk, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 2280–2284 (1984).
  74. Franssen, M. C. R., Steunenbergh, P., Scott, E. L., Zuilhof, H. & Sanders, J. P. M. Immobilised enzymes in biorenewables production. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6491–6533 (2013).
  75. Castanera, R. *et al.* Transposable Elements versus the Fungal Genome: Impact on Whole-Genome Architecture and Transcriptional Profiles. *PLoS Genet.* **12**, e1006108 (2016).
  76. Alfaro, M. *et al.* Comparative and transcriptional analysis of the predicted secretome in the lignocellulose-degrading basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Environ. Microbiol.* **18**, 4710–4726 (2016).
  77. Castanera, R., López-Varas, L., Pisabarro, A. G. & Ramírez, L. Validation of reference genes for transcriptional analyses in *Pleurotus ostreatus* by using reverse transcription-quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 4120–4129 (2015).
  78. Barraco, M. Caracterización de transportadores de Basidiomycotas mediante expresión heteróloga en *Aspergillus nidulans*. (Universidad de la República, 2014).
  79. Dwight, Z., Palais, R. & Wittwer, C. T. uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinformatics* **27**, 1019–1020 (2011).
  80. Blake, R. D. & Delcourt, S. G. Thermal stability of DNA. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3323–3332 (1998).
  81. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, (2002).
  82. Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **64**, 5245–5250 (2004).
  83. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**, e36 (2002).
  84. Suhara, H., Kodama, S., Kamei, I., Maekawa, N. & Meguro, S. Screening of selective lignin-degrading basidiomycetes and biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of bamboo culms. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **75**, 176–180 (2012).
  85. Borokhov, O. & Rothenburger, S. Rapid dye decolorization method for screening potential wood preservatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5457–5459 (2000).
  86. Gupta, S., Mittal, Y., Tamta, P., Srivastava, P. & Yadav, A. K. 4 - Textile wastewater treatment

- using microbial fuel cell and coupled technology: a green approach for detoxification and bioelectricity generation. in *Integrated Microbial Fuel Cells for Wastewater Treatment* (eds. Abbassi, R., Yadav, A. K., Khan, F. & Garaniya, V.) 73–92 (Butterworth-Heinemann, 2020).
87. Przysaś, W., Zabłocka-Godlewska, E. & Grabińska-Sota, E. Biological Removal of Azo and Triphenylmethane Dyes and Toxicity of Process By-Products. *Water, Air, Soil Pollut.* **223**, 1581–1592 (2012).
  88. Diaz-Muñoz, G., Miranda, I. L., Sartori, S. K., de Rezende, D. C. & Diaz, M. A. N. Chapter 11 - Anthraquinones: An Overview. in (ed. Atta-ur-Rahman) vol. 58 313–338 (Elsevier, 2018).
  89. Wright, P. & Staff, U. by. Xanthene Dyes. *Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol.* 1–19 (2014)
  90. Vennerstrom, J. L., Makler, M. T., Angerhofer, C. K. & Williams, J. A. Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2671–2677 (1995).
  91. Martinez, D. *et al.* Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.* **22**, 695–700 (2004).
  92. Wymelenberg, A. Vanden *et al.* Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. *Fungal Genet. Biol.* **43**, 343–356 (2006).
  93. Wymelenberg, A. Vanden *et al.* The *Phanerochaete chrysosporium* secretome: database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium. *J. Biotechnol.* **118**, 17–34 (2005).
  94. Arnaud, M. B. *et al.* The *Aspergillus* Genome Database (AspGD): recent developments in comprehensive multispecies curation, comparative genomics and community resources. *Nucleic Acids Res.* **40**, D653-9 (2012).
  95. Galagan, J. E. *et al.* Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105–1115 (2005).
  96. Xi, Y. *et al.* Removal of azo dye from aqueous solution by a new biosorbent prepared with *Aspergillus nidulans* cultured in tobacco wastewater. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **44**, 815–820 (2013).
  97. Sahay, S., Chaurse, V. & Chauhan, D. Laccase from *Aspergillus nidulans* TTF6 Showing Pb Activation for Smaller Substrates and Dyes Remediation in All Climates. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B - Biol. Sci.* **90**, 143–150 (2020).
  98. Asses, N., Ayed, L., Hkiri, N. & Hamdi, M. Congo Red Decolorization and Detoxification by *Aspergillus niger*: Removal Mechanisms and Dye Degradation Pathway. *Biomed Res. Int.* **2018**, 3049686 (2018).
  99. Calderón, J., Rossa Mattos, Ó. & Esteves Barcia, O. Analysis of the of cobalt open-circuit-potential behavior in a slightly alkaline media. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* 20–30 (2006).
  100. Sani, R. K. & Banerjee, U. C. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme Microb. Technol.* **24**, 433–437 (1999).
  101. Harkin, J. M., Larsen, M. J. & Obst, J. R. Use of Syringaldazine for Detection of Laccase in Sporophores of Wood Rotting Fungi. *Mycologia* **66**, 469–476 (1974).
  102. Ohm, R. A. *et al.* Genomics of wood-degrading fungi. *Fungal Genet. Biol.* **72**, 82–90 (2014).
  103. Fernández-Fueyo, E. *et al.* Structural implications of the C-terminal tail in the catalytic and stability properties of manganese peroxidases from ligninolytic fungi. *Acta Crystallogr. D.*

- Biol. Crystallogr.* **70**, 3253–3265 (2014).
104. Bronikowski, A., Hagedoorn, P.-L., Koschorreck, K. & Urlacher, V. B. Expression of a new laccase from *Moniliophthora roreri* at high levels in *Pichia pastoris* and its potential application in micropollutant degradation. *AMB Express* **7**, 73 (2017).
  105. Mot, A. C. & Silaghi-Dumitrescu, R. Laccases: Complex architectures for one-electron oxidations. *Biochem.* **77**, 1395–1407 (2012).
  106. Machczynski, M. C., Vijgenboom, E., Samyn, B. & Canters, G. W. Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Sci.* **13**, 2388–2397 (2004).
  107. Arregui, L. *et al.* Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb. Cell Fact.* **18**, 200 (2019).
  108. Nakamura, K. & Go, N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2050–2066 (2005).
  109. Dorak, M. *Real-time PCR*. (School of Clinical Medical Sciences (Child Health) Newcastle University, UK; Taylor & Francis Group, 2006).
  110. Castanera, R. *et al.* Non-additive transcriptional profiles underlie dikaryotic superiority in *Pleurotus ostreatus* laccase activity. *PLoS One* **8**, e73282 (2013).
  111. Ochoa-viñals, N., Faife-perez, E., Wei, D., Xuebing, Z. & Dehua, L. Evaluación del crecimiento de la levadura oleaginoso *R. toruloides* en presencia de inhibidores del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar. *ICIDCA. Sobre los Deriv. la Caña Azúcar* **50**, 50–53 (2016).
  112. Jönsson, L. J., Alriksson, B. & Nilvebrant, N.-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 16 (2013).
  113. Zhang, J. *et al.* Gene Regulation Shifts Shed Light on Fungal Adaption in Plant Biomass Decomposers. *MBio* **10**, e02176–19 (2019).
  114. Bettucci, L., Speranza, M., Piaggio, M., Sineriz, F. & Breccia, J. D. Degradation of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis* by several white-rot fungi isolated in South America. *Mater. und Org.* **32**, 227–233 (1998).
  115. Paszczyński, A., Huynh, V.-B. & Crawford, R. Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **29**, 37–41 (1985).
  116. Navarro, D. *et al.* Large-scale phenotyping of 1,000 fungal strains for the degradation of non-natural, industrial compounds. *Commun. Biol.* **4**, 871 (2021).
  117. Ghasemi, F., Tabandeh, F., Bambai, B. & Rao, K. R. S. S. Decolorization of different azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* RP78 under optimal condition. **7**, 457–464 (2010).
  118. Alderman, J. . Malachite green: a review. *J. Fish Dis.* **8**, 289–298 (1985).
  119. Papinutti, V. L. & Forchiassin, F. Modification of malachite green by *Fomes sclerodermeus* and reduction of oxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**, 205–209 (2004).
  120. Bumpus, J. A. & Brock, B. J. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1143–1150 (1988).
  121. Cha, C. J., Doerge, D. R. & Cerniglia, C. E. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4358–4360 (2001).
  122. Shary, S. *et al.* Differential Expression in *Phanerochaete chrysosporium* of Membrane-

- Associated Proteins Relevant to Lignin Degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7252–7257 (2008).
123. Syed, K. & Yadav, J. S. P450 monooxygenases (P450<sub>ome</sub>) of the model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Crit. Rev. Microbiol.* **38**, 339–363 (2012).
  124. Thuillier, A. *et al.* Transcriptomic Responses of *Phanerochaete chrysosporium* to Oak Acetonic Extracts: Focus on a New Glutathione Transferase. **80**, 6316–6327 (2014).
  125. Morel, M. *et al.* Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *Microb. Biotechnol.* **6**, 248–263 (2013).
  126. Martins, M. A. M., Ferreira, I. C., Santos, I. M. & Lima, N. Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **89**, 91–98 (2001).
  127. Zille, A. *et al.* Predicting dye biodegradation from redox potentials. *Biotechnol. Prog.* **20**, 1588–1592 (2004).
  128. López Díaz, C. Oxidación del tinte azo Orange II mediante MnP en reactores enzimáticos operados en continuo. (Universidad de Santiago de Compostela, 2005).
  129. Yang, X., Zheng, J., Lu, Y. & Jia, R. Degradation and detoxification of the triphenylmethane dye malachite green catalyzed by crude manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **23**, 9585–9597 (2016).
  130. Janusz, G., Kucharzyk, K. H., Pawlik, A., Staszczak, M. & Paszczynski, A. J. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* **52**, 1–12 (2013).
  131. Sundaramoorthy, M., Youngs, H. L., Gold, M. H. & Poulos, T. L. High-resolution crystal structure of manganese peroxidase: Substrate and inhibitor complexes. *Biochemistry* **44**, 6463–6470 (2005).
  132. Broda, P., Birch, P. R., Brooks, P. R. & Sims, P. F. PCR-mediated analysis of lignocellulolytic gene transcription by *Phanerochaete chrysosporium*: substrate-dependent differential expression within gene families. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2358–2364 (1995).

## 7. ANEXO

## 7.1 ANEXO 1

### 7.1.1 Estructura molecular de colorantes

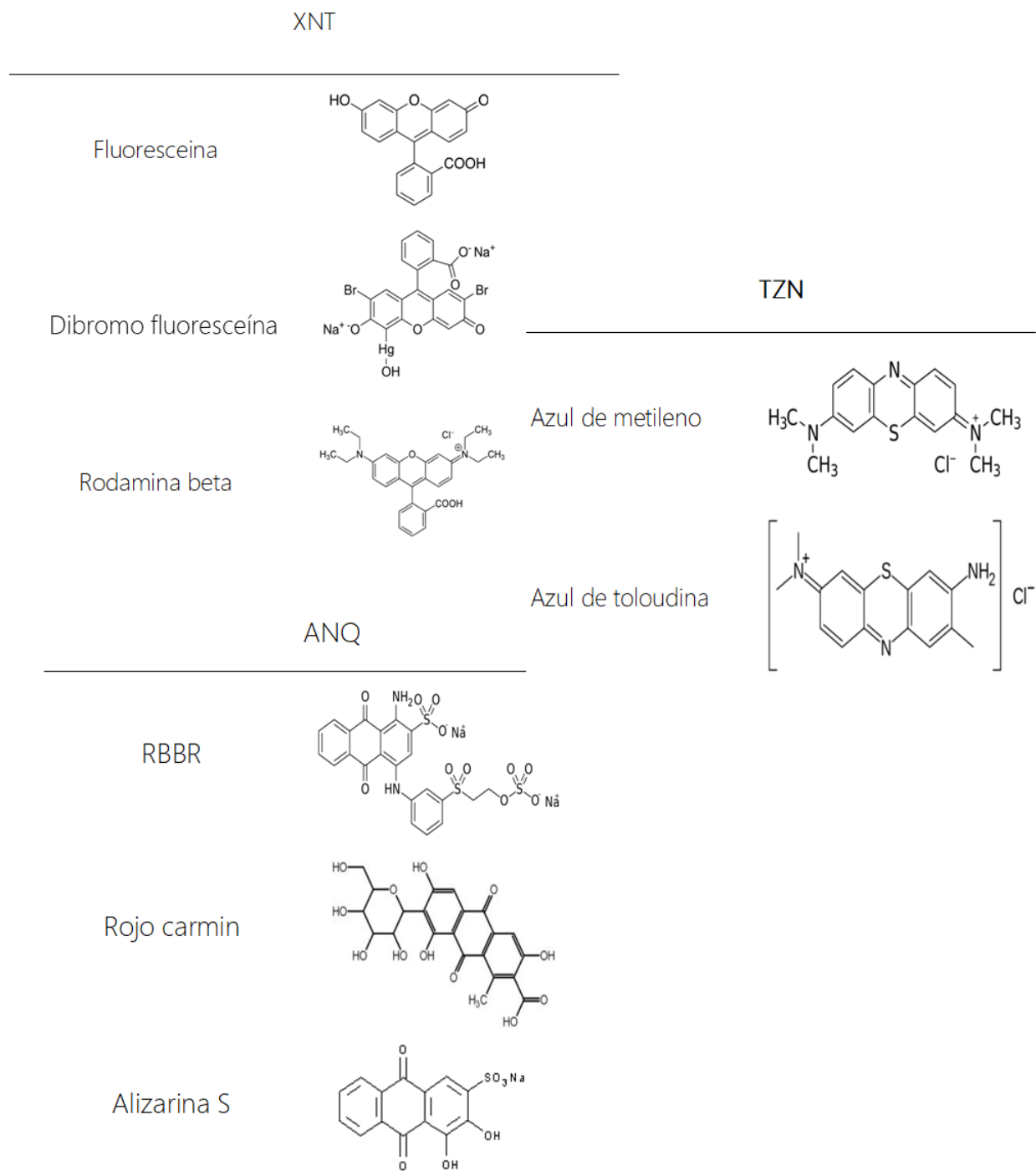


Figura A.1: Estructura molecular de colorantes tipo ANQ, TZN y XNT.

TFM

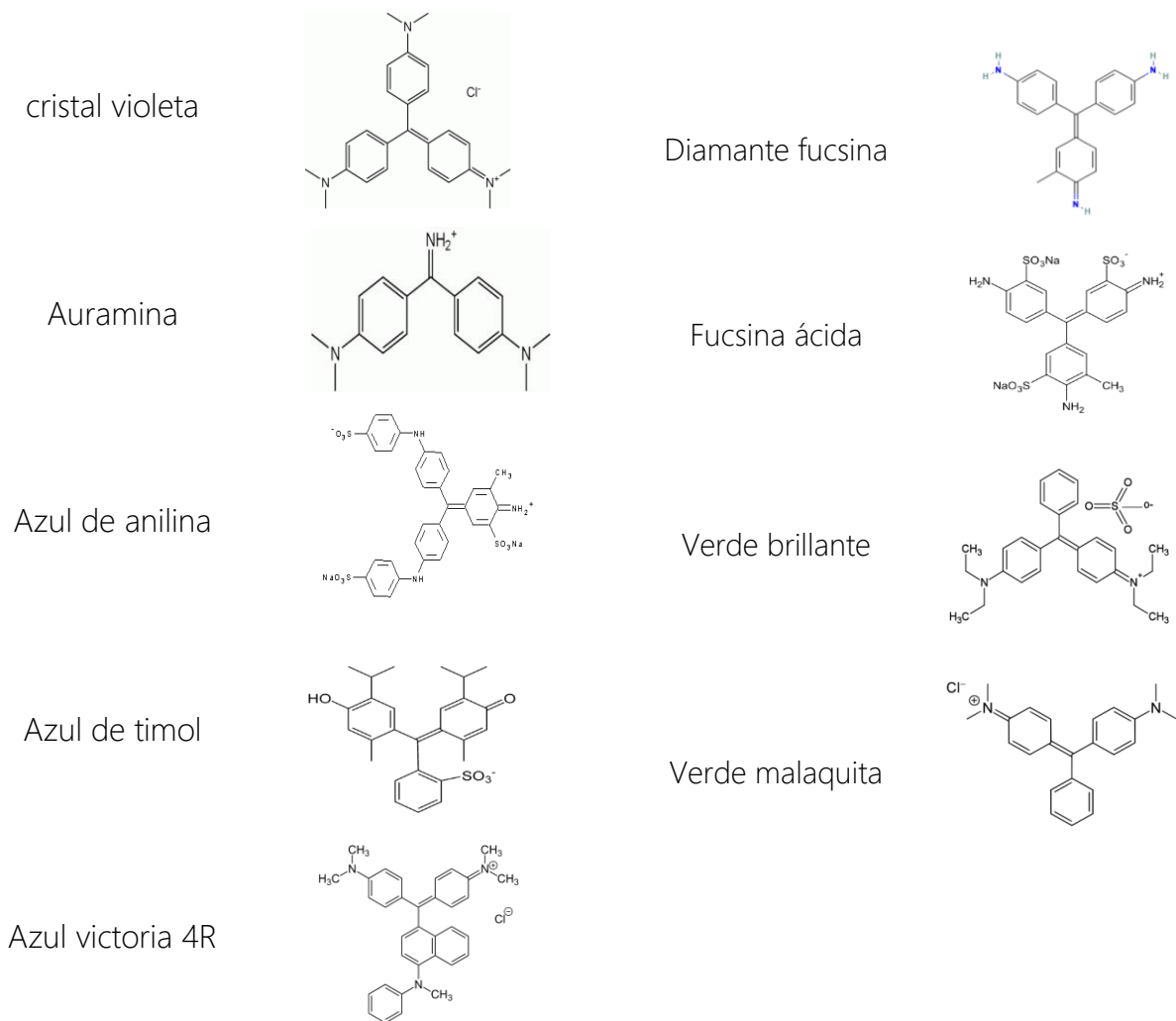


Figura A.2: Estructura molecular de colorantes tipo TFM.

AZO

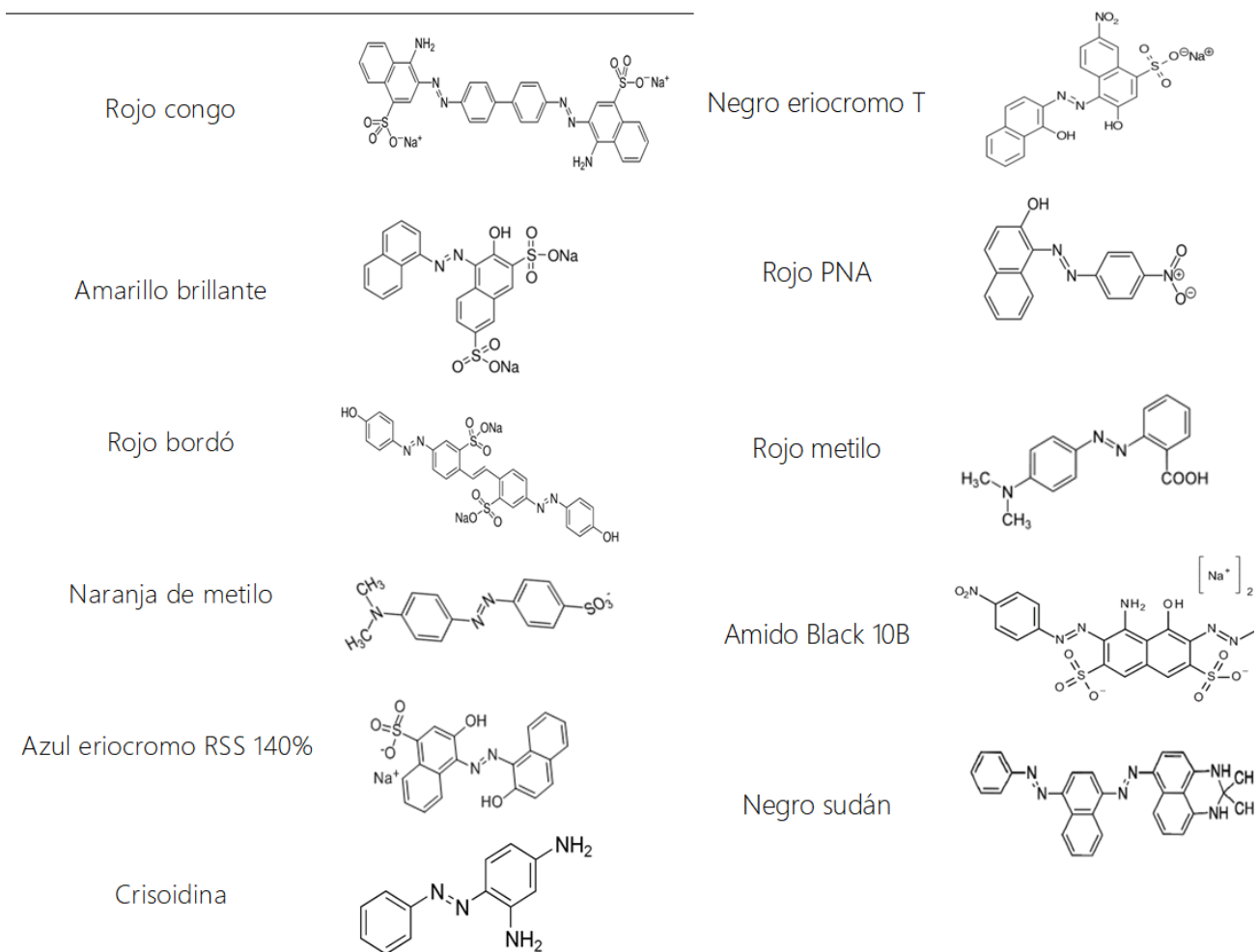


Figura A.3: Estructura molecular de colorantes tipo AZO.

## 7.1.2 Cinética de crecimiento

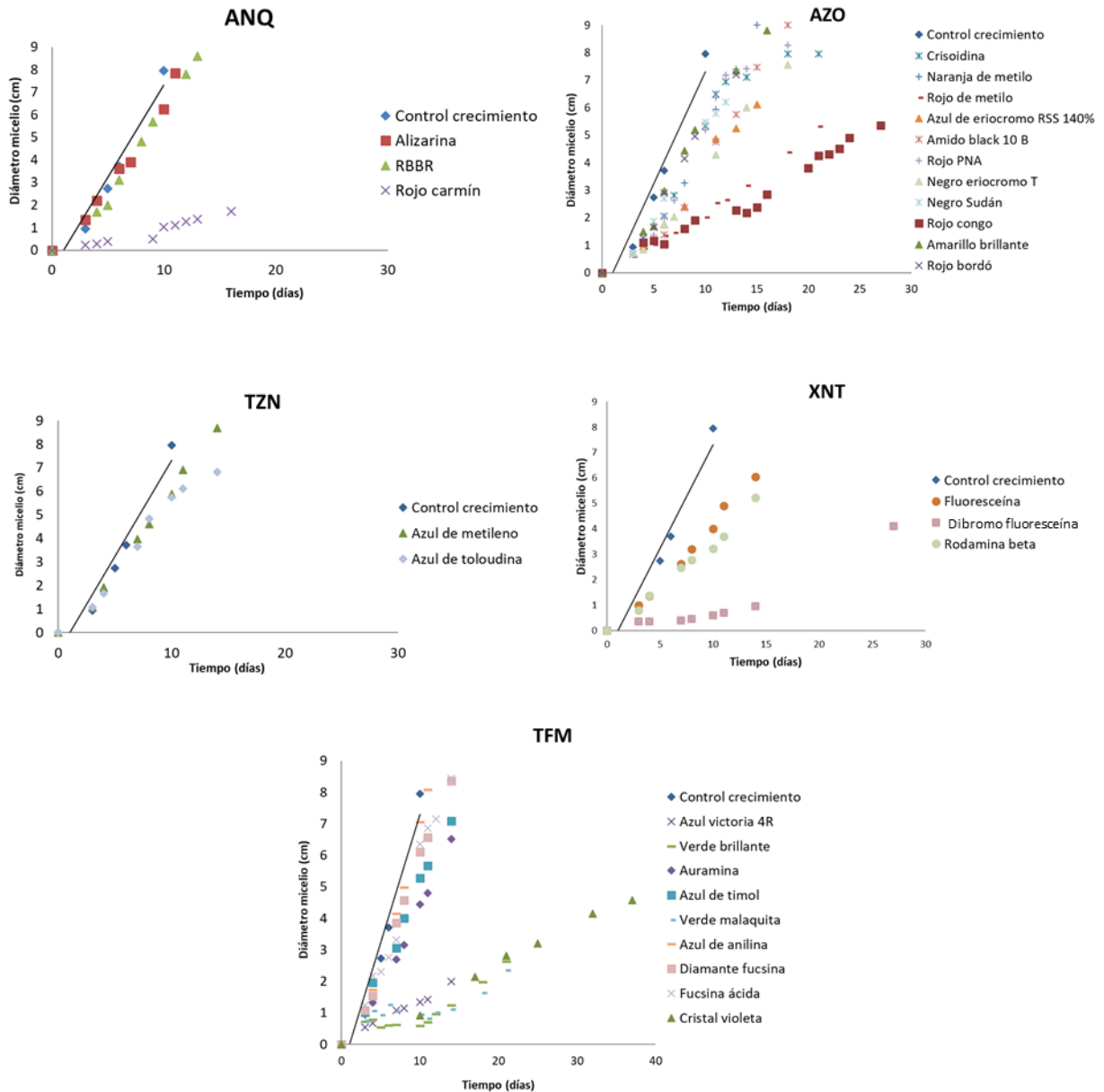


Figura A.4: Seguimiento del crecimiento del micelio de *P. atropurpurascens* en función de los días. Se evaluó el diámetro del micelio en crecimiento de *P. atropurpurascens* en medio sólido con 0,5% de extracto de malta (control crecimiento) y 150  $\mu\text{M}$  de colorante del grupo ANQ, AZO, TZN, XNT y TFM. La línea de tendencia ilustra la tendencia del crecimiento de *P. atropurpurascens* en medio sin colorante.

### 7.1.3 Cinética de decoloración

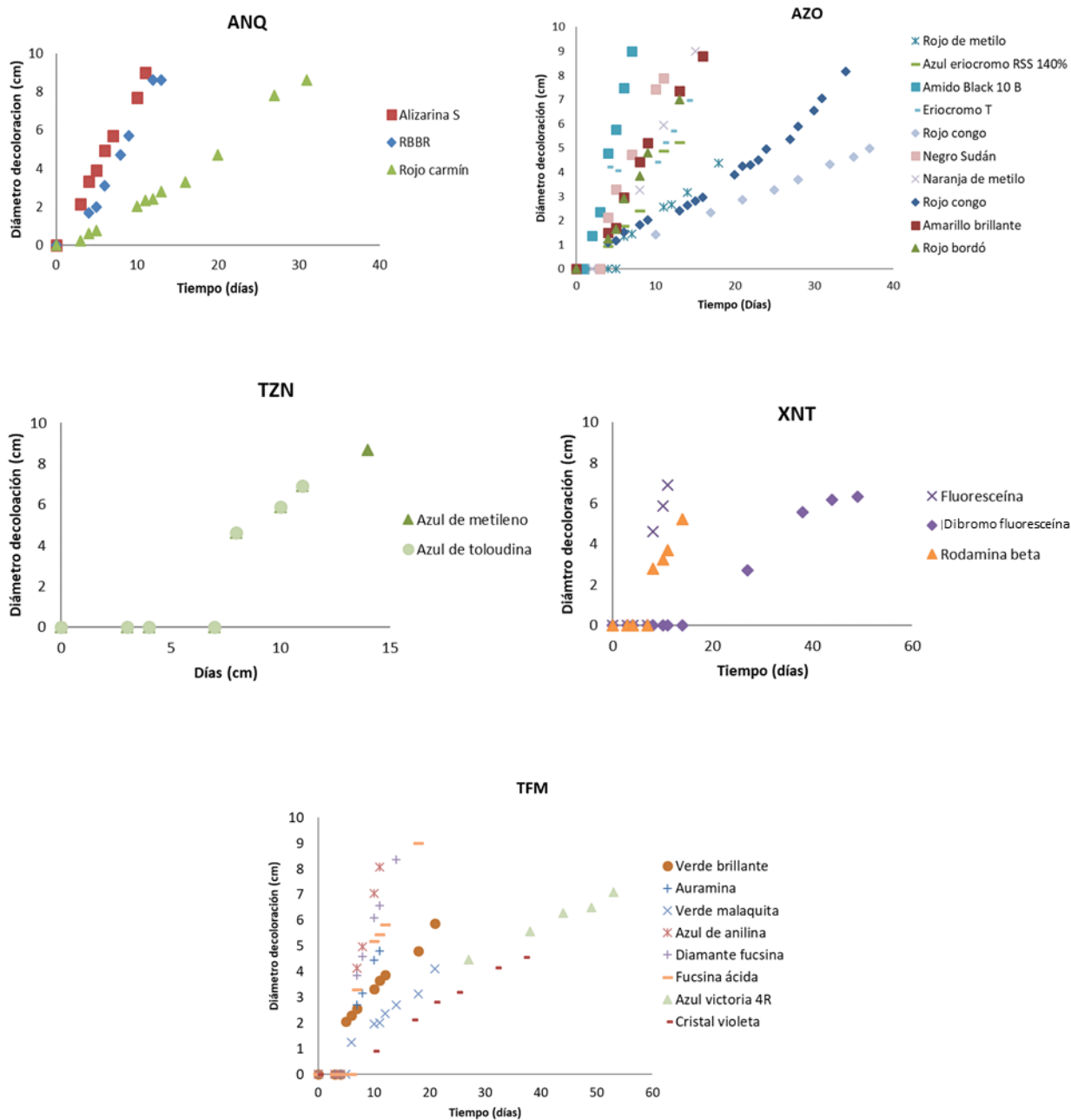
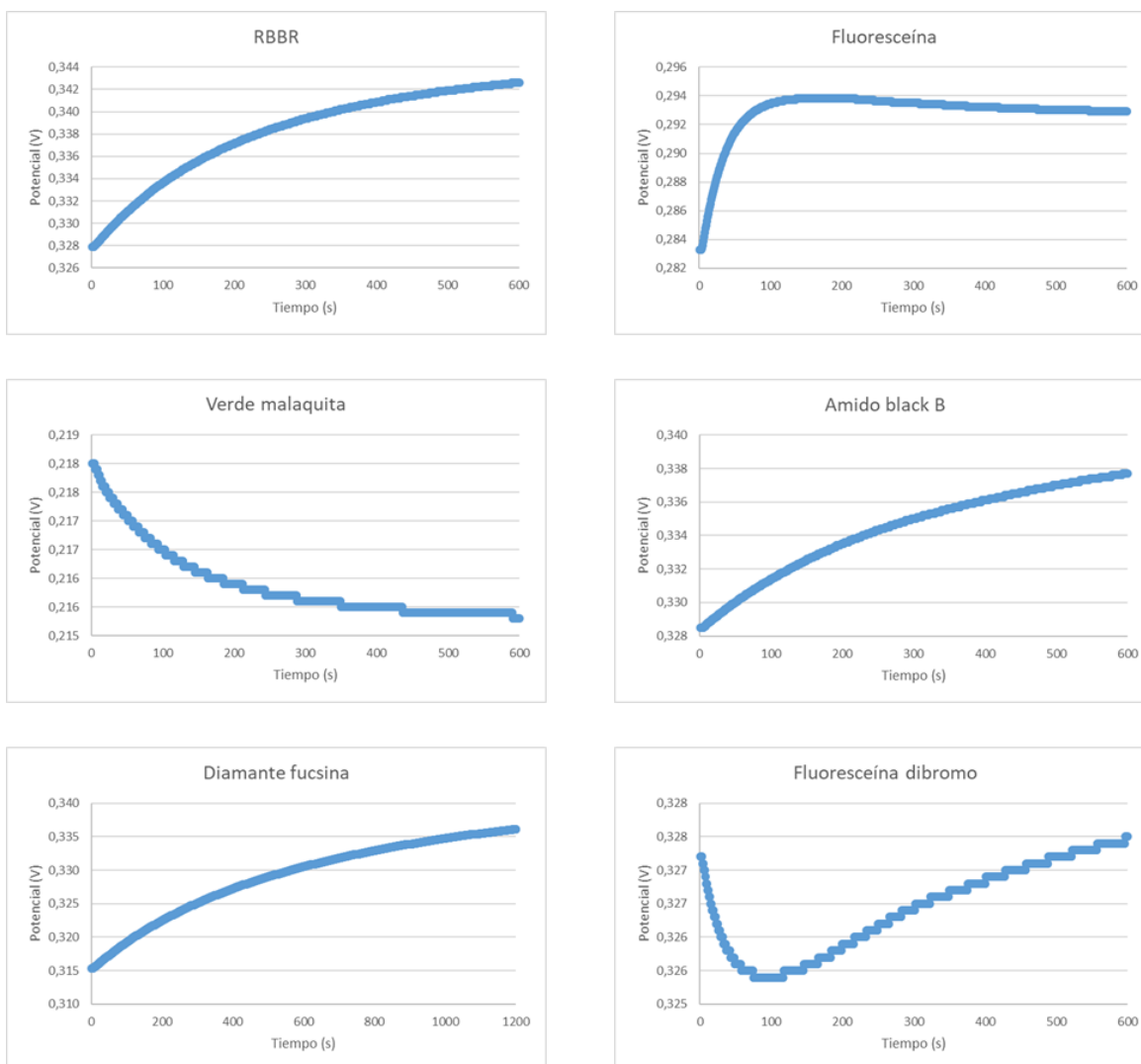


Figura A.5. Seguimiento de la decoloración de colorantes por *P. atropurpurascens* en función de los días. Se evaluó el diámetro del halo de decoloración generado por *P. atropurpurascens* en medio sólido con 0,5% de extracto de malta (control crecimiento) y 150  $\mu\text{M}$  de colorante del grupo ANQ, AZO, TZN, XNT y TFM.

### 7.1.4 Medidas de potencial electroquímico a circuito abierto



**Figura A6:** Medida de Potencial (V) a circuito abierto en función del tiempo (segundos) de 150  $\mu\text{M}$  de colorante en medio EM pH=5,6. La medida fue realizada en un sistema de tres electrodos a potencial abierto. El sistema estuvo conformado de dos electrodos de platino (auxiliar y de trabajo) y un electrodo de Ag/AgCl (electrodo de referencia).

## 7.2 ANEXO 2

### 7.2.1 Motivos conservados MnP

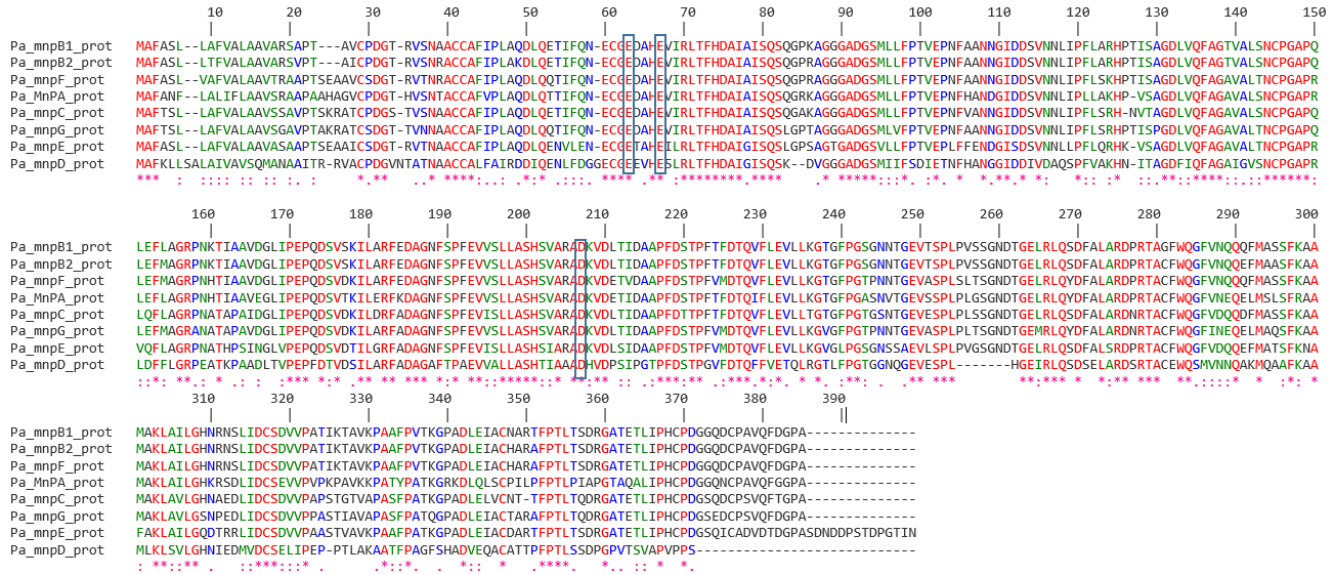


Figura A.7: Aminoácidos de unión a manganeso en MnP de *P. atropurpurascens* verificadas. Se resaltan Glu64, Glu68 y Asp207 en recuadro color azul, los cuales son motivos de unión típicos de Mn<sup>11</sup>.

### 7.2.2 Motivos conservados lcc

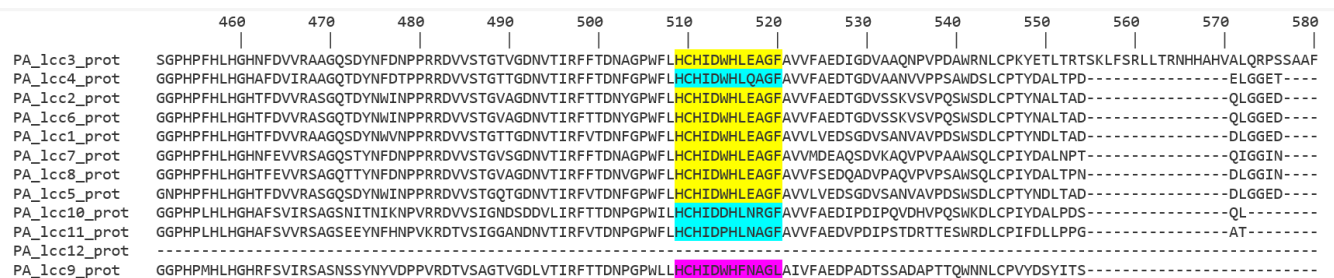


Figura A.8: Secuencias conservadas en Lcc. Se destacan en amarillo la secuencia HCHIDWHLEAGF. En turquesa, se destacan las secuencias que contienen el motivo HCH y fenilalanina en posición axial. En violeta se destaca la secuencia que contiene el motivo HCH y leucina en posición axial.

## 7.2.3 Secuencias genómicas, transcriptómicas y proteicas de *P.atropurpurascens*

### 7.2.3.1 Secuencias consenso manganeso peroxidadas

#### Secuencias MnP A:

>Pa\_mnpA\_cds

```
ATGGCGTTCGCAAATTTCTCGCTTTAATCTTTCTCGCGGCCGTCTCCCGTGCCGCGCCAGCTGCACATGCTGGCGTTTGT
CCTGACGGAACGCATGCTCGAACACCCGCTGCTGTGCCTTTGTGCCCTAGCGCAGGACCTTCAGACGACCATCTTCCAG
AACGAGTGTGGCGAAGATGCTCACGAGGTCATCCGTCACCTTCCACGATGCCATCGCCATATCCCAAAGTCAGGGTCGC
AAAGCGGCGGAGGCGCTGATGGCTCGATGCTGCTATCCCCACCGTCGAGCCTAACTTCCACGCAAACGACGGCATCGAC
GACTCGGTGAATAACCTCATCCCCCTCCTCGCTAAGCATCCTGTGAGCGCCGGCGATCTCGTCCAGTTTCGCCGGCGCAGTC
GCACCTCAGCAACTGCCCCGGTGCCCTCGCTCGAGTCTTGGCGGGTTCGGCCAAATCACACTATTGCGGCCGTGGAAGGA
CTCATCCAGAGCCACAAGACAGCGTCACAAAGATCCTTGAGCGGTTCAAGACGCGGCAACTTCTCGCCCTTCGAGGTC
GTCTCCCTCCTTGCCTCGCACAGCGTCGCCCCGCGCAGACAAGGTGGACGAGACGATCGACGCGGCTCCTTTCGATTGACA
CCATTACGTTTCGATAACCAGATCTTCTGGAGGTGCTGCTGAAAGGAACCGGGTTCGCCGCGCGTCGAACGTTACGGGG
GAAGTGTGCTCTCCTTTGCCACTGGGAAGCGGGAACGACGCGGCGAGCTGCGCCTGCAGTACGACTTCGCGCTCGCACGC
GATCCGCGCACCGCTTCTTGGCAGGGTTCGTGACGAGCAAGAATTGATGTCGCTCAGcttcagagcggcgatggcg
aagctcgcaatcctcggtcacaagcgcagcgacttgatcgactgctctgaggtggtgcccgggtgcccgaagcctgcccgtaaag
aagcccgcgacatACCCGGCCACGAAGGGTCGAAGGATCTGCAACTGTCGTGCCCATCTTACCCTTCCCCACCTTCCG
ATTGCACCCGGTACC GCCAGGCATTGATTCTCACTGTCCGGATGTTGGT CAGA ACTGTCCCGCTGTGCAGTTTCGGAGGC
CCGGCTTAG
```

>Pa\_mnpA\_gen

```
ATGGCGTTCGCAAATTTCTCGCTTTAATCTTTCTCGCGGCCGTCTCCCGTGCCGCGCCAGCTGCACATGCTGGCGTTTGT
CCTGACGGAACGCATGCTCGAACACCCGCTGCTGTGCCTTTGTGCCCTAGCGCATATATTCACGTACTGTATATATACGT
CCGATTGAAATCCCCCTTCTCTAGCTAGCGCAGGACCTTCAGACGACCATCTTCCAGAACGAGTGTGGCGAAGATGCTCAC
GAGGTTCATCCGTCGACCTTCCACGACGCCATCGCCATATCCCAAAGTCAGGGTCGCAAAGCGTATGCTGCTTTCTTTT
ACAGTGGTGCACGGAACTGATCTCTTCTATAGGGGCGGAGGCGCTGATGGCTCGATGCTGCTATTTCCACCGTCGAG
CCTAACTTCCACGCAAACGACGGGATCGACGACTCGGTGAATAACCTCATCCCTTCTCGCTAAGCATCCTGTTAGCGCC
GGCGATCTCGTCCAGTTTCGCCGCGCAGTCGCACTCAGCAACTGCCCGGTGCCCTCGGCTCGAGTTTTTGGCGGGTCGA
CCAAACCATACTATTGCGGCCGTGCAAGGCCTCATCCAGAGCCACAAGACAGCGTCACAAAGATCCTTGAGCGGTTCAAG
GACGCCGCAACTTCTCGCTTTTCGAGGTCGCTCCTCCTTGGCTCGCACAGCGTCGCCCCGCGCAGACAAGGTGGacgag
acgatcgacgcggtcctttcgattcgacaccattcagttcgataccagatcttctcgaggtgctGCTGAAAGGAACC
GGGTTCCCCGGCGCTCGAACGTTACGGGGGAGGTGTCGTCTCCTTTGCCACTGGGAAGCGGGAACGACACGGGCGAAATG
CGCTGCAGTCCGACTTCGCGCTCGCACGCGATCCGCGCACCCCTGCTTCTGGCAGGGGTTTCGTGAACGAGCAAGAATTG
ATGTCGTTCAAGcttcagagcggcgatggcgaagctcgcaatcctcggtcacaagcgcagcgacttgatcgactgctctgag
gtggtgcccgggtgcccgaagcctgcccgtaaagaagcccgcgacatACCCGGCCACGAAGGGTCGAAGGATCTGCAACTGTCG
TGCCCCATCTTACCCTTCCCCACCTTCCGATTGCACCCGGTACC GCCAGGCATTGATTCTCACTGTCCGGATGTTGGT
CAGA ACTGTCCCGCTGTGCAGTTTCGGAGGCCCGGCTTAG
```

>Pa\_MnPA prt

```
MAFANFLALIFLAAVSRAAPAAHAGVCPDGHVSNTACCAFVPLAQDLQTTIFQNECGEDAHEVIRLTFHDAIAISQSQGR
KAGGGADGSMMLFPTEPNFHANDGIDDSVNNLIPLLAKHPVSAGDLVQFAGAVALSNCPPAPRLEFLAGRPNHTIAAVEG
LIPEPQDSVTKILERFKDAGNFSFFEVSLLASHSVARADKVDETIDAAPFDSTPFTFDTQIFLEVLLKGTGFPASNVTG
EVSSPLPLGSGNDTGELRLQYDFALARDPRTACFWQGFVNEQELMSLSFRAAMAKLAILGHKRSDLIDCSEVVPVPAVK
KPATYPATKGRKDLQLSCPILPFTLPIAPGTAQALIPHCPDGGQNCNPAVQFGGPA
```

#### Secuencias MnP B1:

>Pa\_mnpB1\_cds

```
ATGGCTTTCGCGTCCCTCCTCGCTTTCGCTCGCTCTCGCGCCGCTTGCAGCTTACCGCGGCTTGCCTCGGACGGC
ACCCGCGTCAGCAACGCGGCTGCTGCGGTTTCATCCCGCTCGCCAGGATCTCCAGGAGACCATCTTCCAAAATGAGTGC
GGCGAAGATGCCACGAGGTCATCCGTTTGACCTTCCACGATGCCATCGCCATCTCCAGAGCCAGGGTCCCAAGCCGGC
GGAGGCGCTGACGGATCCATGCTCCTTTCCCGACCGTCGAGCCAACTTCCGCCCAACAACGGTATTGACGACAGCGTC
AACAACCTTATTCCGTTCTCGCTCGCCACCAACGATCAGCGCCGGTGACCTCGTCCAGTTTGTGGAACCGTCGCGCTT
AGTAACTGCCCCGGCGCGCCAGCTCGAGTCTTGGCTGGACGGCCAAACAAGACGATCGCAGCAGTTCGATGGGCTGATC
CCGGACCCGACGAGACCGGTGTCGAAGATCCTCGCGGTTTCGAGGATGCCGTTAACTTCTCGCCGTTTGAGGTCGCTCT
CTCCTCGCTCTCATTCGGTTGCTCGCGGACAAGGTTGACTTGACGATCGACGCTGCTCCTTTCGACTCGACGCGGTTT
```

ACCTTCGACACCCAGGTCTTCTCGAGGTACTCCTCAAGGGCACC GGCTTCCCCGGCTCGGGCAACAACACCGGCGAGGTC  
ACCTCCCTCTCCCGTCAGCAGCGGCAACGACACTGGCGAGCTCCGCTCCAATCCGACTTCGCACTCGCCCGGACCCG  
CGGACCGCGGGCTTCTGGCAAGGGTTCGTGAACCAGCAGCAGTTTCAATGGCCCTCGAGCTTCAAGGCGCGGATGGCCAAGCTC  
GCGATCCTCGGCCACAACCGCAACTCGTTCATCGACTGCTCGAGCTCGTCCCGCCACGATCAAGACGGCTGTGAAGCCT  
GCGGCGTTCCCGGTGACGAAGGGTCTGCCGACCTCGAGATCGCCTGCAACGCGCGCACGTTCCCCACCCTACCAGCGAC  
CGCGGCGTACCGAGACTCTCATCCCTCACTGCCCCGACGGCGGCCAGGATTGCCCTGCCGTCCAGTTTCGATGGTCCGGCT  
TAA

>Pa\_mnpB1\_gen

ATGGCTTTCGCGTCCCTCCTCGCCTTCGTCGCTCTCGCCGCGGTTGCGCGCTCTGCACCTACCGCGGTCTGCCCGGACGGC  
ACCCGCGTCAGCAACGCGGCTGCTGCGGTTTATCCCGCTCGCCAGGATCTCCAGGAGACCATCTTCCAAAATGAGTGC  
GGCGAAGATGGTAAGCGTGTTCCTGATTTCAACCCCTACAACCTCAGTAGCTTACTCTGTTTACCAGCCCACGAGTTCAT  
CCGTTTTCGACTTCCACGATGCCATCGCCATCTCCCAGAGCCAGGGTCCCAAGGCCGCGGAGGCGTGCAGGATCCATGCT  
CCTTTTCCCGACCGTTCGAGCCAACTTCGCCGCAACAACGGTATTGACGACAGCGTCAACAACCTTATTCCGTTCTCGC  
TCGCCACCAACGATCAGCGCCGGTGACCTCGTCCAGTTTGTGGAACCGTTCGCGCTTAGTAACGCCCCGGCGGCCCA  
GCTCGAGTCTTGGCTGGACGGCCCAACAAGACGATCGCAGCAGTCGATGGGCTGATCCCGGAGCCGAGGACAGCGTGT  
CAAGATCCTCGCGGTTTCGAGGATGCCGGTAACCTTTCGCGGTTTTCGAGGTCGTTCTCTCCTCGCCTCTCATTCGGTTGC  
TCGCGCGGACAAGTTGACTTGACGATCGACGCTGCCTTCGACTCGGTTCAGTACTTCTATTCTGTAATCCGGCAGAAA  
ACACGACGCTGACTTTGCGTATCTCAGACGCGGTTCACTTCGACACCCAGGTCCTCCTCGAGGTACTCCTCAAGGGCACC  
GGCTTCCCGGCTCGGGCAACAACACCGGCGAGGTCACTCCCTTCCCGCTCAGCAGCGGCAACGACACTGGCGAGCTC  
CGCCTCCAATCCGACTTCGCACTCGCCCGGACCCGCGGACGGCGTCTTTCGGAAGGGTTCGTGAACCAGCAGCAGTTC  
ATGGCTTCGAGCTTCAAGGCGGCGATGGCCAAGCTCGGATCCTCGGCCACAACCGCAACTCGCTCATGACTGCTCGGAC  
GTCGTTCCCGCAGATCAAGACGGCTGTGAAGCCTCGCGGTTCCCGGTGACGAAGGGTCTGCCGACCTCGAGATCGCC  
TGCAACGCGCGCACGTTCCCCACCCTCACCAGCGACCGTAAGTGTCAACATCTTCCGTGCATAGGGGGTTCTTGTGACG  
CGGCTGTCTTGTCCAGGCGGCGCTACCGAGACTCTCATCCCTCACTGCCCCGACGGCGGCCAGGATTGCCCTGCCGTCC  
AGTTTCGATGGTCCGGCTTAA

>Pa\_MnPB1\_prot

MAFASLLAFVALAAVARSAPTAVCPDGTTRVSNAAACAFIPLAQDLQETIFQNECGEDAHEVIRLTFHDAIAISQSQGPKAG  
GGADGSMMLLFTPEPNFAANNIDDSVNNLIPFLARHPTISAGDLVQFAGTVALSNCPGAPQLEFLAGRPNKTI AAVDGLI  
PEPQDSVSKILARFEDAGNFSPEFVVLLASHSVARADKVDLTI DAAFPDSTPFTFDQVFLVLLKGTGFP GSGNNTGEV  
TSPLPVSSGNDTGE LRQLQSDFALARDPRTAGFWQGFVNQQQFMASSFKAAMAKLAILGHNRNSLIDCSDVVPATIKTAVPK  
AAFPVTKGFADLEIACNARTFPTLTS DRGATETLIPHCPDGGQDCPAVQFDGPA

## Secuencias MnP B2:

>Pa\_mnpB2\_cds

ATGGCTTTCGCGTCCCTCCTGACCTTCGTCGCTCTTGGCGCTGTTGCGCGCTCTGTGCCACCGCCATCTGCCCGGACGGC  
ACCCGGTTCAGCAACAGGGCATGCTGCGGTTTATCCCACTTGCCAAGGATCTCCAGGAGACCATCTTCCAAAACGAGTGT  
GGCGAAGATGCTCATGAGGTTCATCCGCTGACCTTCCACGACGCCATCGCCATCTCCAGAGCCAGGGCCCCAGGGCCGGC  
GGAGGCGCCGACGGATCCATGCTCCTTCCCAACCGTTCGAGCCAACTTTGCCGCAACAACGGTATCGACGACAGCGTTC  
AACAATCTTATTCCGTTCTCGCTCGTCAACCGACGATCAGCGCCGGTTCGCTTCAGTTTCGCTGGCACCCTTGCCTT  
AGCAACTGCCCGGCGCTCCCAACTTGAGTTTCATGGCTGGACGGCCCAACAAGACGATCGCGGCGTTCGACGGTCTGATC  
CCAGAGCCGAGGACAGCGTGTCAAAGATCCTCGCGGTTTCGAGGACGCGGCAACTTCTCGCCGTTTCGAAGTCTGTTTCT  
CTCCTTGCTCTCACTCGGTTGCTCGCGCCGACAAGTTGACTTGACCATCGACGCTGCTCCCTTCGACTCCACGCGGTTTC  
ACCTTCGACACTCAGGTGTTCTCCTCGAGGTCTCCTCAAGGGCACCGGCTTCCCGGCTCGGGCAACAACACTGGCGAGGTC  
ACCTCCCGCTCCCGTTCAGCAGCGGCAACGACACTGGCGAGCTGCGCTCCAATCCGACTTTGCGCTCGCCCGGACCCG  
CGGACGGCGTCTTTCGGAAGGATTCGTGAACCAGCAAGAGTTTCATGGCGGCGAGCTTCAAGGCGGCGATGGCGAAGCTC  
GCGATCCTCGGCCACAACCGCAACTCGCTCATCGACTGCTCGGACGTCGTTCCCGCCACGATCAAGACGGCTGTGAAGCCT  
GCGGCGTTCCCGGTGACGAAGGGCCCTGCCGACCTCGAGATCGCCTGCCACGCCAGGGCGTTCCCCACCCTTACCAGCGAC  
CGTGGTGTACTGAGACCCTCATCCCTCACTGCCCCGACGGCGGCCAGGATTGCCCTGCTGTTTCAGTTTCGACGGCCCGGCA  
TAA

>Pa\_mnpB2\_gen

ATGGCTTTCGCGTCCCTCCTGACCTTCGTCGCTCTTGGCGCTGTTGCGCGCTCTGTGCCACCGCCATCTGCCCGGACGGC  
ACCCGGTTCAGCAACAGGGCATGCTGCGGTTTATCCCACTTGCCAAGGATCTCCAGGAGACCATATTCAAAACGAGTGT  
GGCGAAGATGGTAAGCGCATTGCTCGTTGCTGATCTTTGATTTCATGGGCTCACGTCGTTTCTACTAGCTCATGAGTTCAT  
CCGGTTCGACTTCCACGACGCCATCGCCATCTCCAGAGTCAGGGCCCCAGGGCCGCGGAGGCGCCGATGGCTCCATGCT

CCTCTTCCCCACCGTCGAGCCAACTTTGCCGCCAAACAACGGTATCGACGACAGCGTCAACAATCTTATTCGGTTCCTCGC  
TCGTACCCCGACGATCAGCGCCGGTGACCTCGTTTCAGTTTCGCTGGCACCGTTGCGCTTAGCAACTGCCCCGGCGCTCCCCA  
ACTTGAGTTTACGGCTGGACGGCCCAACAAGACGATCGCGGCCGTCGACGGTCTGATCCCAGAGCCCGCAGGACAGCGTGTG  
GAAGATCCTCGCGCTTCGAGGACGCGGCAACTTTCGCCGTTTGAAGTCGTTTCTCTCGCCTCTCACTCGGTTGC  
CCGCGCGGACAAGGTTGACTTGACGATGACGCTGCTCCCTTCGACTCCGTCGAGCGCATCTGTGTTTGGATCACAAAAGAC  
AATACTCATTGCTCCTCGTTCATAGACGCGGTTACCTTCGACACCCAGGTCTTCTCGAGGTCCTCTCAAGGGCACCGG  
CTTCCCCGGCTCGGGCAACAACACCGGCGAGGTACCTCCCCTCTCCCCGTGAGCAGCGGCAACGACTGGCGAGCTCCG  
CCTCCAATCCGACTTTGCGCTCGCCCCGACCCGCGGACGGCGTCTCTGGCAAGGTTTCGTGAACCAGCAAGAGTTCAT  
GGCGCGAGCTTCAAGGCGGCGATGGCCAAGCTCGCGATCCTCGGTCAACCCGCAACTCGCTCATCGACTGCTCGGACGT  
CGTCCCCGCCACGATCAAGGCGGCTGTGAAGCCTGCGGCGTTCGCCGTGACGAAGGGCCCTGCCGACCTCGAGATCGCCTG  
CCACGCCAGGGCTCCCCACGCTTACCAGCGACCGTACGTTGAATCGCACTCTGGATTGATTTCTCCTGACACTTG  
GATCCTAATCAGGTGGTGTACTGAGACCCTCATCCCTCACTGCCCCGACGGCGGCCAGGACTGCCCTGCTGTTTCAGTTTCG  
ACGGCCCCGCATAA

>Pa\_MnPB2\_prot

MAFASLLTFVALAAVARSVPPTAICPDGTRVSNRACCAFIPLAKDLQETIFQNECGEDAHEVIRLTFHDAIAISQSQGPRAG  
GGADGSMMLFPPTVEPNFAANNIGDDSVNNLIPFLARHPTISAGDLVQFAGTVALSNCPGAPQLEFMAGRPNKTIAAVDGLI  
PEPQDSVSKILARFEDAGNFSPEFVVLLASHSVARADKVDLTI DAAPFDSTPFTFDQVFLVLLKGTGFPGSGNNTGEV  
TSPLPVSSGNDTGLRLQSFALARDPRTACFWQGFVNQEFMAASFKAAMAKLAILGHNRNSLIDCSDVVPATIKTAVKP  
AAFPVTKGFPADLEIACHARAFPTLTSDRGATETLIPHCPDGGQDCPAVQFDGPA

## Secuencias MnP C:

>Pa\_mnpC\_cds

ATGGCTTTCACCTCTCTCCTCGCCTTTGTGCGCACTCGCTGCTGTTTTCGAGCGCGGTGCCGACCTCCAAGCGTGCTACGTGC  
CCTGACGGCTCCACCGTCAGCAATGCCGATGCTGCGCTTTCATCCACTTGCTCAGGATCTCCAAGAGACCATTTCCAG  
AACGAGTGTGGCGAGGATGCTCACGAGGTCATTCGTCGACTTCCACGACGCCATTGCTATCAGCCAAAGCCAAGGTGCC  
AAGGCTGGCGGCGAGCCGACGGTTCGATGCTCTTGTTCGCGACAGTTGAGCCCAACTTCGTGGCCAACAACGGTATCGAC  
GACAGCGTGAACAACCTTGATCCCTTCTCTCGAGGACAACGTACCGCAGGCGATCTGTCCAGTTCGCGGCGCGCTC  
GCCCTCAGCAACTGTCGGGTGCACCCAGCTTCAGTTCCTTTCGCGGCGCCCAATGCCACCGCTCCCGCCATTGATGGC  
CTCATCCCCGAGCCTCAGGACAGCGTCGACAAGATCCTCGACCGTTCGCGGATGCCGGCAACTTCTCGCCTTTCGAGGTT  
ATCTCGCTCCTGGCCTCGCACAGCGTTGCTCGTGGGACAAGGTGACCTGACCATTGACGCCGCCCTTCGACACCACA  
CCCTTACCTTCGACACCCAGGTGTTCTCGAGGTGCTGCTACCCGTACCGGTTTCCCAGGAACCCGACGCAACCCGGT  
GAGGTCGAGTCACCCCTGCCGCTCTCCAGCGCAACGACACCGGCGAACTCCGTCTCCAGTCCGACTTTGCGCTCGCCCGC  
GACAATCGTACGGCTGCTTCTGGCAAGGATTTCGTCGATCAGCAGGACTTCATGGCGAGCAGCTTCAAGGCCGCCATGGCC  
AAGCTCGCGCTCCTCGGCCACAACGCCGAGGACCTGATCGATTGCTCCGACGTCGTACCGGCGCCAGCACGGGCAGGTT  
GCACCCGCTCCTTCCCTGCTACCAAGGGTCTGCGAGCCTCGAGCTCGTCTGCAACACCACCTTCCCGACGCTCACCAG  
GATCGTGGTGTACTGAGACGCTCATCCCCATTGCCCCGACGGCAGCCAGGACTGCCCTCCGTGCAGTTCACTGGCCCG  
GCATAA

>Pa\_mnpC\_gen

ATGGCTTTCACCTCTCTCCTCGCCTTTGTGCGCACTCGCTGCTGTTTTCGAGCGCGGTGCCGACCTCCAAGCGTGCTACGTGC  
CCTGACGGCTCCACCGTCAGCAATGCCGATGCTGCGCTTTCATCCACTTGCTCAGGATCTCCAAGAGACCATTTCCAG  
AACGAGTGTGGCGAGGATGGTAAGACCCGTCCTCATAACCATGCAATAGCCATCGTTAATGAGTGCGCCACTTAGCTCACGA  
GGTCATTCGTCGACTTCCACGACGCCATTGCTATCAGCCAAAGCCAAGGTGCCAAGGCGTAAGTGATATTTTTTACGCC  
GCTACATGCGCATTGCTGACACACCCAAAGTGGCGGCGGAGCCGACGGTTCGATGCTCTTGTTCGCGACAGTTGAGCCC  
AACTTCGTGGCCAACAACGGTATCGACGACAGCGTGAACAACCTTGATCCCTTCTCTCGAGGACAACGTACCCGACGGC  
GATCTTGTCCAGTTCGCCGGCGCAGTGCCTTCAGCAACTGTCGGGTGCACCACAGCTTCAGTTCCTTTCGCGGCGCCCC  
AATGCCACCGCTCCCGCCATTGATGGCCTCATCCCGGAGCCTCAGGACAGCGTCGACAAGATCCTCGACCGTTTCGCGGAT  
GCCGGCAACTTCTCGCCTTTCGAGGTTATCTCGCTCCTGGCCTCGCACAGCGTTGCTCGTGGGACAAGGTGACCTGACC  
ATTGACGCCGCCCTTCGACACCGTAAGTTCGTTCAAACATATACTACACATGCATTGACTCACAATTTATCTCTCTCTG  
CAGACACCTTACCTTCGACACCCAGGTGTTCCCTCGAGGTGCTGCTACCGGTACCGGTTTCCCAGGAACCGGCAGCAAC  
ACCGGTGAGGTCGAGTCAACCCTGCCGCTCTCCAGCGCAACGACACCGGCGAGCTCCGTCTCCAGTCCGACTTCGCGCTC  
GCCGCGACAATCGTACGGCTGCTTTCGGCAAGGATTTCGTCGATCAGCAGGACTTCATGGCGAGCAGCTTCAAGGCCGCC  
ATGGCCAAGTTCGCGCTCCTCGGCCACAACGCCGAGGACTGATCGATTGCTCCGACGTCGTACCGGCGCCAGCACGGGC  
ACGGTTGCACCCGCTCCTTCCCTGCTACCAAGGGTCTTCGAGACCTCGAGCTCGTCTGCAACACCACCTTCCCGACGCTC  
ACCCAGGATCGTGAGTATATAATCTATTTGTTCGCAATTACTTGATGTTGATAACGTTTCGAGGTGGTGTACTGAGACGC  
TCATCCCCATTGCCCCGACGGCAGCCAGGACTGCCCTCCGTGCAGTTCACTGGCCCGGCATAA

>Pa\_MnPC\_prot

MAFTSLLAFLVALAAVSSAVPTSKRATCPDGVSTVSNACCAFIPLAQDLQETIFQNECGEDAHEVIRLTFHDAIAISQSQGA  
KAGGGADGSMMLFPPTVEPNFVANNGI DDSVNNLIPFLSRHNVTAGDLVQFAGAVALSNCPPGAPQLQFLAGRPNATAPAIDG

LIPEPQDSVDKILDRFADAGNFSPEFVISLLASHSVARADKVDLTIIDAAFDDTTPFTFDTQVFLEVLLTGTGFPGTGSNTG  
EVESPLPLSSGNDTGE LRLQSDFALARDNRTACFWQGFVDQQDFMASSFKAAMAKLAVLGHNAEDLIDCSDVVPAPSTGTV  
APASFPAKGPADLELVCNTTFPTLTQDRGATETLI PHCPDGSQDCPSVQFTGPA

## Secuencias MnP D:

>Pa\_mnpD\_cds

ATGGCCTTCAAGCTCCTCTCTGCTCTTGTCTATCGTCGCGGTCTCGCAGATGGCCAACGCTGCGATCACCCGCCGTGTTGCC  
TGCCCCGACGGCGTTAACTGCGACGAACGCGGCTTGTGCGCGCTGTTGCGGATCCGCGACGACATCCAGGAGAACCTC  
TTCGACGGCGGCGAGTGTGGCGAGGAAGTTCACGAGTCTCTTCGCTCACCTTCCACGATGCCATCGGTATCTCCAGTCT  
AAGGATGTTGGCGGTGGTGGCGACGGTCTATGATTATCTTTTTCAGATATCGAGACTAACTTCCATGCGAACGGTGGTATT  
GACGACATCGTCGACGCCAGTCCGCTTTCGTCGCCAAGCACAACATCACGGCCGGCGACTTCATACAATTCGACGGCGCT  
ATTGGCGTCTCAACTGCCCCGGCGCTCCGCGCCTCGACTTTTTCTTGGTTCGCCCCGAGGCCACCAAGCCCGCCGGCAT  
CTGACCGTCCCGGAGCCCTTCGACACTGTGGACTCCATCTGGCCCGCTTCGCGGACGCGAGGTGCCTTACTCCCGCCGAG  
GTTGTCCCTCTCCTCGCGTCGCATACCATTGCGGCTGCAGACCAGTCGACCCTAGCATTCCCGGCACGCCATTTCGATTCT  
ACCCCTGGCGTGTTCGACACCCAATTCCTGTCGAGACCCAGCTCCGCGGCACGCTGTTCCCGGCACCGCGGGGAACAG  
GGCGAGTGCAGTCCCTTGCATGGCGAGATCCGCTCCAGTCCGACTCGGAGCTCGCCCGGACTCGCGCACGGCGTGC  
GAGTGGCAGAGCATGGTGAATAACCAGGCGAAGATGCAGGCAGCGTTCAAGGCGGCGATGCTCAAGCTGTCCGTGCTTGGC  
CACAACATCGAGGACATGGTGGACTGCTCCGAGCTCATCCCCGAGCCGCGACGCTCGCGAAGGCTGCTACTTTCCCGGCT  
GGCTTACGCCACGCCGACGTTGAGCAGGCCCTGCGCGACGACGCTTTCCCAACCTTTCCTCTGACCCTGGTCCAGTCACT  
TCCGTTGCCCGGTCCCCCTTCCCTAA

>Pa\_mnpD\_gen

ATGGCCTTCAAGCTCCTCTCTGCTCTTGTCTATCGTCGCGGTCTCGCAGATGGCCAACGCTGCGATCACCCGCCGTGTTGCC  
TGCCCCGACGGCGTTAACTGCGACGAACGCGGCTTGTGCGCGCTGTTGCGGATCCGCGACGACATCCAGGAGAACCTC  
TTCGACGGCGGCGAGTGTGGCGAGGAAGTTCACGAGTCTCTTCGCTCACCTTCCACGATGCCATCGGTATCTCCAGTCT  
AAGGATGAAGACTTTCATACGTTCAATAGGTTGATGATGCTTATCAAAATTGTCAACAGTGTGGCGGTGGTGGCGACGGT  
CTATGATTATCTTTTTCAGATATCGAGACTAACTTCCATGCGAACGGTACGTCGTTCTATATTGGTGGTTATTGATTGACT  
GATCTTCTGACGGTGGTATTGACGACATCGTCGACGCCAGTCCGCTTTCGTCGCCAAGCACAACATCACGGTGGCGAC  
TTCATACAGTTCGACGGCGCTATTGGCGTCTCAACTGCCCGGGCGCTCCGCGCCTCGACTTTTTCTTGGTTCGCCGGAG  
GCCACCAAGCCCGCCGGCATCTGACCGTCCCGGAGCCCTTCGACACTGTGGACTCCATCCTGGCAGCTTCGCGGACGCA  
GGTGGCTTACTCCCGCGGAGGTTCGCTCTCCTCGCGTCGCATACCATTGCGGCTGCCGACCAGTCGACCCCTAGCATT  
CCCGGCACCGCGGGAAACAGGGCGAGTCCGCTTGCATGGCGAGATCCGCTCCAGTCCGACTCGGAGCTCGCC  
CGCGACTCGCGCACGGCGTGGAGTGGCAGAGCATGGTGAATAACCAGGCGAAGATGCAGGCAGCGTTCAAGGCGGCGATG  
CTCAAGCTGTCCGTGCTTGGCCACAACATCGAGGACATGGTGGACTGCTCCGAGCTCATCCCCGAGCCGCGACGCTCGCG  
AAGGCTGCTACTTTCCCGGCTGGCTTACGCCACGCCGACGTTGAGCAGGCCCTGCGCGACGACGCTTTCCCAACCTTTC  
TCTGACCCTGGTCCAGTCACTTCCGTTGCCCGGTCCCCCTTCCCTAA

>Pa\_MnPD\_prot

MAFKLLSALAIIVAVSQMANAAITRRVACPDGVNTATNAACCALFAIRDDIQENLFDGGEGCEEVHESLRLTFHDAIGISQS  
KDVGGGADGSMIIIFSDIETNFHANGGIDDIVDAQSPFVAKHNITAGDFIQFAGAIGVSNCPGAPRLDFFLGRPEATKPAAD  
LTVPEPFDTVDSILARFADAGAFTPAEVVALLASHTIAAADHVDPSIPGTPFDSTPGVFDQFFVETQLRGTLPFTGGNQ  
GEVESPLHGEIRLQSDSELARDSRTACEWQSMVNNQAKMQAAFKAAMLKLSVLGHNIEDMVDCSELIPFPPTLAKAATFPA  
GFSHADVEQACATTFPTLSSDPGPVTSVAVPPPS

Secuencias MnP E:

>Pa\_mnpE\_cds

ATGGCTTTGCGTCGCTCCTCGCCTTCGTCGCTCTCGCAGCTGTGCTAGCGCTGCCCAACCTCTGAGGCCGCCATCTGC  
TCTGACGGCACTCGCGTCAACAACGCGGCTGCTGCGCCTTCATCCCCCTCGCTCAGGACCTCCAAGAGAATGTTCTCGAG  
AACGAGTGGCGTGAACCTGCCACGAGATTCTCCGCTTACGTTCCACGACGCCATCGGTATCAGTCAGAGCCTCGGTCTCT  
TCAGTGGCAGCGGCTGACGGCTCCGTCCTGCTTCCCAGCGGTGCAACCGTTGTTCTTCCGAGACGACGGTATCTCT  
GACAGCGTCAACAACCTGCTGCCGTTCTTCAGAGACACAAGGTCTCCGCTGGCGACCTCGTCCAGTTTCGCGGCGCGGTC  
GCCCTGACCAACTGCCCTGGCGCGCCGCGCTCCAATTCCTTGGCGGCTCCGAACGCGACCCATCCGTCCATTAATGGT  
CTCGTCCCTGAGCCGACGACAGCGTGCACACCATCTGGGCGGTTTCGCGGACGCGGCAATTTCTCGCCCTTCGAGGTT  
ATCTCCCTTCTGGCTTCTCACAGTATCGCACGTGCGGACAAGGTGATCTTTCTATTGACGCCGCTCCCTTCGACTCGACC  
CCGTTTCGTGATGGACACCCAGGTCTTCTCGAGGCTTGTCTCAAGGGTGTGGGCTCCCGGATCTGGCAACAGCTCCGCT  
GAGGTCTCTCTCCCTCCCGTCCGCGAGCGGCAACGACACCGCGGAGCTCCGCTCCAGTCCGACTTCGCGCTCTCCCGC  
GACCCGCGCACAGCCTGCTTCTGGCAAGGATTTGTTGACCAGCAGGATTCATGGCCACCAGCTTCAAGAACGCGTTTGGC

AAGCTCGCGATCCTCGGCCAGGACACCAGGAGGCTGATCGACTGCTCAGACGTCGTTCCCTGCTGCCAGCACCGTTGCCGTC  
AAGCCCAGCGCCTTCCCCCGACCAAGGGCCCCGCCGACCTCGAGATCGCCTGCGATGCGCGCACCTTCCCTACTCTTACC  
TCTGACCGCGGTGCGACTGAGACTTTGATCCCTCACTGCCCGACGGTTCCAGATTTGCGCCGACGTCGACACCGACGGC  
CCGGCTCCGACAACGACGACCCGAGCACCAGCCCCGGCACCATCAACTAA

>Pa\_mnpE\_gen

ATGGCTTTTGCCTCGCTCCTCGCCTTCGTCGCTCTCGCAGCTGTGCTAGCCTGCCCAACCTCTGAGGCCGCCATCTGC  
TCTGACGGCACTCGCGTCACCAACGCGCCTGCTGCGCCTTCATCCCCCTCGCTCAGGACCTCCAAGAGAATGTTCTCGAG  
AACGAGTGCAGTAACTGGTATGAAATCTTTTTTAACTACTACTACTCGGAGCTGACGGCACTGTAGCCACGAGAT  
TCTCCGCTTACGTTCCACGACGCCATCGGTATCAGTACAGAGCCTCGGTCCTTCAGGTAAGTCTGGTGAATCAGGTCG  
GCTCCGATACAGTACCTGATGTACAGTTACAGTGGCAGGGCGCTGACGGCTCCGTCTGCTGTTCCCGACGGTCGAACCG  
TTGTTCTTCGAGAACGACGGTATCTCTGACAGCGTCAACAACCTGCTGCCGTTCCCTCAGAGACACAAGGTCTCCGCTGGC  
GACCTCGTCCAGTTCGCGCGCGGTCGCCCTGACCAACTGCCCTGGCGCGCCGCGGTCCTCAATTCCTTCCCGGCCGTCG  
AACGCGACCCATCCGTCCATTAATGGTCTCGTCCCTGAGCCGACGAGCGTCGACACCATCCTGGGCCGTTTCGCGGAC  
GCGGGCAATTTCTCGCCTTCGAGGTTATCTCCCTTCTGGCTTCTCACAGTATCGCACGTGCGGACAAGGTGATCTTTCT  
ATTGACGCCCTCCCTTCGACTCGGTAAGTTATACTAGATTGAAACGCGCGCCGTTACTTATTTTTGTGTACCGTAGAC  
CCCGTTCGTGATGGACACCCAGGTCCTCCTCGAGGTCCTGCTCAAGGGTGTGGGTCCTCCCGGATCTGGCAACAGCTCCGC  
TGAGGTCCTCTCTCCCTCCCGCTCGGACGCGCAACGACACCGGCGAGCTCCGTCTCCAGTCCGACTTCGCGCTCTCCCG  
CGACCCGCGCACAGCTGCTTctggcaaggatttgttgaccagcaggagttcATGGCCACCAGCTCAAGAACGCGTTTGC  
CAAGCTCGCGATCTCGCGCAGGACACCAGGAGGCTGATCGACTGCTCAGACGTCGTTCCCTGCTGCGGACCCGTTCCGCT  
CAAGCCCGCGCCTTCCCGCGACCAAGGGCCCCGCGACCTCGAGATCGCCTGCGATGCGCGCACCTTCCCTACTCTTAC  
CTCTGACCGTAAGTACCTTATATCTGGACTCGCGCGGACGGGCGCTGATCGCGTATCCAGGCGGTGCGACTGAGACTTTG  
ATCCCTCACTGCCCGACGGTTCCAGATTTGCGCCGACGTCGACACCGACGGCCCGCCTCCGACAACGACGACCCGAGC  
ACCGACCCCGCACCATCAACTAA

>Pa\_MnPE\_prot

MAFASLLAFVALAAVASAAPTSEAAICSDGTRVTNAACCAFIPLAQDLQENVLENECGETAHEILRLTFHDAIGISQSLGP  
SAGTGADGVSLLFPTEVEPLFFENDGISDSVNNLLPFLQRHKVSAGDLVQFAGAVALTNCPGAPRVQFLAGRPNATHPSING  
LVPEPQDSVDTILGRFADAGNFSPFEVILLSHLSIARADKVDLSIDAAPFDSTPFVMDTQVFLEVLKGVGLPDSGNSSA  
EVLSPLPVGSNDTGELRLQSDFALSDFRTACFWQGFVDQEFMATSFKNFAKLAILGQDTRRLIDCSDVVPAASTVAV  
KPAAFPATKGPADLEIACDARTFPPTLTSDRGATETLIPHCPDGSQICADVDTDGPASDNDPSTDPGTIN

## Secuencias MnP F:

>Pa\_mnpF\_cds

ATGGCTTTTCGCGTCCCTCGTCGCTTCGTCGCCCTCGCCGCTGTACCCCGCGCCGCCACCAGCGAGGCCGCTGTCTGC  
TCTGACGGCACTCGCGTCACCAACCGCGCTGCTGCGCCTTCATCCCGCTTGGCGAGGATCTTCAGCAGACCATCTTCCAG  
AACGAGTGCAGCGAAGATGCTCAGAGGTCATCCGTCTTACTTTCCACGACGCCATTGCTATCAGTACAGTCAAGTCCC  
AGAGCAGGTGGCGGCGTACGCGCTCCATGCTCCTGTTCCCGACTGTGCGAGCCAACTTCGCTGCGAACAACGGCATCGAC  
GACTCCGTCAACAACCTGATCCCGTTCCTTTCCAAGCACCCACGATCAGCGCCGGCGATCTTGTTCAGTTCGCGAGCGCG  
GTCGCGCTCACCAACTGCCCGCGCGCCAGACTCGAGTTCATGGCGGGCCGCCCAACCACACGATCGCCGCGCTCGAC  
GGCCTCATTCCCGAGCCGACGAGCGTCGACAAAATCCTGGCCCGATTTCGAGGACGCCGGCAACTTCTCGCCCTTCGAG  
GTTGCTCGCTCCTCGCCTCGCACAGCGTCGCGCGGCTGACAAGGTCGACGAAACCGTCGATGCCGCGCCGTTTCGACTCT  
ACGCCCTTCGTATGGACACCCAGGTCCTCCTCGAGGTCCTCCTCAAGGGCACCGGCTTTCGCGCACCCCAACAACACC  
GGCGAGGTTGCGTCGCCCCCTTCGCTGACCTCCGGCAACGACACCCGCGAGCTGCGCCTCCAGTACGACTTTGCGCTCGCC  
CGCGACCCGCGGACGGCGTGCTTCTGGCAAGGGTTCGTGAACCAGCAGCAGTTCATGGCCTCGAGCTCAAGGCGGCGATG  
GCCAAGCTCGGATCCTCGGCCACAACCGCAACTCGCTCATCGACTGCTCGGACGTCGTCCTCCCGCCACGATCAAGACGGCT  
GTGAAGCCTGCGGCGTTCGCGGTGACGAAGGGCCCTGCCGACCTCGAGATCGCCTGCCACGCCAGGGCGTTCGCCACCCCT  
ACCAGCGACCGTGGTGTACTGAGACCCCTCATCCCTCACTGCCCGACGGCGGCCAGGACTGCCCTGCCGTCCAGTTCGAT  
GGTCCGGCTTAA

>Pa\_mnpF\_gen

ATGGCTTTTCGCGTCCCTCGTCGCTTCGTCGCCCTCGCCGCTGTACCCCGCGCCGCCACCAGCGAGGCCGCTGTCTGC  
TCTGACGGCACTCGCGTCACCAACCGCGCTGCTGCGCgttcatcccgcttgcgagagatcttcagagaccATCTTCCAG  
AACGAGTGCAGCGAAGATGGTACGCTTCTCCGTATCCTCGACAGTTCGGCCTGCTGACGCTCATACTGCCACCCAGCTCA  
CGAGGTCATCCGGTTAAGTTCACGACGCCATTGCTATCAGTACAGTCAAGGTCANNNNNNNNNNCTTTGCGTCCAC  
TATCCATTCTATCATACTCATAACGCTTCGAGAGGTTGGCGGCGTACGGCTCCATGCTCCTGTTCCCGACTGTGAGCCC  
AACTTCGCTGCGAACAACGGCATCGACGACTCCGTCAACAACCTGATCCCGTTCCTTTCCAAGCACCCACGATCAGCGCC



GEVASPLPLTSGNDTGMRLQYDFALARDNRTACFWQGFINEQELMAQSFKAAAKLAVLGSNPEDLIDCSDVVPASTIA  
VAPASFATQGPADLEIACTARAFPTLTQDRGATETLIPHCPDGSEDCPSVQFDGPA

### 7.2.3.2 Secuencias consenso lacasas

#### Secuencias LCC1

>Pa\_lcc1\_cds

```
ATGGCTCATTTCAGTCTCTCTCTGCCTTCGTAACCTTATCCTTAGCTCTTGGTGGTCTCGCCGCAATCGGTCCCCTGCT
ACTATTGACATCGTTAATGTCGAGCTTTCGCCGACGGTTTCAACCGCTCGACTGTTCTCGCTGGAGGTGTCTTCCAGGT
CCACTCATCACCAGGAAAAGGGGCGACAACCTCCAGCTGAATGTCAACAACAGCTCACGGACACCACCATGTTGAAGACG
ACCACTATCCATTGGCACGGCCTTTTCCAGAAGGGCACCAACTGGGCCGATGGTCCGGCATTCGTCAACCAGTGCCCGATC
GCGAGCGGCAACTCGTTCTTGTACGACTTACCGTCCCCGACCAGGCGGCACCTTCTGGTACCCTCTCATTTGCAAACC
CAGTACTCGGATGGTCTTCGAGGCGCCCTCGTCTGTATGACCCCTAACGACCCCAATGCTGACCTATACGACGTGGATGAC
GAGTCAACTGTCTAGTTCTTTCGGGATTGGTACCATGCCGTGGCTCCCACCATCGCGGTTGGCGTCTGACTCTACGTTG
ATCAACGGGCTGGTCTTATGCGGGAGGGCCCTCGTCCGACTTGGCGGTGATAAGCGTCACTTCTGGGAAGCGTTACAGG
TTCCGCTGGTTTCCATTAGCTGCGACCCCAACTTCACTTCCAAATGATGGTCAACAAGTTCACATCATCGAAGTCGAT
GGTGTAAACCACGAACCCCTCGACGTGGACGAAATCCAGATCTTTCGCCGCGCCAGCGCTACTCGCTCGTCATGACCGCTGAC
CAGCCCGTTGACAACCTACTGGATCCGCGCCAACCCGAATAATGGTGTGTCATCGGGCTTCGCGAACGGAAATCAACTCTGCC
ATTCTGCGCTACGTTGGCGGACACCGTTCGAGCCACGACGACTCAGGACACCCCGCGCAGCGCTCGTTCGAGACCGCC
CTTGTCCCCCGGAGAACCCCGCGCGCCATCCCGCGCCGAGCGCTGCGTCTGACTGCGCGGATGTGAACATTAACCTC
GCGCTCGACTTCAACCTCAATGGCGACTTCCAGTTCACATCAACGGCGTTACCTACGCTCTCGCCACCGGTTCCGGTGCTG
CTCCAGATCCTTTCGGCGCACAGTCTGCTACGGATCTCCTCCGACCGCGAGCGTCTACTCTCTTCCAAAGAACAGCACG
ATCCAGATCTCGCTCCCGGCTGGTTCGACCGCCCTGCGCGGGCGGGCCCCACCCCTTCCACTTGACGGCCACACCTTC
GACGTGGTCCGTGCGCGTGGCCAGTCCGACTACAACGGGTGAACCCGCCCCCGCGTATGTTGTGACGACCGGCACCACT
GGAGATAACGTCACCATCCGTTTGTACTGACAACCTTGGCCCCGTTTCCCTCCATTGCCACATTGACTGGCATCTCGAG
GCTGGCTTCGCGCTCGTCTCGTGGAGACTCAGGCGACGCTTCGGCGAATGTGCGGGTTCGCGACTCGTGGAGTGATTTG
TGCCCGACTACAACGACCTCACCGCTGATGACCTTGGAGGCGAGGATTAG
```

>Pa\_lcc1\_gen\_

```
ATGGCTCATTTCAGTCTCTCTCTGCCTTCGTAACCTTATCCTTAGCTCTTGGTGGTCTCGCCGCAATCGGTCCCCTGCT
ACTATTGACATCGTTAATGTCGAGCTTTCGCCGACGGTTTCAACCGCTCGTGAGTTTATCAAATGATGTAGGTATAACAAC
TGCTAACAACCGTACAGGACTGTTCTCGCTGGAGGTGTCTTCCAGGTCCACTCATCACCAGGAAAAGGGTTCAGTGATCTA
CGCCCTCCATCGCAACTAGCTCTGACAACGGTCACTTTAGGGCGACAACCTCCAGCTGAATGTCAACAACAGCTCACGGA
CACCACCATGTTGAAGACGACCACTATCGTAAGTTCTGCCATAACGGCATGGATACTGCCTCTCGTGTAAACCGTGTCTTCG
CAGCATTGGCACGGCCTTTTCCAGAAGGGCACCAACTGGGCCGATGGTCCGGCATTCGTCAACCAGTGCCCGATCGCGAGC
GGCAACTCGTTCTTGTACGACTTACCGTCCCCGACCAGGCGGCACCTTCTGGTACCCTCTCATTGCAAACCCAGTAC
TGCGATGGTCTTCGAGGCGCCCTCGTCCGTGAGTGCAACTGGAGGTATGCGTAGTGCATACCAAAGCTGATAATTCTGCT
GGGACGTGATGACCTAACGACCCCAATGCTGACCTATACGACGTGGATGACGAGTCAACTGTCTAGTTCTTGGCGATT
GGTACCATGCCGTGGTCCCACCATCGCGGTTGGCGTCTGACTACGTTGATCAACGGGCTGTGAGTTGGAGCATTTT
AGAGTGAGGCCAAGCTGACACTCCTGACGGGGTCTTATGCGGGAGGCGCCCTCGTCCGACTTGGCGGTGATAAGCGTCACT
TCTGGGAAGCGTTACAGGTTCCGCTGGTTTCCATTAGCTGCGACCCCAACTTCACTTCCAAATGATGGTCAACAAGTTC
ACTGTTGGTACCGGCCACAATCAGTCTGAGCTCGTCTGACGCTCCATCAGATCATCGAAGTCGATGGTGTAAACCAC
GAACCCCTCGACGTGGACGAAATCCAGATCTTCCGCCGCGCAGCGCTACTCGCTCGTCATGACCGCTGACCAGCCCGTTGAC
AACTACTGGATCCGCGCAACCCGAATAATGGTGTGTCATCGGGCTTCGCGAACGGAAATCAACTCTGCCATTCTGCGCTAC
GTTGGCGCCGACACCGTTCGAGCCACGACGACTCAGGACACCCCGCGCAGCGCTCGTTCGAGACCGCCCTTGTCCCCGCG
GAGAACCCCGCGCGCCATCCCGCGCGGAGCGTCCGCTGACTGCGCGGATGTGAACATTAACCTCGCGCTCGACTTTC
AACCTCAATGGCGACTTCCAGTTCAACATCAACGGCGTTACTACGTTCTCGCCACCGTTCCGGTGTGCTCCAGATCCTT
TCCGGCGCACAGTCTGCTACGGATCTCCTCCGACCGCGCAGCGTCTACTCTTCCAAAGAACAGCACGATCCAGATCTCG
CTCCCGGCTGGTTCCGACCGCCCTGCGCGGGCGGGCCCCACCCCTTCCACTTGACGGCGTACGTTCTTCTCATCTATAC
ATTCCACATTTCTGATGCTCACTTCCGCTTTGTATCCAGCACACCTTCGACGTGGTCCGTGCCGCTGGCCAGTCCGACTA
CAACTGGGTGAACCCGCCCCGCGTGTGTTGTGTCAGCACCGGCACCACTGGAGATAACGTCACCGTGGAGATCCCTCCGG
CACCCCTCCCTCTCCATCAAACCTCTGACACATCTTGGTTCGAGATCCGTTTGTACTGACAACCTTGGCCCCGTTGGTTC
CTCCATTGCCACATTTGACTGGCATCTCGAGGCTGGCTTCGCCGCTCGTCTCGTGGAGGACTCAGGCGACGCTCCGCGAAT
GTCGCGGTTCCGACTCGTGGAGTGATTTGTGCCGACCTACAACGACCTCACCGGTAAGCCCTTCCGCTCGTCTATGGTTC
AAGTAGGGTGGCTGATGGAGATTTGGTGTTCAGCTGATGACCTTGGAGGCGAGGATTAG
```

>Pa\_lcc1\_prot

```
MAHFQSLSAFVTLSSLALGGLAAIGPTATIDIVNVELSPDGFNRSTVLAGGVFPGPLITGKRGDNFQLNVNQLDPTMLKLT  
TTIHWHLGFQKGTNWDGPAFVNQCPIASGNSFLYDFVTPDQAGTFWYHSHLQTYCDGLRGALVYDFNDPNADLYDVDD
```

ESTVIVLADWYHAVAPTIAVGVADSTLINGLGRYAGGPSSDLAVISVTS GKRYRFR LVSISCDPNFTFQIDGHKFTTIEVD  
GVNHEPLDVDEIQIFAGQRYSLVMTADQPVDNYWIRANPNNGAASGFANGINSAILRYVVGADTVEPTTQDTPAAALVETA  
LVPAENPGAPI PAGQRCVDCADVNINLALDFNLNGDFQFNINGVITYVSPTVPVLLQILSGAQSATDLLPTGVSVYSLPKNST  
IQISLPAGSTAPAAGGPHFFHLHGHTFDVVRAAGQSDYNWVNPVRRD VVSTGTTGDNV TIRFVTDNFGPFWFLHCHIDWHLE  
AGFAVVLVEDSGDVSANVAVPDSWSDLCTYNDLTTADDLGGED

## Secuencias LCC2:

>Pa\_lcc2\_cds

ATGGCCCGTTTCCAGTCCCTCGCTGCCTTTGTGACTTTGTGCGATGGCCCTTGGTGGCCTCGCCGTCGGCCCCACGGCCACC  
CTCGACATCGTCAATGTGCGAGCTTGCCTGATGGCTTCAACCGATCGACTGTCCTTGCTGGAGGCACCTTCCCCGGTCCC  
CTCATCACCGGCAACAGGGGGGATCACTTCCAGCTGAACGTGAACAACAGCTCACGGACACTACCATGTTGAAGACGACC  
ACTATCCACTGGCAGGCTTTTTCCAGAAGGGCACCAACTGGGCCGATGGTCCGGCATTGCTCAACAGTGCCTGATCGCG  
AGCGCAACTCGTTCTGTACGACTTACCGTCCCCGACCAGCCGGCACCTTCTGGTACCCTCTCATTTGCAAACCCAG  
TACTGCGATGGTCTTCGTGGCGCGCTCGTGTGATGACCCCCACGACCCCAACGCTCACCTGTACGACGTCGACGACGAG  
TCAACTGTCATCGTCTTGGCGACTGGTACCATGCCGTGGCTCCCACCATCGCGGTGGTGTGGCGATTGACGCTGATT  
AACGGATTGGGTGGTATGCCGGAGGCCCTTCGTCCGACCTTGGCGGTGATCAGCGTACTGCTGGCACGCGTTACAGGTT  
CGCTCGTCTCCATCAGCTGTGATCCCAACTTCCCTTCCAGATCGATGGTTCACACGTTCACTATCATTTGAAGTTGACGGC  
GTCAACACGAGCTTGTAGGTTGATCAAGTCCAAATCTTCGCCGGCCAGCGTTACTCGCTCGTTATGACTGCCGATCAG  
CCCGTCGACAACCTGATCCGCGCCAACCCGAACACGGCGCCGAGGGCTTCGCTAACGGCATCAACTCCGCCATC  
TTGGCGTACACCGGCGCGACGCCGTGAGCCACGACGCCAGGACACCCCGGCCGCGCGCTCGTCGAGACCGCCCTT  
ATCCCCGCCGAGAACCCCGGCGCACCCATCCCGGCCGGCCAGCGCTGCGTGCAGTGCAGCGGATGTGAACATTAACCTCGCG  
CTCGACTTCAACCTCAACGGCGACTTCTGTTCACATCAACGGCGTGACCTACACCTCGCCACCCTTCCGGTCTACTC  
CAGATCCTTTCTGGCGCACAGTCCGCCACGGACTTGTCCCGCCGGCAGCGTCTACACGCTCCCGAAGAACAGCACTATC  
CAGCTCACGCTCCCGGCCGCGACGACTGCCCCCGCCGGGGCGGACCTCATCCCTTCCACTTGCACGGTTCACACCTTGTAC  
GTCGTCCGCGCTCCGGCCAAACCGACTACAACCTGGATCAACCCGCCCGCTCGCGACGTCGTGACACTGGAGTTGCGGGC  
GACAACGTCACATTCGTTTACCACCGACAACCTACGGTCCCTGGTTCCTTCACTGCCACATCGACTGGCATCTCGAGGCC  
GGCTTCGCCGTCGTCTCGCTGAGGACACGGGTGACGCTCTCTCGAAGTCTCAGTCCCCAGTCTGGAGCGACCTGTGC  
CCCACCTACAATGCCCTCACTGCTGACCAGCTCGGGCGGAGGACTAA

>Pa\_lcc2\_gen

ATGGCCCGTTTCCAGTCCCTCGCTGCCTTTGTGACTTTGTGCGATGGCCCTTGGTGGCCTCGCCATCGGCCCCACGGCGACC  
CTCGACATCGTCAATGTGAGCTTGCCTGACGGCTTCAACCGATCGTAAGGTGGTTCATGGTGGCGTTGCGCAACCACT  
AACAGTCTGACAGGACTGTCTTGCTGGAGGCACCTTCCCCGGTCCCTCATCACCGCAACAGGGGGGATCACTTCCAGC  
TCAACGTGAACAACAGCTCACGGACACTACCATGTTGAAGACGACCACTATTGTAGGTGTTCTGCTTTCAGCGATTAA  
CGATCCGTAATTGATCGATGTCTTGCAGCACTGGCAGGCTTTTTCCAGAAGGGCACCAACTGGGCCGATGGTCCGGCATT  
CGTTAACAGTGCCTGATGCGAGCGCAACTCGTTCGTGACACTTACCGTCCCCGACCAGCCGGCACCTTCTGGTA  
CCACTCTCATTTGCAAACCCAGTACTGCGATGGTCTTCGTGGCGCGCTCGTGGTGGTGAAGTGGAGGGTGTGTATAGT  
CCACTGTAAGTGTATAACGCTGCTCGCCAGTGTATGACCCCAACGATCCCAACGCTCACCTGTACGACGTTGATGACCG  
TCGACCTGCATCGTTCTCGCGGATTGGTACATGCCGTGGCTCCCACCATCGCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
AACGGATTGTGAGCCCGATCATCTCGCTATGCATCCAACCTGACGATATTGTTGAGGGGTCGGTATGCCGGAGGCCCTT  
CCTCCGACCTTGCAGTGTGACGCTGCTGTCAGCGTTACAGGTTCCGCTGGTCTCCATCAGCTGTGATCCCAACT  
TCACCTTCCAGATCGATGGTTCACAGTTCAGTGTTCGTGACTCTCGCTGAGCGTGTGTTTCCATCGCATCTAACTTCTCC  
ATTAGATCATTGAAGTTGACGGTGTCAACCACGAGCCCTTGGAGTTGACGAAGTCCAGATCTTTGCCGGCCAGCGTTACT  
CGCTCGTCACTGCTAACCAGCCGTCGACAACCTACTGGATCCGCGCAACCCGAACAACGGCGCCGCGCAGGGCTTCG  
CTAACGGCATCAACTCCGCCATCTTGGCTACACCGCGCCGACCGCTTGGAGCCACGACGACCCAGGACACCCCGCCG  
CGGCGTCTGTCGAGACCGACCTTGTCCCCGCGAGAACCCCGCGCGCCCATCCCGCCGGCCAGCGCTGCGTCACTGCG  
CGGACGTGAACATCAACCTCGCGCTCGACTTCAACCTCAATGGCGACTTCCAGTTCACATCAACGGCATTACCTACGCT  
CGCCACCGTCCCTGTCTGCTCCAGATCCTTCCGGCGCGCAGTCCGCCACCGACCTCCTCCCGACCGGCGAGCGTCTACA  
CGCTCCCGAAGAACAGACCATCCAGATCTCGCTCCGGCTGGTTCGACCGCCCTGCGCGGGTGGCCCGCACCTTTC  
ACTTGCACGGCGTTAGTCCCTTTCTGCCACGTTTCTCGCGGATCGCCAAAGCTCACATCATTTGTAGCATACTTCGAC  
GTCGTCCGCGCTCCGGCCAATCTGACTACAACCTGGATCAACCTGACCCCGCCGCGATGTGCTCAGCAGCCAGGACGAC  
GACAACGTCACCGTAAAGCTCATCTTTACGCTCTCTCATCTACTGACCTCTGACGTTGCTGACCTGATGCTGATGCTG  
GTCACCTGACAACCTTTGGCCCTGGTTCCTCCATTGCCACATCGATTGGCATCTCGAGCGGCTTCCCGCTCGTTCGCT  
GAAGACACCGCGATGTGCTGCGAACGTCGCCGTCGCCAGTCTGCGGACCTTGCCTCATCAACGACCTCACC  
GCTGACCAGCTCGGGCGGAGGACTAA

>Pa\_lcc2\_prot

MARFQSLAAAFVTLTSMALGGLAVGPTATLDIVNVELAPDGFNRSTVLAGGTFPGPLITGNRGDHFQLNVNNQLD TDTMLKTT  
TIHWHGLFQKGTNWADGPAFVNQCPIASGNSFLYDFVDPDQAGTFWYHSHLQTYCDGLRGALVVYDPHPNAHLYDVVDE  
STVIVLADWYHAVAPTIAVGVADSTLINGLGRYAGGPSSDLAVISVTAGTRYRFR LVSISCDPNFTFQIDGHTFTTIEVDG  
VNHEPLEVDQVQIFAGQRYSLVMTADQPVDNYWIRANPNNGAAGGFANGINSAILRYTGADAVEPTTQDTPAAALVETAL

IPAENPGAPIPAGQRCVDCADVNIINLALDFNLNGDFLNFNINGVITYTSPTVPVLLQILSGAQSATDLLPAGSVYTLPKNSTI  
QLTLPLAGTTAPAAGGPHFHLHGHTFDVVRASGQTDYWNINPPRRDVVSTGVAGDNVTIRFTTDNYGPWFHLCHIDWHLEA  
GFAVVF AEDTGDVSSKVSVPQSWSDLCTYNAL TADQLGGED

### Secuencias LCC3:

>Pa\_lcc3\_cds

ATGGCCCGCTTTACCTGCTCGCGATGTTGGTCGCGTTGTCCATGTGCTGGAACACTGGCCGAGTGGGCCCCGTGTC  
ACCTTAGACATCGTGAACGTCCAGATGGCGCCTGACGGCAACAGTGTCAACCGGACACTGTCGTTGCTGGCGTGAATGGT  
GTTGGCACATTCCTGGCCCGCTCATTACAGGCAAGAAGGGTGACAACTTCCAGCTTACTGTGAACAACAGCTCTCGGAT  
GTCGCAATGTTAAAGTCAACCTCTATTCAGTGGCACGCGCTTCTTTTCAGAAAGGCACCAATTGGGCCGATGGCCCGCATT  
GTCAACCAATGTCCCATTGCCACCGGAGACTCCTTCTGTATAACTTCAACGTCCCCGATCAAGCCGGAACGTTTTGGTAT  
CATTACATCTTTCCACGAGTATTGCGATGGTCTCCGCGGCGCATTGTAGTGTATGACCCGAATGATCCGCATGCGAGC  
CTCTATGATGTAGATGATGATACGACTATCATCACTCTGCTGACTGGTACCACGCTCTGGCGCCTACTATCACTGGCCGC  
GCCGTCTCTGACTCCACCCTCATCAACGGGCTCGGTGCGGTACCAGGGCCACTTCCGAGCTCGCCGTAATATCAGTCGAG  
TACGGCAAGCGTTACCGATTGATTTGGTATCCATCAGTTGCGATCCCAACTACGCTTCCAGATCGATGGACACAAATTC  
ACTGTTATCGAGGCCGACGGTGTCAACACACAACCTTGGCAATAGATTCCCTCCAGATCTTCGCTGGCAGCGATACTCT  
CTTGTAAATGACGGCTGATCAGCGGGTCGAAACTACTGGATTTCGCGCAAACCAAGCTTCTCTGCCACACCCGGGTTACC  
GGCGGCACAAATAGCGCGATCCTCCGATATGTAGGTGCGAATGAAACCGAACCGACTACTTCTCAGGATACGTCCACGGCG  
CCTCTGGTCGAGACTTCCCTTGTGCCACTTGAGAATCCGGGTGTTACGGGCCCCGAGTCAGCGTTGCGTTGATTGCGCT  
GATTTCAATCGTAACCTGAAACTTGGTTTCACCCGACCAAATTTCCACATCAACAACGTGTGTTTACCTCCCAACGTG  
CCGGTCTTGCTGCAGATTCTTAATGGCGCCAGGCTGCTTCCGATCTTATGCCGAAAGGCAGTATAATTGAACTGCCTGCT  
GGCAGACTGTACAAATCTCTCTGCAATCGACGCCACTCTGCTCCAAGTGGCCCTCACCTTTCCATTTGCACGGACAT  
AACTTCGATGTTGTTTCGAGCAGCAGGGCAGAGCGACTACAACCTCGACAATCCTCCTCGTCGCGATGTTGTGACGACGGGC  
ACCGTCGGAGACAATGTTACTATACGATTCTTTACGGACAACCGGGTCTTGGTTCTCCACTGCCATATTGACTGGCAC  
TTGGAGGCTGGCTTTGCCGTAGTTTTCGCGGAGGACATCGCGACGTTGGCCGCTCAAAATCCGGTTCGCGATGCTTGGAGA  
AACCTGTGCCCTAAATACGAGACACTACCCGTACGTGAAGCTTTTTCTCGCGGCTGCTGACAAGAAACCACCATGCTCAC  
GTTGCACTGCAGCGACCCAGCTCGGCGCATTCACTAA

>Pa\_lcc3\_gen

ATGGCCCGCTTTACCTGCTCGCGATGTTGGTCGCGTTGTCCATGTGCTGGAACACTGGCCGAGTGGGCCCCGTGTC  
ACCTTAGACATCGTGAACGTCCAGATGGCGCCTGACGGCAACAGTGTCAACCGGACAGTAAAGTCGCTTCTCTGACTATCGAA  
TATACGGTCTAAACAAATCCCCTAGCCTGCTGCGCTAGCCTGCTGCTGGCGTGAATGGTGTGGCACATTCCTGGCCCGCTC  
ATTACAGGCAAGAAGGTGATATGGAACACTTTGTATACTAATATCTTACTGAACTGCGTCAAGGGTGACAACCTCCAGCT  
TACTGTGAACAACAGCTCTCGGATGTCGCAATGTTAAAGTCAACCTCTATTGTGAGTACTCCCCCTTCCGCTACTCCGC  
CATAACATAACTGTGTTTTAGCACTGGCACGGCTTCTTTTCAGAAAGGCACCAATTGGGCCGATGGCCCGCATTTCGTCAAC  
CAATGTCCCATTGCCACCGGAGACTCCTTCTTGTATAACTTCAACGTCCCCGATCAAGCCGGAACGTTTTGGTATCAATCA  
CATCTTTCCACGCAGTATTGCGATGGTCTCCGCGGCGCATTGTTAGGTGAGCTAAGACGCTGTGCTCTTGTTTACCCAACG  
TATGAAGCTCACTCAGATGCAGTGTATGACCCGAATGATCCGCATGCGAGCCTCTATGATGTAGATGATGATACGACTAT  
CATCACTTTGCTGACTGGTACCACGCTCTGGCGCCTACTATCACTGCGCGCGTACGTTCTGTTTACTCGCAATTCGCGG  
GCGATTGTTCTCATTTGCTCTCTAGCGTCTGACTCCACCCTCATCAACGGGCTGTGAGTAAACCAATCCTTGGCGTCTG  
GATTGATATCAGATTTGACGATGTCTCGCAGCGGTGCGGTACCAGGGGCCACTTCCGAGCTCGCCGTAATATCAGTCGAG  
TACGGCAAGCGTTACCGATTGATTTGGTAGGTATTAGGATATTGTTTCAATTGAAACGATATTATCTACCTACCTTCCAGG  
TATCCATCAGTTGCGATCCCAACTACGCTTCCAGATCGATGGACACAAATTCAGTACGATTTGCGCAAGTGGCTCGTT  
CGTCTCTCATCGGCTTCGTAGGTTATCGAGGCCGACGGTGTCAACACACAACCTTGGCAATAGATTCCCTCCAGATCTTC  
GCTGGTACATCATATTTTTGCTCCGACAAAATCTGCTTTGACCCATCTCCTTCCAGGGCAGCGATACTCTTGTAAATGAC  
GGCTGATCAGCGGGTCGAAACTACTGTAAGTTGCAATCAATGACTAGCTTCCGCGAGATCCAATCAATGAGCATCTTTCAA  
GGGATTCGCGCAAACCAAGCTTCTCTGCCACACCCGGGTTACCAGCGGCACAAATAGCGCGATCCTCCGATATGTAGGT  
GCGAATGAAACCGAACCGACTACTTCTCAGGATACGTCACCGGCCCTTGGTCGAGACTTCCCTTGTGGTACGGCGTACA  
TGCATCTGGGTTGAAGATATCCGTCTAATAGACCATACAGCCACTTGAAGATCCGGGTGTTACGGGCCCCGCGAGTCAGCG  
TTGCGTTGATTGCGCTGATTTCAATCGTAACCTGAAACTTGGTTTTGTAAGTGTGTCATTGATGTGACAATCTGAAATCACA  
TTAATCATCATGTTTCGCAACAGACCCGACCAAAATTCACCATCAACAACGTGTGCTTCACTCCCAACGCTGCCGGTCT  
TGCTGCAGATTCTTAATGGCGCCAGGCTGCTTCCGATCTTATGCCGAAAGGCAGTATAATCGAATCGCTGCTGGGCGAGA  
CTGTACAAATCTCTCTGCAAAATCGACGCCACTCTGCTCCAAGCGGCCCTCACCTTTCCATTTGCACGGAGTGAGCGACC  
GTCTAGTTCCGACGCTTAAACAAGACTGACCCAACGCTTATCAGCATAACTTTGATGTTGTTTCGAGCAGCAGGGCAGA  
GCGACTACAATTCGACAATCCTCCTCGTCTGATGTTGTGACGACGGGCACCGTCGGAGACAATGTTACTGTGAGCAGAA  
TTATACGGTCTCATCGGCACTCGGGATTACACGATGCTCAGATACGATTCTTTACGGACAACCGGGTCTTGGTTCCCT  
CCACTGCCATATTGACTGGCACTTGGAGGCTGGCTTTGCCGTAGTTTTTCGCGGAGGACATCGCGGACGTTGGCCGCTCAAAA  
TCCGGTCTCTGATGCTTGGAAAAACCTGTGCCCTAAATATGAGACACTACCCGTACGTGAAGCTTTTTCTCGCGGCTGCT  
GACAAGAAACCACCATGCTCACGTTGGACTGCAGCGACCCAGCTCGGCGCATTCACTAA

>Pa\_lcc3\_prot  
MARFHLMLVALSMLGTLAAVGPVATLDIVNVQMAPDGNVTRDRTVVAGVNGVGTFFGPLITGKKGDNFQLTVNNQLSD  
VAMLKSTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFVNVQCPATGDSFLYNFVNDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGAFVVYDPNDPHAS  
LYDVDDDTIITLADVYHALAPITIGRAVSDSTLINGLRVTGATSELAVISVEYGKRYRFRFLVSIISCDPNYVFQIDGHKF  
TVIEADGVNTQPLAIDSLQIFAGQRYSLVMTADQRVGNWYIRANPSFSATPGFTGGTNSAILRYVGANETEPTTSQDTSTA  
PLVETSLVPLENPGVTGPASQRCVDCADFNRNLKLGFTAPNFTINNVSFIPPNVPVLLQILNGAQAASDLMPKGSIIELPA  
GQTVQISLQIDATSAPSGPHFHLHGHNFDVVRAGQSDYNFDNPPRRDVVSTGTVDNVTIRFFTDNAGPWFLHCHIDWH  
LEAGFAVVFAEDIGDVAQNVPVDAWRNLCPKYETLRTSKLFSRLLTRNHHAHVALQRPSAAF

## Secuencias LCC4:

>Pa\_lcc4\_cds  
ATGACGCGCATTTCATCTCCTCGCGACGTTTCGTGTGCTCTCTATGTCGCTCCGGGCCCTTGGCGCCGTTGGACCCACCACC  
ACTCTGGATATCGTCAATGTTTCAGATGGCCCCAGATGGCTTCAACGTGACCCGCGACTGTGTCGCTGGCACCAACGGT  
GCCGGGACCTTCCCTGGCCCGCTCATCACCGCAACAAGGGTGACAACTTCCAGATCAACGTCAATAACCAGCTCTCAGAC  
GTGGCCATGCTCAAGACGACGTCCATCCATTGGCACGGGTTGTTCCAGAAGGGCACTAACTGGGCCGATGGGGTGGCATT  
GTTACTCAATGCCCCATCGCCAGCGGCAACTCCTTCTGTACAACCTTGACGTGCCGACCAGGCCGGGACCTTCTGGTAC  
CACTCCACCTGTCTACCAATACTGTGATGGATTGCGCGCGCACCTGGTTGTTTTATGATCCGAATGACCTCACGCAAGC  
CTTTATGATGTGGACGATGACACGACTGTGATCACCCTCGCTGATGGTATCACGCACTCGCTCCCAATCGCTGTTGGT  
GTGGCGGACTCGACACTGATCAACGGATTGGGTGATACGGAGGCCGGTGGATCATCGTCTGACCTGGCGGTGCTCTCG  
GTCACACAGGGCAAGCCTACCCTTCCGCTGGTCTCGATCAGCTGACCCAAGCTTCACTTTCCAAATCGACCAACAC  
AACTTACCATCATCGAATCCGATGGCATAAACACGCGACCGCTCGTGTGACGACTGCAGATCTTCCGCGCCAGCGC  
TACTCGCTCGTCTCCGCGACCGCCGTTGGACAACCTACTGGATCCGTGCGGACCCGAGCAACGGCCCGCGACCGGG  
TTCGATGGCGGGATCAACAGCGCCATCCTGCGCTACGTTGGTGTAAACGAGACCGAACCGACCGCTCAGGACACCGCC  
AGCGCTCCGCTTGTGAGACCGACCTTGTGCTCTGGAGAACCCCGGTGTCACCGCGACCGCTCGACCCACTGCGTCGAC  
TGCGCGGACGTCAACATCAACATGAAGCTCGACTTCAACCTGCATGGCGACTTCTTGTTCGACATCAACAACGTGAGCTT  
ATCCACCGACGGTCCCGTGTGCTCCAGATCCTCAGCGCGCGCAAGAAGCGACTTCGCTCCTGCCAACGGCAGCGTG  
TACTCCTGCCAAGAACAGCTCCATCCAGATCTCGCTTCCGGCAGGCACGACCGCCCCCGCGGGCGGCCCGCACCCC  
TTCCACTTGACGGCCACGCTTCCGCTGATCCGCGCGCGGGCCAGACGACTACAACCTTCGACACGCGCCCGCGCGG  
GACGTCGTGACACCGGAACAACCGGAGACAACGTGACCATCCGGTCTTTCACGGACAACCTTCGGCCCTGGTTCTCCAC  
TGCCACATCGACTGGCACTCCAGGCCGGCTTCCGCTCGTTTTTCCGAAGACACGGCGACGTCGCGCGAACGTCGTG  
CCTCCTCCGCGTGGGACAGCCTGTGTCCGACTTACGATGCCCTCACCCCTGACGAACTCGGCGGGGAGACCTAA

>Pa\_lcc4\_gen  
ATGACGCGCATTTCATCTCCTCGCGACGTTTCGTGTGCTCTCCATGTCGCTCCGGGCCCTTGGCGCCGTTGGTCCCACCACC  
ACTCTGGATATCGTCAACGTTTCAGATGGCCCCAGATGGCTTCAACGTAAACCGCGAGTAAGTTGCATTATCATCGGCAAAC  
ATGGAGGGGCTGATATGTTGCTTTTCACTACTGTCGCTGGCACCAACGGTGGCGGGACCTTCCCTGGCCCGCTCATC  
ACCGGCAACAAGGGTGACAACCTTCCAGATCAATGTCAACAACCGACTTCCAGACGTGGCCATGCTCAAGACGACGTCCATC  
GTATGTTACACGCGGTTTCGATGACAATGTTTTCTTAGTCTGACAATCGTGGACACGGTAGCATTGGCACGGGTTGTTCCA  
GAAGGGCACTAACTGGGCGGACGGAGTGGCATTGTTACTCAATGCCCATCGCCAGGGCAACTCCTTCTGTACAACCTT  
CGAGCTGCCCGACCGCCGGGACCTTCTGGTACCCTCCACTGTCTACTCAATACTGTGATGGATTGCGCGGTGCACT  
GGTTGGTGAATATCTCAAATTGGACACGTGTATATACATGTTGCTGACATCACTTGACAGTTTATGATCCGAATGACCCCTC  
ACGCAAGCCTTTATGATGTGGACGATGGTATGTGAATCGCTTTCGATTTAAAATTAATAACATGCCGATCTTCTCTAGACA  
CGACTGTGATCACCCTCGCTGACTGGTATCACGCACTCGCTCCCACAATCGCTGTTGGGTCCGTTGATCTGTTTTATCAG  
CGCTCTTCTTTATCTCATCAATTTCAATATTAGTGTGGCGGACTCGACACTGATCAACGGATTGTACGTCTATCTTCTTTC  
TCTCGGAACGATGCTGTGGCTCATCCCGCTCGAAGGGGCGGATACGGAGGCGCTGGTGGATCATCGTCTGACCTCGCGGT  
GTCTCGGTCACACAGGGCAAGCGCTACCCTTCCGCTGGTAAGCCAGTCTCCCGCTACCGCCAGGCTCAGCCAGCTA  
ACGACCTGCAGGTCTCGATCAGCTGTGACCCAAGCTTCACTTTCCAAATCGACCGACACAACCTTCCCGTACGTACTGACC  
CACCTTTCACGAAACATCCTCGCTCATCGGACCTTTCGTGTGCCACAGATCATCGAATCCGATGGCATAAACACGCAGC  
CGCTCGTGTGACGACTGACGATTTTCGCGCCAGCGCTACTCCCTCGTCTCTCCGCGACCGCCGTTGGACAACCT  
ACTGGATCCGTGCGGACCCGAGCAACGGCCCGCGACCGGGTTCGATGGCGGGATCAACAGCGCCATCCTGCGCTACGTCG  
GTGCTAACGAGACCGAACCGACCGCCTCAGGACACCGCCAGTGTCCGCTCGTCCGAGACCGATCTGGTGGTATGTTTTT  
TCTCTCATCTCGTTGAACATGAAATGTTGATCGGTTTGGATGTCAGCCTTCGGAGAACCCCGGTGTCACCCGGCAGCGGT  
CGACCCACTGCGTGCATGCGCGGACGCTCAACATCAACATGAAGTACGACTTTCGTAAGTCCACCTTCTCCACCCATCC  
CTCATCGCCGTCTCTGACGCACCTTCCGCGCAGAACCTGCACGGCGACTTCTTGTTCGACATTAACAACGTGACGTTTCA  
CCCTCCGACGGTCCCGTGTGCTCCAGATCCTCAGCGCGCGCAAGAAGCGACTTCGCTCCTGCCAACGGCAGCGTGT  
CTCCCTGCCAAGAACAGCTCCATCCAGATCTCGCTTCCGGCAGGCACGACCGCCCCGCGCGGGCGGCCCGCACCCCTT  
CCACTTGACCGCGTACGTCTCCCTCTCTCCCTTTCATCGATTTTCGTGCGATACCGGATACCGCTTTCACGACCGGTT  
GACGTGATCCGCGCGCGGGCCAGACGGACTACAACCTTCGACACCGCCCGCGGGGACGTCGTGACGACCGGAACAAC  
GGAGACAACCGTACCGTAAAGCTCTTCCCTCCCTTCTTCCACCGCTTCTTCTCATCTTCCATGCGTTTCATGGTTTTT  
ACCAGATCCGTTCTTACGGACAACCTTCGCGCCCTGGTCTCCACTGCCACATCGACTGGCACCTCCAGGCGCTTCG  
CCGTCGCTTTGCGGAAGACACGGCGGACGTCGCGCGCAACGTCGTGCTCCTTCCGCGTGGGACAGCCTGTGTCCGACTT

ACGATGCCCTCACCCGTGAGTTTTTTTCTTCCGTTTCTTCTTCCCGTTCGATATGGGTGGCTGACGGGATGCATTTCGT  
CGTTTTGCAGCTGACGAACTCGGCGGCGAGACCTAA

>Pa\_lcc4\_prot

MTRIHLLATFVSLSMSLRALAAVGPPTTLDIVNVQMAPDGFNVTRDTRVAVGTNGAGTFPGPLITGNKGNDFQINVNNQLSD  
VAMLKTTSIHWHGLFQKGTNWADGVAFVTQCPIASGNSFLYNFDVDPQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGALVVYDPNDPHAS  
LYDVDDDTVITLADWYHALAPTIAGVADSTLINGLGRYGGAGGSSDLAVVSVTQKRYRFRVLVSI SCDPSFTFQIDQH  
NFTIIESDGINTQPLVVDQLQIFAAQRYSLVLSADQPVDNYWIRADPSNGPPTGFDGGINSAILRYVGANETEPTTQDPTA  
SAPLVEDTLVPLENPGVTGDASTHCVDADVNNIMKLDNFLHGDFLFDINNVSFIPPTVPVLLQILSGAQEATSLLPNGSV  
YSLPKNSSIQISLPAGTTAPAAGGPHPFHLHGHAFDVIRAAGQTDYNFDTPPRRDVSSTGTTGDNVITRFFTTDFNGPWFLH  
CHIDWHLQAGFAVVAEDTGDVAANVVPSSAWDSLCPPTYDALTPDELGGET

## Secuencias LCC5:

>Pa\_lcc5\_cds

ATGGTCTCTCGTTTGCAATCCTTGGTTCCTCGCTCTTGCCGTGCGAGGCGTTTTTGCCTCGATCGGCCCGTCACCGAC  
CTCAACATCCAGAGTGCCATCCTTAATCCGGATGGCTCGGTTTCAGAGAGGTGCTGTTACCGCTGAGGCGGCGCCGTTGGC  
CCCCATTTGTTCGGCAACAAGGGCGATAAATTCCAGATCAACGTCGTCAACTCCTTGTGCAACAGCACCATGTTGTGACC  
ACTTCGATCCATTGGCACGGTATCTTCCAATCCGGCACTAACTGGGCAGACGGACCTGCAGGCGTCAACCAGTGCCCCATC  
GCATCCGGCAACTCGTTCCTTTACGATTTTCGACGTCGACGTCAGGCGGTTACCTTCTGGTACCCTCCACGACGGTACG  
CAGTACTGCGACGGTTCCTGCGACCGTTAGTCGTGTACGACCTACGACCCGTCACCGACCCGTCACCTGGATGACTACGATGTCGATGAC  
GATACCACGGTCACTACTCTATCAGACTGGTACCACGACGTTGCCCCACCATTGCTTTCGGTACCTCCGATGCCACCCTC  
ATCAACGGCTTGGGCCGTTACTTTCGACGGCACCAACGTGAATGACGCCGACCTCGCGGTTCATCAGCGTCGAGCAGGGCAAG  
CGCTACCGCTTCCGCTTGTTCGATCTCTTTCGACCCCAACTTCACCTTCAGATTGATCAGCACAACTTCACGATCATC  
GAGGTCGACGGTGTCAACCACGAGCAGCTCACGGTCGACTCCCTAGTCATCTTCGCCGGCCAGCGCTACTCGGTATCCTC  
ACCGCTGACCAAGGCGTCGACAACCTACTGGATCCGTCGCGACCCGCAACAACGGTAACACCGGCACGGACTTGGGCCTTAAC  
TCGGCCATCCTGCGCTACGTCGGTGCACAGACAGCCACCTACGACACAGGACACCAGCGTCAACCTCTCGTCGAG  
AGCAGCCTTGTCCCCCTTGAGAACCCCGGTGTGACCGCGGCGACGACACCAAGTGGGTTGACTGCGCCGACTACAACCTC  
CACCTCGACTTCACCTTCAACGGAACCTTCTACACCAACGGATTACCTGGACGACCCCAACAGCCGGTGTCTCTCCAG  
ATTCTCAGCGGCGGACGCTCCGCTTTCAGACCTCCTCCCGCTGGCAGTCTCTACGCCCTCCCGCCAACAGCTCCATCCAG  
CTCTCCATGGCCGGTGGTGCCTTCGCCGGCAACCCCAACCCCTTCCATTTGCACGGCCACACCTTCGACGTCGTCGCGCC  
TCCGGCAATCTGACTACAACCTGGATCAACCCGCCCCGCGCGATGTCGTCAGCACCGGCCAGACTGGCGACAACGTCACG  
ATCCGCTTCGTCACTGACAACCTTGGCCCTGGTTCCTCCATTGCCACATTGACTGGCATCTCGAGGCTGGCTTCGCCGTC  
GTCCCTGGAGGACTCAGGCGACGTCGCGGCAATGTCGCGGTTCCCGACTCGTGGAGTGATTTGTGCCCGACCTACAAC  
GACCTCACCGCTGATGACCTTGAGGCGAGGATTAG

>Pa\_lcc5\_gen

ATGGTCTCTCGTTTGCAATCCTTGGTTCCTCGCCCTTGCCGTGCGAGGCGTTTTTGCCTCGATCGGCCCGTCACCGAC  
CTCAACATCCAGAGTGCCATCCTTAATCCGGATGGCTCGGTTTCAGAGAGGGTCAGCGAACTCTCGATTGGTTATATTACAC  
GGTTTATCTGACGATGTAACCTTGCAGTGTGTTACCGCTGAGGGCGGCGCCGTTGGCCCCCTCATTGTTCGGCAACAAGGT  
AACTCCTTCCCTCCGCGCTTTCCTCTTCGCTACTCACAATCGATCATAGGGCGATAAATTCCAGATCAACGTCGTCAACTCC  
TTGTGCAACAGCACCATGTTGTTGACCACTTCGATCGTGAGTTGCCGTCATACGCTATGGAATTCGCGCGGTGATTGGCTT  
CGAAGCATTTGGCACGGTATCTTCCAATCCGGCACTAACTGGGCAGACGGACCTGCGGGCGTCAACCAGTGCCCCATCGCAT  
CCGGCAATTCGTTCTTTACGATTTTCGACGTCGCGGATCAGGCGGGTACCTTCTGTTACCCTCCACGACGGTACGCGAGT  
ACTGCGACGGGCTCCGTGGACCGTTAGTCGTGTACGACCCTAGCGACCCGTCACCTGGATGACTACGATGTCGATGACGGTG  
AGTAGCTCGGCACTTACTATGTCGAAATCGTGTCAATCATGTCGCGATCTCAGATACCACGGTCACTACTCTATCAGAC  
TGGTACCACGACGTTGCCCCACCATTGCTTTCGGGTGAATAGACACCTGCTTATGTTATGATTGTACCAACTAACCTTTC  
AACAGTACCTCCGATGCCACCCTCATCAACGGCTTAGGCCGTTACTTCGACGGCACCAACGTGAATGACCCGACCTCGCG  
GTCATCAGCGTCGAGCAGGGCAAGCGCTACCGCTTCCGGTAAGATCAACCACTCAGCATGCCAGACATTTACGCTGATCCC  
TGTCCCCGATAGTCTTGTTCGATCTCTTTCGACCCCAACTTCACCTTCAGATTGATCAGCACAACTTCACGGTTTGTCT  
ATGCGCTCGTCTCTGCCAGTCTTATTGGCTCATGTCGCTGCAGATCATCGAGGTCGACGGTGTCAACCACGAGCAGCTTAC  
GGTGCAGTCTCTTNNNNNNNNNCCGGCCAGCGCTACTCGGTATCTCACCCTGACCAGGCGGTCGACAACCTACTGGAT  
CCGTCCGCAACCAACCGTAACACCGGCACGGACTTGGGCTTAACTCGGCCATCCTGCGCTACGTCGGTGCACCAACGA  
GACCGACCCACTACGACACAGGACACCAGCGTCAACCTCTCGTCGAGACGACGCTTGTCTGTAAGCTCGCACTAACCTTTC  
TCAGGGTCAACTCAAATGATCGTTCTGTTTCAGCCCTTGAGAACCCCGGTGTGACCGGCGGCGACGACACCAAGTGCCTT  
GACTGCGCCGACTACAACCTCCACCTCGACTTCACCTTCAACGGAACCTTCTACACCAACGGATTACGAGAGAATTCACCT  
CAATTCCAGTATCTTTCGACGACTGACCTCATGTCATAGCCTGGACGACCCCAACAGCCCGGTGCTCCTCCAGATTCTCA  
GCGGCGGACGTCGCTTCAGACCTCCTCCCGCTGGCAGTCTCTACGCCCTCCCGCCAACAGCTCCATCCAGCTCTCCA  
TGGCCGGTGGTGCCTTCGCCGGCAACCCCAACCCCTTCCATTTGCACGGCCACACCTTCGACGTCGTCGCTGCACCGGGCG  
AGACCACCTACAACCTGGGCAACCCGCTCGCCGTGACGTCGTCAGCTCGGCGACGACGCGCTGACGCGTACACCAACA  
ACGTCACCGTCCGGTTACCACCGACAACAGCGGTCCTGGTTCCTCCATTGCCACATCGATTGGCATCTGGGCACCGGCC  
TCGCGATCGTCTTCGTTGAGGACTTCGCCGACGTCCTAGACTGAGTCCCCAGCACTGCCTGGTTCGGACCTCTGTCCCA



GACACGGGCGACGTCTCCTCGAAGGTCTCAGTTCCTCCAGTCTGGAGCAACCTGTGCCCCACCTACAATGCCCTTACTGGT  
GAGCTATTTCCCGTCACTTCGTTGTCAATAATGATGACTGACGTACTTGCAGCTGATCAACTTGGCGGCGAGGACTAA

>Pa\_lcc6\_prot

MARFQSLAAFVTLMSALGAFATAGPIATIDIVNRELAPDGFNRSTVLAGTGGVGTFFGPLITGFKGSHFLLNVNQLDDT  
TMLKSTTVHWHGLFQKGTNWADGPAFVNQCPIASGNSFLYDFTVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGALVVYDPLDPYRLL  
YDIDDESTVITLADWYHAVAPTIAGVADSTLINGLGRYAGGPSSDLAVISVIKGLRYRFRVLSISCDPNFTFQIDGHNFT  
IIEVDGVNHEPLEVDVQVIFAGQRYSIIVKADQKIDNYWIRANPNNGAAQGFANGINSAILRYVGAPAVEPTTTQDSTAP  
LVETALVPRENPGAPIPASQRCVDCADVNIINLALDFNLNGDFLFNINGVTYTSPVTVLLQILSGAQSATDLLPAGSVYTL  
PKNSTIQTLTPAGTTPAAGGPHFHLHGHTFDVVRASGQTDYNWINPFRRDVSVTGVAGDNVTIRFTTDNYGPFVFLHCHI  
DWHLEAGFAVVFEDTGDVSSKVSVPQSWSDLCPYNYALTADQLGGED

## Secuencias LCC7:

>Pa\_lcc7\_cds

ATGGGACGCTTTCAATCTTTGCGCGTCTGCGGTCTTGCTTTGCTTCGTTAGCAATTCTCTTGCAGGCATCGGCCCATC  
GCAACGATTCTATCGTGAACCGGAACCTATCTCCTGATGGCTTCCAACGCTCAACTGTACTTGCAGGCGGTACCTTCCCT  
GGGCCAACGGTCACGGGATTCAAGGAAACGAGTTCAGCTCAACGTCGTGAATCAACTGCAAGATGTCACCATGCTGAAG  
TCGACCTCGATTTCATTGGCATGGCTTCTTTCAGAAGCATACCAATTGGGCTGATGGCCCCGATTCGTGAACCAAGTGGCCG  
ATTGCTACCGGCCATTCGTTCTCTGACGATTTCAAGGTTCCAGATCAAGCAGGAACGTTCTGGTACCATTACATCTCTCT  
ACGCAATATTGTGACGGACTGCGCGGCGCATTTGTGGTCTATGATCTCTTTGATCCGCACAGGCTTCTGTACGATATCGAC  
GATGACAGCACCATAATCACACTCGCGGATTGGTACCATGCAGTTGCACCGACCATTGCAGTAGGCGTCGCGGATTCCACC  
CTGATCAATGGACTTGGCCGCTATGCAGGTGGACCGTCATCCCTCTTGTGCTGCTACATGTCATTAAGGGTCTCCGCTAC  
CGTTTCCGCTTGTTCGATCTCATGCGACCCGAATTCACGTTCCAGATCGACGGTCACAAGTTCACGATCATCGAAGTT  
GACGGTGTCAATACACAACCCCTTGTGGTGGACCAATCCAGATTTTCGAGGCCAACGGTACTCGATTGTGATGAAGGCG  
GATCAACCAATCAAAACTACTGGATTGCGCGCAACCCCAACAACGGTGCAGCGCAAGGATTTGCCAACGGTATTAATAGC  
GGTATCCTTCGCTATTTGGGTGCATTACCTCGTGAGCCACGACCAGCAAGACACCCCTAAGGCTCCTCTTGTGGAGGCC  
AACCTCGTTCCTTTGGAAAACCCGGGGTATAGGCCGCAATGTGTTGATTGTGCGGATGTCAACTACAATCTGAAACTA  
GACTTCAACCTGCACGGTGACTTCAAGTTCGACATCAATAACGTACATTCGTGCCCTCCGACTGTGCTGTGTTGTTGCAA  
ATTTTGAGCGGCGCACAGACCGCCAGCAGTTACTACCGCTGGAAGCATTTACCCGTTGCCGAAGAATTGAGTATTTCAG  
CTATCGTACCCGAGGCACAACCCGCGCCAGCTGCGGGCGGACCCCAACCTTTCCATCTTCATGGGCATAACTTTGAGGTC  
GTGAGATCTGCGGGGCAAAGCACATACAACTTCGATAACCCCTCCTCGTGCAGCGTTCGTTAGCACCGGTGTATCTGGTGC  
AATGTTACTATTTCGATTCTTCACAGACAATGCTGGTCTTGGTCTTGCAATTGTCATATCGATTGGCATCTCGAGGCTGGC  
TTTGGGTAGTCATGGATGAAGCTCAAAGTGATGTCAAGGCGCAGGTTCCGGTTCCTGCTGCATGGAGCCAGCTTTGCCCC  
ATCTACGACGCACTTAATCCACACAGATTGGTGGCATCAACTAA

>Pa\_lcc7\_gen

ATGGGACGCTTTCAATCTTTGCGCGTCTGCGGTCTTGCTTTGCTTCGTTAGCAATTCTCTTGCAGGCATCGGCCCATC  
GCAACGATTCTATCGTGAACCGGAACCTATCTCCTGATGGCTTCCAACGCTCGTAAGTACAACGGCGACGACAAAAATGA  
TGTATGTTCAACATCCCTCAGAAGTACTTGGCGGGTACCTTCCCTGGGCCAACGGTCACGGGATTCAAGGTAGGGCA  
TTTGGTACAACATCGAATCGGCATGAATGAACCGCTGCTAGGGAACGAGTTCAAGCTCAACGTCGTGAATCAACTGCA  
AGATGTCACCATGCTGAAGTGCACCTCGATTGTGAGTGATGATTTATCATCGCGTTTCACCGAGAAATTGATGCATTATCA  
ACAGCATTTGGCATGGCTTCTTTCAGAAGCATAACCAATTTGGGCTGATGGCCCCGATTCGTGAACCAAGTGCACGATGCTAC  
CGGCCATTCGTTTCCGTACGATTTCAAGGTTCCAGATCAAGCAGGAACGTTCTGGTACCATTACATCTCTCTACGCAATA  
TTGTGACGGACTGCGCGGCGCATTTGTGGGCGAGTAGCACTTCTTCGCGGGCGTGCACATCGCCTGATCTCTATTATACAG  
TCTATGATCTCTTTGATCCGCACAGGCTTCTGTACGATATCGACGATGGTAACAATCATCTGCTGTGCGCGATCTCTACTT  
GCCCTTGACATCTTTGAAGACAGCACCATTAATCACACTCGGATTTGGTACCATGCAGTTGGTGGCTCTTTGATTTATTG  
CAGGTTATGGCTCTATGCTAACAAGCTTCCATCTAGCACCGACCATTGCAGTAGGGTATGGCTACACATTCGAATATTGT  
TTGACGTGACTGATACAGCATAGCGTTCGCGGATTCACCCCTGATCAATGGACTGTGGGTGATCTTGTTCACGCAAAAGTG  
CGTACACTAATGCTCCGACCGAAGTGGCCGCTATGCAGGTGGACCGTCATCCCTCTTGTGCTGCTACATGTCATTAAGGG  
TCTCCGCTACCGTTTCCGCTTGTGAGCACTAAGAAGCCTCATTGCGATTCCGACGTAGTAACATGCTATAACAGGTTTCG  
ATCTCATGCGACCCGAATTTACGTTCCAGATCGACGGTCACAAGTTCACGGTGCCTTACCTCAGTTTCTCAGTACAAACT  
TAATTTTGACATTTTCCCGAGATCATGAAGTTGACGGTGTCAATACACAACCCCTTGTGGTGGACCAATCCAGATTTTC  
GCAGTAAATAAGCCATTGTCAATTAGAGCTTGAGGAAACATGCATCTGATTGGTACATACGTAGGCAACCGTACTTCGAT  
TGTGATGAAGGCGGATCAACCAATCAAAAATACTGTATGTGGTGTTCATATGTTGCTCAAGGACAAATATATTGACCATG  
GATTCAAAAGGGATTTCGCGCAACCCCAACAACGGTGCAGCGCAAGGATTTGCCAACGGTATTAATAGCGGTATCCTTCGC  
TATTTGGGTGCATTACCTCGTGAGCCACGACCAGCAAGACACCCCTCAGGCTCCTTGTGGAGGCCAACCTCGTTGTA  
CGAACAGCCAAATTTCTCTCATTCTCCTACTCAGCCATTTTCAGCCCTTTGGAAAACCCGGGGTATAGGCCGCAAAAT  
GTGTTGATTTGTGCGGATGTCAACTACAATCTGAAACTAGACTTCGTGAGATCTCATTACAAATATCTGACCATGCAATGC  
TGACGATGTTATGCATAGAACCTGCACGGTACTTCAAGTTCGACATCAATAACGTACATATCTGCTGCCCTCCGACTGTC  
TGTGTTGTTGCAAAATTTGAGCGGCGCACAGACCGCCAGGCTTACTACCGGCTGGAAGCATTACCCGTTGCCGGAAGAA  
TTCGAGTATTACGCTATCGCTACCCGAGGCACAACCCGCGCCAGCTGCGGGCGGACCCCAACCTTTCCATCTTCATGGGGT

CAGTCGCAGTTCTCGTTGATCACTCCCAATACTCAATCCGTCTCCTAAACCTAGCATAACTTTGAGGTCGTGAGATCTGCC  
GGGCAAAGCACATACTAAGTTCGATAACCCCTCCTCGTCGCGACGTCTAGCACCAGGTGATCTGGTGACAATGTTGTAAGC  
GCCCTGTACTTGTGATAAATTGTTTCATCTCCTCAAGAAAAACCCCGCAGACTATTTCGATTCTTACAGACAATGCTGGT  
CCTTGGTCTTTCGATTGTCATATCGATTGGTACGAGCGACATCCCTCGCGTGACGATGTGACGAGTCAATCCCATTTCAG  
GCATCTCGAGGCTGGCTTTGCGGTAGTCATGGATGAAGCTCAAAGTGATGTCAAGGCGCAGGTTCCCGTTCTGGTATGCT  
GATATTTGCATCGCGATATTCATCAACTGATTATTCCTCGTCAGCTGCATGGAGCCAGCTTTGCCCATCTACGACGCACTT  
AATCGTAAGTACCCGACGCATGCATACCAAAACACAACCTGATTGAGGTGTCACGCTCTTAGCCACACAGATTGGTGGCATC  
AACTAA

>Pa\_lcc7\_prot

MGRFQSFVAVAALLS FVSNLSLIGPIATIPIVNRNLS PDGFQRSTVLAGGTFPGPTVTGFKGNEFKLVNVNQLQDVTMLK  
STSIHWHGFFQKHTNWADGPAFVNQCP IATGHSFLYDFKVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGAFVVDLDFPHRLLYDID  
DDSTIIITLADWYHAVAPTIAVGVADSTLINGLGRYAGFPSSPLAVVHVIKGLRFRFRLVSI SCDPNFTFQIDGHKFTIIEV  
DGVNTQPLVVDQIQIFAGQRYSI VMKADQPIKNYWIRANPNNGAAQGFANGINSGLIRYL GALPREPTTTQDTPKAPLVEA  
NLVPLENPGVIGRKCVDCAVDNYNLKLDFNLHGDFKFDINNVT FVPPTVPVLLQILSGAQTASQLLPAGSIYPLPKNSSIQ  
LSLPAGTTAPAAGGPHFPHLHGHNFEVRSAGQSTYFNDFNPRRDVSVSTGVSGDNVTRFFFTDNAGPWFHLCHIDWHLEAG  
FAVVMDEAQS DVKAQVVPVPAAWSQLCPIYDALNPTQIGGIN

## Secuencias LCC8:

>Pa\_lcc8\_cds

ATGAAGCAATTCGAGTCTTGTCTCGCTTCATCGTGTCTCTCTCTCTTTTGTACCTCCTCGCTTGTGGCATCGGTCCT  
ATCGCCAATTTGCCCATCGTCAACCAGGTCATCGCCCCGATGGCTTCAACCGATCCACGGTCTCGCCGAGGTGTCTTC  
CCTGGGCCACTCATTACCGGGCTCAAGGGCAGCGAGTTC AAGCTGAATGTT CAGAATCAGTTGACAGATATAACTATGTTG  
AAGTCGACAAGCATCCACTGGCAGGTTTCTTCCAGAAAACACGA ACTGGGCCGATGGCCCTGCGTTTGTGAACCACTGC  
CCCATTGCGCCCGCAACA ACTTCCATACGACTTCAAGGTCCTGACCAAGCGGGCAGCTTCTGGTATCACTCCCATTTA  
TCGACTCAGTACTGCGATGGTCTCCGCGGCGCCTTTTGTGTGATGACCTCTTGGACCCTCACCGACTTTTGTACGATATA  
GACGACGATTCTACTGTCATCACTCTTGGCGACTGGTACCATGCCGTCGCTCCTACTATTGCCGTCGGCGTCGCCGACTCC  
ACCCTCATCAATGGCCTTGGTCTGATGCGGGTGGCCCGTCATCTCCCTTGGCGTCTCCACGTCGTATGGGGTCTCCGT  
TACCGCTTCCGTCTGGTTTCCATTTCTGCGACCCGACTTACCTTCCAAATTGACGGCCACAAGTTCACCATCATTGAA  
GTCGACGGTGTCAACCATCAGCCGCTCGAGGTTGACTCGCTGCAGATCTTTGCGGGCAACGTTATTCATCGTGTGAAC  
GCTTATCAACCGTCAACA ACTACTGGATTCTGTCGGAATCCGAACAACCGGCGCGCTTCCGGTTCCGCAACGGAATCAAC  
AGCGCCATCCGTTACCTTACCTTGGCGGGTGCCTCCGAGCTACCACCCAGGACACTTCCACTCGCCGCTCGTGGAA  
GCTAACCTTGTACCCTGTCAAATCCCGGCGTCAATGGCCGAAATCGCTTACTGCGCCGATGTGA ACTACAACCTGGCT  
CTCGACTTCAACCTGAACGAGACTTCAAATTCAACATCAACGGGGCGTCTTTCGTTCCGCCCACGGTTCTGTCTCCTG  
CAGATCCTCAGCGGAGCCAGACTGCCAGCCAGCTGTTGCCTCAGGGAAGCTTGTATGCCCTACCAGAAGACAGCAGCATC  
CAGTTGTCGCTTCCCGCCGGCACCACAGCGCCACAGCCGCGCGCCCTCATCCGTTCCACTTGCACGGTACACGTTTGAG  
GTCGTCGCTTCCGCTGGGCAAACTACGTACA ACTTTGACAATCCTCCGCGCCGCGATGTCGTTAGCACCGGCGTGGCTGGT  
GACAACGTGACCATCCGATTCTTACGGACAACGTTGGCCCTGGTTCTCCACTGCCACATCGACTGGCATTGGGAAGCC  
GGTTTGGCGTTGTCTT CAGCGAAGATCAAGCAGACGTC CCCC GCGCAGGTTCTGTCTCCTTCCGCTGGAGTCAGCTTTGC  
CCCATATATGACGCATGACCCCAATGACTTGGGCGGTATTA ACTAA

>Pa\_lcc8\_gen

ATGAAGCAATTCGAGTCTTGTCTCGCTCCATCGTGTCTCTCTCTCTTTTGTACCACTCCTCGCTTGTGGCATCGGCCCT  
ATCGCCAATTTGCCCATCGTCAACAAGGTCATCGCCCCGATGGCTTCAACCGATCGTAAGTCTACTATGACTTCACTTAC  
TTCCAGTATTACACCCCATCAAGCAGGTCCTCGCCGAGGTGCTTCCCTGGGCCACTCATTACCGGGCTCAAGGTGG  
GCATATCGAGTCCAGTGGTTGGATGTCCAGTCTGACAGTCAACGTTTCAGGGCAGCGAGTTCAAGCTGAATGTT CAGAATC  
AGTTGACAGATATAACTATGTTGAAGTCGACAAGCATCGTAAGTACTAGCACCCCGAGCAACGCATATGTA CTACTCATCGAGC  
TCTTCATGCAGCACTGGCAGGTTTCTTCCAGAAAACACGA ACTGGGCCGATGGCCCTGCGTTTGTGAACCACTGCCCA  
TTGCGCCCGCAACA ACTTCCATACGACTTCAAGGTCCTGACCAAGCGGGCAGCTTCTGGTATCACTCCATTTATCGA  
CTCAGTACTGCGATGGTCTCCGCGGCGCCTTTGTGCGGTGCGTCCGGCTGATGGCACATATGTGTACTCTGTTAAAAACCTT  
ATCCAGTGTACTGACCTCTTGGACCCCTACCGACTTTTGTACGACATAGACGACGGTTAGTACTGTTTTAGGTTATATATGA  
ACTCAGAAAATGACGACATATGACAGTACTGACTGTACTCATCACTTTCGCGACTGGTACCATCGCCGCTGGTACTCA  
TCGTCATCCCTAGTAGCGAGCCTTTCTGACGATATGCCATAGCTCCTACTATTGCGCTCGGGT GAGTTTCTTGGGGAAGC  
TGATGGAATATCGAAAGTGACATTCGCGCAGCGTCGCCGACTCCACCCTCATCAATGGCCTGTGTGTATATCGCTGTCGTT  
CCAGACTGTCTACTGATCTGTCTGTCAGTGGTCTGATGCCGGTGGCCGTCATCTCCCTTGGCGTCTCCACGTCGTA  
TGGGGCTCCGTTACCGCTTCCGCTCTGGTAAACGATACCTAACTCGATCTACTAGTTGCGGACGTCGACTGATAACTCTCT  
GGACAGGTTTCCATTTCTTGGACCCGAACTTACCTTTCAAATGACGGCCACAAGTTACCCGTAAGCCCTGCGAGTGTG  
GATATTGGTTTATAACCTGAAGTCAATGATTAGATCATTGAAGTCGACGGTGTCAACCATCAGCCGCTCGAGGTTGACTCG  
CTGCAGATCTTTGCGGGTGGGACTCACTGCTGGTACTAAACGCATGCTAATACTCGACCGAAGGCCAAGCTTATTTCCA  
TCGTGCTGCACGCTTATCAACCGATCAACA ACTACTGTTAGTATTCAACCTCAGGTTTGGCGTGGGCTACTCAATGACTCT  
CAGGGATTCTGTGCGAATCCGAACAACGGCGGGCTTCCGGTTTCGCCAATGGAATCAACAGCGCCATCTGCGTTACCTTG

GCGCGGGTGCCTCCGAGCCTACCACCACCCAGGACACTTCCACCTCGCCGCTCGTGGAAGCTAACCTTG TAGTATGTCGAA  
TGCTTCTCACCTACATTGTAGTGTACTGATGTCTCGCTCAGCCACTGTCAAATCCCGGCGTCATTGGCCCGAAATGCGTTG  
ACTGCGCCGATGTGAACATAACCTGGCTCTCGACTTCGTAAGCAGCGTGCCCTTGTCCATGATGACGGGCGACAGGCTGA  
TAACGTTTCCAGAACCTGAACGAGACTTCAAATTCACATCAACGGGGCGTCTTTCGTTCCGCCACGGTTCCTGTCCCTC  
CTGCAGATCCTCAGCGGAGCCAGACTGCCAGCCAGCTGCTGCCCTCAGGGAAGCTTGTATGCCCTACCGAAGAACAGCAGC  
ATCCAGTTGTGCTTCCGGCCGGCACCACAGCGCCACAGGCGGGCGCCCTCATCCGTTCCACTGACAGGTGTAAGTGCC  
GAAGTCTTGTATNNNNNNNNNNNCTCTCAGCACAGTTCGAGGTGTCGCTTCCGTTCCGTTGGGCAAACACTACGTACAAC TTTGAC  
AATCCTCCGCGCCGCGATGTGCTTAGCACCAGCGGTGGCTGGCGACAACGTGGTATGTAGTCAGTTCCTATTCTGACTCT  
CGAATGTGACCTATTTGCCAGACCATCCGATTCTTACGGACAACGTTGGCCCTTGGTTCCTCCACTGCCACATCGACTG  
GTAATTTCTCATCCCCGGTGAACGTGGTTGGAACATCCAGTCGTTTGCCTTTAGGCATTTGGAAGCCGGTTTTGCGGT  
TGCTTTCAGCGAAGATCAAGCAGACGTCCTCCGCGCAGGTTCTGTTCCTGTAAGTCTCTGACCTAGCCCCCTCGGCACGC  
GGGTGCTGACAGCCGATATCTAGCCGCTGGAGTCAGCTTTGCCCATATATGACGCATTGACCCGTGAGTTCTTGGCGCT  
ATCAACACCCTGTTGGACCATACTGACCCGATATTTCCGAGCCAATGACTTGGGCGGTATTAACATA

>Pa\_lcc8\_prot

MKHFESLLAFIVLSLSFATSSLAGIGPIANLPVIVQVIAPDGFNRSTVLRGVFPGPLITGLKGFSEFKLVNQQLTDITML  
KSTSIHWHGFFQKTTNWADGPAFVNQCP IAPGNFLYDFKVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGAFFVYDLDLDPHRLLYDI  
DDDSTVITLADWYHAVPTIAVGVADSTLINGLGRYAGGPSSPLAVVHVWGLRFRYRFLVLSISCDPNFTFQIDGHKFTIE  
VDGVNHQPLEVDSLQIFAGQRYISIVLNAYQPINNYWIRANPNNGAASGFANGINSAILRXLGAGASEPTTQDSTSPVLE  
ANLVLPSNPFVIGPKVCDVNYNLALDFNLNGDFKFNINGASFPPTVPVLLQLLSGAQTASQLLPQGSYLYALPKNSSI  
QLSLPAGTTAPQAGGPHFHLHGHTFEVVRSAGQTTYNFNPNRRD VVSTGVAGDNVTRFFTDNVGPWFHLCHIDWHLA  
GFAVVFSEDDQADVPAQVVPVSAWSQLCPIYDALTPNDLGGIN

## Secuencias LCC9:

>Pa\_lcc9\_cds

ATGCTCGGTTTTTTCCTTCCGTTTTGCTATGCCTGGCAACGTCGGCATCAGCTGCTACGCTATCCTCAAACCCCTCAAAG  
GCGACCTCCACCGCGATCCTACAGGCGACGTCAACGATCACGGTGCAGAACAAGAAGCTAGCTCCTGACGGTTATTCTCGC  
GACACGGTAGTGGCAAATGGGGTTTTCCCTGCCCTCCCTTGATCGGTTACAAGGGAGGGAAGTTTGACCTCACCGTCAAG  
AACCAGCTTTCGGACACGGCGATGGACCTCCCGACGAGTATCCACTGGCATGGGTTGTCCAGAAGACGACGAACATACAG  
GACGGCGTAGACATGGTGACCCAGTGCCTATCGTACCTGGCCATTACATACAGTACAAGTTCCAGCGTCCCGGACCAGGCT  
GGTACATTCTGGTACCATTTCGATTACAAGACCCAGTACTGCGATGGTCTCCGTGGTCTCTGATCATCTACGATACGAAAC  
GATCCACATCGAGCTGTACGACGTGGACGACTTGAACACGATCATCACATTAGCGGACTGGTACCACATTGTCTCGCCG  
CTTGAGACTTTGGGCGCTGGCGCCGTGGCCTTCCCGACGCACTCTGATCAATGGCAAAGGTCGATCGCTCGAAACCCCTC  
GACGCGGACCTGGCTGTTATCACCGTGACGAAGGGCAAACGGTACCAGAAATGCGTTTGGTTTCTATCGCTGCCACCCGAAT  
TGGATATGGTCCATTGACTCACATACTATGACGGTCAATGAAAGTGGACGGCATCAACGTTCAACCGTACACGGTTGATCT  
ATTAGATCTATGCTGCCAACGCTATTCGTTTCATCCTGAATGCAAACCAACCCGTCGGAAACTACTGGATCCGCGCCTTG  
AGCAACCTCAGCCCGCTTGGCAGATCGGCGGCCTCAACAGTGCCATCCTTCGCTACTCTGGTGCCTCCCGCGGAGGAACCC  
GCCATTCCGACACCGCTCGAACCCTCAATGAACAGGCTCAAGCCTCTTCTGCTGCTGCCGCCCGGGAAGCGCG  
ACCAGGACGGCGCCGACGTCAACATTAACCTAGACATCGAGATCGACCCGCTACCCCTGCATCTACCGTCAATGGCTAC  
GCGTACGAGCGACCTCCGTTGCCGCTCCTCCTCCAGATCCTTAATGGAGCAAACCCCTCCGAGCTTCTGCCAAGGGAAGC  
GTATACTACGTGCCGAAGAACAAGGTTATCCAAGTATCGTTACGCGAGCTTGTCCGCGCCGTCGGCGGTCTCATCCGATG  
CACTTGCACGGTACCCTTCTCGGTATCCGCGAGTGGTCAACTCGTTCGATACAACACTACGTCGATCCGCTGTGCGAGAC  
ACCGTGTCCGCGGTTACCGTTGGCGATCTAGTTACTATTTCGCTTACCACCGATAACCCGGGACCTTGGCTCCTGCATTGT  
CACATTGATTGGCATTCAACGCGGGTGGCCATAGTCTTTGCCGAGGATCCCGCAGACACTTCCAGTGGCGATGCGCCC  
ACGACTCAATGGAATAACCTGTGTCCGGTATACGACAGCTACATCACGTCGTAA

>Pa\_lcc9\_gen

ATGCTCGGTTTTTTCCTTCCGTTTTGCTATGCCTGGCAACGTCGGCATCAGCTGCTACGCTATCCTCAAACCCCTCAAAG  
GCGACCTCCACCGCGATCCTACAGGCGACGTCAACGATCACGGTGCAGAACAAGAAGCTAGCTCCTGATGGTTATTCTCGC  
GAGTGAAGTGAATCCGCGCGACCGCGTTTTCTGTGGAGGCTCACGTCGGATCGCAGCACGGTAGTGGCAAATGGGGTTTTT  
CCTGCCCTCCCTTGATCGGTTACAAGGTGTGGCATGGTAGTTTACGGAAGGGATGTGGCTCACATCTTCCATAGGGAG  
GGAAGTTGACCTCACCGTCAAGAACCAGCTTTCGGACACGGCGATGGACCTCCCGACGAGTATCGATGACCTCAATGCACT  
CTATGTGACGCCATTCTCACTTGCTTCAATTTGTAGACTGGCATGGGTATGCATCGCGGCTATTCTCGACTGTGCTTCA  
GTTCTGACCCCTGCCCTCAGGTTGTTCCAGAAGACGACGAACTATCAGGACGGCGTAGACATGGTGACCCAGTGCCTATCG  
TACCTGGTTCGTGCTAGCGATTTCTGATCGTCTCTGATCATCGTTGTCTGCTAGGCCATTACATACGAGTACAAGTTTACG  
CGTCCCGGACAGGCTGGTACATTTCTGGTACCATTTCGATTAACAAGACCCAGTACTGCGATGGTCTCCGTGGTCTCTGGT  
GAGTACCCTCCGTCGTTAGCCGTGACCGTACACACCCGACACCGTGTAGATCATCTACGATACGAACGATCCACA  
TGCGAGCTGTGACGACGTGGACGACTGTGAGTACGGTACTTCGAACATCCCCGCCAGGATTTGAACCCGCTAGTGAACA  
CGATCATCACATTAGCCGACTGGTGGATTTCTTTCAGTGGTTCGCGGGATCGGCGAAGTGAAGTACTAGAAATCACAGGTACCA  
CATTGTCTCGCCGCTTGGACTTTGGGCGCTGGCGCCGTGGCGTATGTTTTTTTTCAGGATCCGGTATAGCAGGTCTCCTCA  
TTCACCTTCTAGCTTCCCGACGCCACTCTGATCAATGGCAAAGGTCGATCGCTCGAAACCCCTCGACGCGGACCTGGCTG





>Pa\_lcc11\_gen  
ATGGCTGCTTTCCTTCCTTCAGCGCTTGCTATGCTTCTGACAGCCGGTGTATGTCTGGCTGCTCTACCACCCAGACGAAT  
TTGCCATCGTGAACGCCGTCATCGCACCCAGACGGCTACCCCTCGTCCGTGAGTAAGCATTTCCTCCGGTGAACCTTCGCTA  
CGTTGACTATCTTTGAAGCGCAGTTCTTGCTGGAGAACATTTCCAGGTCCTCATTCGCGGCAGCAAGGTGCCATAGC  
ACGCATCTGGATTTGATCCACGCTGACGCAAATCAAGGGAGAAGAATTCGCTATCAATGTCCAGGACTACCTTCATGACCC  
AACAATGAACCGGACCACGACAGTAGTATGTAATCAGACTCCAGAATGAATCAAACGTTCTTATTTCCGTCGTCGCATGGC  
TAGCACTGGCATGGGATCAAGCAGCGAGATGGAACGGCCTACGCAGACGGGCCCATTTGTACGCAATGCCCTATTGCA  
CCCAGTCAGTCTTGATCAGCGACGTGTGAAATTTCTCCCTCATTTCGCTGTCAATTTGTCGCAACCTAGACCCTCGTTCCT  
ATACAAGTTAATCCACTACAGCAAACGGGCACTTACTGGTATCATTTCGCATGAATCTTTGCAGTACTGCGATGGACTTAG  
AGGTCGAAATATGCCCTTTACCAAATACTCATTCTCAGAAAACGATAGGACCGCTCGTCATTTACGATCCGAACGACCTT  
GCCAAGCATATGTACGACGTTGACGATGGTGTGCAAATGAATTTAGCCTTTTATTGTCTCACACTGACTCCCGGATACATCA  
GAATCCACGGTGATCACTCTATCGGACTGGCTAGTACTATGACTGGGTGTATAGAACACTGTTTTGACGTCAATCCACAG  
GTATCATAATGTCTCCAGCCAACTCCGATTCCGTTGTATGACCTTCACTCGAATGTCAACTGGCATTAAATTGACATGTAC  
TCGACTCATAGCCGGGCTTGGTCTACCTTAATCAACGGGAAAGGCAGATATCCTGAGGGACCCGACGTGAATCTAGCTACC  
ATCAATGTGGAACACGGAAAACGGTATGCCAATGGGGCTCGATCATGCCCGCTACTCTGGTCTCATGTAATCACAGATAC  
CGGTTCCGTTTGGTGTGATGAGGTCTGTACTTTGACATTGTTCCAGAGTCAATTTGATAAAGTGGGTTAAATTTACTGCCCT  
CAGTTGTGACCCAACTTCAACTTCTCCATTGACGGCACTCGATGACTGTACGTCGCGGTAATATTCTACACGTGCACCA  
TTGACTTGGTATATAGATTATCGAAGTGGATGGAAATAATGTACAGCCATTGGAAGTTGGCTCTCTCAATATTCTCGCTGG  
TAAGTTTCACTGACCGTCTCAGATAATTGTCTCTCATATATCGTTATATAATCAGCGCAGCGATACTCCTTTGTGGTGCGC  
ATCTATATCATATTATAGCGAAAAGTAATTTTATAACTTATGCGTGAAGCTGAATGCCAACAAACGTGTGACAACTACT  
GTGAGAGAAATCATCTCTGTGTTTCAGTCAGCAGTCTGATGCTTTACTGCAGGGATTTCGCGCGCAACCTAATGACGCTATG  
TACGATGGATTTTTCAACGGGGTGAACAGCGCCGTTCTGCATTACGTCGCGGCTAGCTCTGGCGAGCCCACCCAGAATGTC  
ACGTCCTCCGGACCGTTCTCTTAGAGACCAATCTGCATGTATGGCAGTTTCTCTATAACCAGTTACGGTTTTCATTGACAC  
CACACCCAGCCACTTATAATGCTGCTGCCGTGAGGGTGGTCTGTTCTCACTTCAAACGACCCATTGACGTTGACTTACACA  
GCCGCAAATGCCAAGGGGAGGCCGATACCTCAACCTTGCCTTCAACTTCGCAAGTCACATCTCCTGATCACACAC  
ACACATCTGACATTTTCCCCCTTCTAGACTGCAGGTCTTTTCACTGTGAACGGTGTTCCTTTCATACCACctcctgtccca  
gttttactccagatattgaaggagcaagactgctcagAGATTGCACCGGTGGGAAGTGTGTACACATTGCCGCGGAAT  
AAGGTTATACAGGTTTCGATGCCTGGCGCAACGTAGCTGCCATCGCGGTCTGTGAGTTGCACGCTTGAACATTCGGC  
TGTGATGCTTATCGATATCCGTAGCATCCACTACATCTGCATGGTGTATGGCCATCCTTTTCTCAAGCATATACCCTGTA  
CTGTGCTGTGACAGCAGCCTTCTCCGTTGTGAGGAGTGGCCGCTCCGAGGAGTACAACCTCCATAACCAGTTAAGCGTG  
ATACTGTCAGCATCGCGGGGCCAATGACAACGTACGATCCGCTTCGTTACCGTAAGGAAGCAGCTTCCCTTTTCGCGGAT  
ATACTGAACGCTCTTGCAGGATAATCCCGGACCGTGGTCTTGCATTGTCAcattGATCCTCACCTGAATGCAGGGTTCGC  
AGTCGGTATGGACTATCTTTGACGGTGTGGTCCGGCGCATTGAACATTTGCAATTAGTGTGTTGCTGAAGATGTCCCGGATA  
TTCCATCGACCGATCGAACACGGGTATATACGTTTCTTCATGGGAGCGCCGCTGGCACATTTGACTCAACGAACCTCAG  
AATCCTGGCGGACTTGTGCCCATCTTCGACTTGCTCCCTCCAGGGCAACTTAA

>Pa\_lcc11\_prot  
MAAFLLPSALAMLLTAGVCLAALPPQTNLPIVNAVIAPDGYPRPAVLGGTFPGPLIAASKGEEFAINVQDYLDHPTMNRRT  
TVHWHGIKQRDGTAYADGPAFVTQCP IAPNHSFLYKFNPLQQTGYWYHSHESLQYCDGLRGLPLVIYDFNDPAKHMVDVDD  
ESTVITLSDWYHNVSQTPIPFRAWSTLINGKGRYPEGPDVNLATINVEHGKRYRFRLVMSMCDPNFNFSIDGHSMTIEV  
DGNVQPLEVGLSLNLLAQRYSFVLNANKRVDNYWIRAQPNDDAMYDGFENGVNSAVLHYVGASSGEPQNVTSPPGFLLET  
NLHPLHNAAPQNAKGEADVYLNLA FNFTAGLFTVNGVVFIPPPVPLLQILKGAKTAHEIAPVGSVYTLPRNKVIQVSM  
GANVAAIGGPHPLHLHGHA FSVVRSAGSEYFNHNPVKRDTVSI GGANDNVTIRFVTDNPGPWFLHCHIDPHLNAGFAVVF  
AEDVPDIPSTDRTTESWRDLCPIDLLPPGAT

## Secuencias LCC12:

>Pa\_lcc12\_cds  
ATGATAGATACAGCGCTGCTCGTTCCTCTCTTTGTACGTTTGTCTTAGTGCATCCTCTACCCTGCATTACACCGCACGGGTG  
CGCAATCACTTTCTCCAACAGACGGCTCAATCGAAGCGGTGTTTTGGTGAATGGACAGTTCCCTGCACCCTTGATCTCC  
GCAACGAAAGGAGATCAGCTCTCTGTGAACGTGATGAACTCTTTGACGAACTCCAGCATGGAGTTAGGAACATCCATACAC  
TGGCACGGAATACTTACGACCGTACGGCGTATGCAGACGGCGTAGCCTTCGTTACGCAGTGTCCCATTTCGTCACCGACG  
TCGTTACAGTACAACCTTCGGGTTGACGAATCAAGCAGGCATTTCTGGTATCACTCTCATATATCGTTGCACTACTGCGAT  
GGCCTTCGGGACCTCTCGTGTATCAGATCCCAGCATCCACACCGTGCCTTTACGACGTAGATGATGAGAGTACAATA  
ATTACCATCGGCGATTGGTATCACCTTACGGCTACTTTGACAGCCGAATTTGCTCCAACCTCCGGAACGACAGTGATAAAT  
GGCCTCGGACCGTATGCCGGTGGACCGCTGGTGCCTCTTTAGTTCGTCACCGTCCAGCACGGTACTCGCTATCGCTTCCG  
GTGTTGAACACTCGCTGCTTCCCTTTTACACCTTTTCCATTGACGGGCACAAGCTCACCGTACTCGAAGCGGACGGAACC  
TCGGTTCCGGCTGTGACCGTTGATTCTATCGATATCAGCTGCGGGGACGGTACTCTGTTGTTGTTGACCGCAATCACCC  
GTCTCGAATTACTGGATACGAGCAAATCCGAACCTGGGCACGCTGGGCTTCGATAATGGAACGAACCTCAGCGATACTACGA  
TACCATGGGAACAGGATCTGCGACCTCTGGTACCTTCATGGATCGGAGACAAGGTCGATGTGCTCTCAACCTCGATATCG  
AAGAGGCCGGAGAGTTCCGTAACCTTACCGTGA

>Pa\_lcc12\_gen

```
ATGATAGATACAGCGCTGCTCGTTCTCTCTTTGTACGTTTGTAGTGCGATCCTCTACCGTGCATTACACCGCACGGGTC
GCGAATCACTTTCTCCAACCAGACGGCTTCAATCGAAGGTACGAACCTACTAATACTTTGTGGAACATGGAAGGGCAGTAG
GAACAGAGCTGAAGAGCAAATTTATAGCGGTGTTTTGGTGAATGGACAGTTCCCTGCACCCTTGATCTCCGCAACGAAAGG
AGATCAGCTCTCTGTGAGTGACAGAGTTAACTAAATGGAAAGAGCGCAGGCTCATTTTCATCCAAGGTGAACGTGATGAACTC
TTTGACGAACTCCAGCATGGAGTTAGGAACATCCATAGTTAGTGTCTTATTGCTTCTACTGAGTCCCTGGCCTATATCGC
TGAATCACTCGATAGCACTGGCACGGAATACTTCAGCACCGTACGGCGTATGCAGACGGCGTAGCCTTCGTTACGCAGTGT
CCCATTCGTCCCAGACGTGTTACAGTCAGTTTGATATATATTATGAGCAGAGCTACGTGTTGACCCGAGATATTTTTAGG
TACAACCTCCGGGTTGACGAATCAAGCAGGGTACATATATCGTTCCGAGCATCGCCATTCAGGGCTGACATACGTATCAGCAC
TTTTGGTATCACTCTCATATATCGTTGCAGTACTGCGATGGCCTTCGGTAAGACCATAACGGTAGCTTCAACTTTCCCTC
GCGTGATGACCAAGACATCGATGCAGGGGACCTCTCGTGATCTACGGTAAACTCGCTCAGGCTCCCTGTGCTGCACTAATCAT
AGCTAATCCTATCGGAAGATCCCGACGATCCACACCGTGCCTTTACGACGTAGATGATGGTGCCTCAGTATATTTGGTTGG
CTAGGTCGGAGACTCACTACCTTGTGCATGTTAAGAGAGTACAATAATTACCATCGCGGATTGGTACAATCCCTATGCATG
GCAACTCAGGCTTAGGAGCCTGATGATATACCTTGTTTAGGTATCACCTTACGGCTACTTTGACAGCCGAATTGCTCCAG
TACGTGCGGCCCCAAGTGTGCGATGTGGCTTACCCGCACTTGCAGACCTCCGGAACGACAGTGATAAATGGCCTCGG
ACGGTATGCCGGTGGACCGCTGGTGCCTCTTTCAGTCGTCAACGTCCAGCACGGTACTCGCTATCGCTTCCGCGTGTGAA
CATCGCGTGTTCCTTTTACACCTTTCCATTGACGGGCACAAGTCCACCGTATCGAAGCGGACGGAACCTCGGTTCCG
GCCTGTGACCGTTGATCTATCGATATCCATGCGGGTGGGTCTGGCTGGCAATCAGTTGGATTGTGTTGGTTCTGACCGT
TGAGAATAGGGCAGCGTTACTCTGTTGTTGGTGGAGTTGTGCCATCGTTCGACGTACGATTCAATTACATACTCGTTCCAGG
TTCACGCCAATCAGCCGCTCTCGAATTACTGTGTGCCAGGCAACGATCATGCCCCAGATCCCGTACTAAGGCATTGACG
CAGGGATACGAGCAAATCCGAACCTGGGCACGCTGGCCTTCGATAATGGTATGCTTACGATATGTAAAGCAACATATGAATA
CTCAGCAATGACACCGTAGGAACGAACTCAGCGATACTACGATACCATGGGGCAAGATCGGTCGATCCGGGTACCACCGC
AACCACGACTGATTTACTAAAAGAACAGGATCTGCGAGTGAGTACGGTATTTCTTGTGCTCGCATAGTTCTAACGTTCAA
TCAGCCTCTGGTACCTTACATGGGTGGGTGCGCCTGGTACTGGCTCTCCTAAATGTTCTGACTCATTACATAGATCGGAGC
AAGGTCGATGTGCTTCAACCTCGATATCGAAGAGGTGAAGAGGCCCTCAGGTTCTAGTTGAATCATCGAGGGAGTACTGA
ACGAGCATCGTTTAGGCCGAGAGTTCCGGTAACTTACCCTGA
```

>PA\_lcc12\_prot

```
MIDTALLVLSLYVCLVRSSTVHYTARVANHFLOPDGFNRSGVLVNGQFPAPLISATKGDQLSVNVMNSLNTSSMELGTSIH
WHGILQHRAYADGVAFVTTQCPPIRQTSFTYNFGLTNQAGTFWYHSHISLQYCDGLRGLVIYDPPDHPRALYDVDESTI
ITIGDWYHLTATLTAELLQPPETTIVINGLGRYAGGPLVPLSVVNVQHGTRFRFRVNLACFPFYTFSIDGHKLTVIEADGT
SVRPVTVDSIDIHAGQRYSVVVHANQPVSNYWIRANPNLGLTFDNGTNSAILRYHGNRICESETRSM
```

### 7.2.3.3 Secuencias de genes de referencia

#### Secuencias *act* (*actina*)

>Pa\_act\_cds

```
ATGGAGGACGAGGTCGCTGCTCTCGTGATTGACAATGGTTCGGAAATGTGCAAGGCTGGCTTTGCTGGTGACGACGCACCT
CGTGCCGCTTTCCCTCGATTGTGCGGCGTCCCCGTCATCAGGGTGTATGGTTCGGTATGGGTGAGAAGGACTCCTACGTC
GGCAGCAGGCTCAGTCCAAGCGTGGTATCCTCACGCTCAAGTACCCGATTGAGCAGGCATCGTCAACAACTGGGACGAC
ATGGAGAAGATCTGGCACCACACCTTCTACAACGAGTTGCGTGTGCGCCGGAGGAACACCCCGTCTCTTGACCGAGGGC
CCGCTCAACCCCAAGGCCAACCGAGAGAAGATGACCAGATCATGTTTCGAGACGTTCAACGCACCCGCGTCTACGTCGCG
ATCCAGGCGGTGCTCTCCCTCTACGCGTCCGGTCCGATACCAGGGTATCGTGCTCGACTCTGGTGACGGTGTACCCACAC
GTGCCCATCTACGAGGTTTCGCGCTCCCGCACGCCATCCTCCGTCGATCTTGCCGGCCGTGACCTCACGGACTTCCCTG
ATCAAGAACCTCATGGAGCGTGGTTACCCCTTACCACACCGCCGAGCGTGAAATCGTCCGTGATATCAAGGAGAAGCTT
TGCTACGTCGCCCTCGACTTCGAGCAGGAGCTCCAGACTGCCGCGCAGTCTCGGCGCTCGAGAAGAGCTACGAGCTTCCC
GACGGTCAGGTATCACCATCGGCAACGAGCGGTTCCGTGCCCGGAGGCGCTTTTCCAGCCCGCTTCCCTCGGTCTTGAG
GCTGTGGTATCCACGAGACGACCTACAACCTCGATCTTCAAGTCCGATCTCGATATCCGTGCGGACCTGTACGGCAACGTT
GTCCTGTCCGGTGGTACCACCATGTTCCCGGTATCGCCGACCGTATGCAGAAGGAGCTCACCCGCTCTCGCCGTCGAGC
ATGAAGGTCAAGATCGTCCGCCCCCGGAGCGCAAGTACTCCGTGTGGATCGGTGGATCGATTCTCGCTTCCGCTTCGACA
TTCCAGAACCTGTGGTCTCGAAGCAGGAGTACGACGAGTCCGGCCCGCCATCGTCCACCGCAAGTCTTCTAA
```

>Pa\_act\_gen

```
ATGGAGGACGAGGTCGCTGCTCTCGTACGTTGCGCGCTCCTTGTGTAGCGCGGTGTGACGCCATGATGGCCAGGTGAT
TGACAATGGTTCGGAAATGTGCAAGGCTGGCTGTGAGTGTCTCAGATTATATATTTCCCTTCAATGGTTGCTAACTCGGT
TTTTAGTTGCTGGTAGTTTTTCGAAGGTAAATAGACGATGCCGACTCTGAGACCTGCCCTAGGTGACGACGCACCTCGT
GCCGTCTTCCCGTAAGCTCCTCATCGACGAATATTTGCTCATGCTAAACGTATACTAGCTCGATTGTGCGCCGTCCCCGT
CATCAGGGTGTGATGGTCCGATGGGTGAGAAGGACTCCTACGTCGGGTACGTCGTAATGACTGCCCTCGGGCAGGGCTGC
ACAGCATCTTGTCTAATGTTATAACTCAGCGACGAGGCTCAGTCCAAGCGTGGTATCCTCAGCTCAAGTACCCGATTGAGC
ACGGCATCGTCAACAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCACCACCTTCTACACGAGTTGCGTGTGCGCCGGAGG
AACACCCCGTCTCTTGACCGAGGCGCGCTCAACCCCAAGGCCAACCGAGAGAAGATGACCAGATCATGTTTCGAGACGT
```

TCAACGCACCCGCGTTTACGTCGCGATCCAGGCCGTGCTCTCCCTCTATGCGTCCGGTCGTACCACGGGTATCGTGCTCG  
ACTCTGGTGACGGTGTACCCACACCGTGCCCATCTACGAGGGTTTCGCGCTCCCGCACGCCATCCTCCGTCTCGATCTTG  
CCGGCCGTGACCTCACGGACTTCTTGATCAAGAACCTCATGGAGCGTGGTTACCCCTTACCACCACGGCCGAGCGTGAAA  
TCGTCCGTGATATCAAGGAGAAGCTTTGCTACGTCGCCCTCGACTTCGAGCAGGAGCTCCAGACTGCCGCGCAGTCCCTCGG  
CGCTCGAGAAGAGCTACGAGCTTCCCAGTGGTACGGTTCATACCATTGGTAACGAGCGGTTCCGTGCCCGGAGGCCGCTTT  
TCCAGCCCGCTTCTCGGTCTTGAGGCTGCTGGTATCCACGAGACGACGTGAGTGGCTTTCCTCATACTACGAAGGTGCC  
TCGCTGACGAGTTCTACCTCTAGCTACAACCTCGATCTCAAGTGGATCTCGATATCCGTCCGCGACCTGTACGGCAACGTT  
GTCCTGTCCGGTGGTACCACCATGTTCCCGGTATCCCGACCGTATGCAGAAGGAGCTCACCGCGCTCTCGCCGTGAGC  
ATGAAGGTCAAGATCGTCCGCGCCCCGGAGCGCAAGTACTCCGTGTGGATCGGTGGATCGATTCTCGCTTCGCTCTCGACA  
TTCCAGAACCTGTGGTGTCTGAAGCAGGAGTACGACGAGTCCGGCCCGCCATCGTCCACCGCAAGTGTCTCTAA

>Pa\_act\_i5\_prot

MEDEVAALVIDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQVVMGMQKDSYVGDEAQSQRGILTLKYPIEHGIVTNWDD  
MEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNAPAFYVAIQAVLSLYASGRITGIVLDSGDVTHT  
VPIYEGFALPHAILRLDLAQRDLTDFLIKNLMERGFPTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQLQTAAQSSALEKSYELP  
DGQVITIGNERFRAPEALFQPAFLGLEAAGIHETTYNSIFKCDLDIRRDLYGNVLSGGTTMFPPIADRMQKELTALSFPSS  
MKVKIVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQNLWCSKQYEDESGPAIVHRKC

## Secuencias cyc (proteína de unión)

>Pa\_cyc\_cds

GTCGCCGTGCATCCGCGATCCTTGGCTGGCTCAGGTAGCACCCGCGGTCCCTCGACCTCCTCTTCAACCGCAACCTTGACGAT  
GAGGATTATCCTACTGCTGGACTTGCCTCCAGAAACCTTCTGCATATTTTATCCTATCTCGACCTCCCGGACTTGGCGAG  
CTGCCGTGCGGTTTGCACCTCCTGCGGGTCTTAGCAGCCGACCCGGTGTACATCATTACAGAATACGCGTCTGCGCACC  
CTCGCGGTGCGCCACGCCCTCTTTCGGCAGACCCCGCCACGGCCGACGGTTCGGCGAGCTCGTCCGCGCGCGGCGTATGCG  
TGGACTGGGCATCGAGCGACGCTGGCGTGCAGGTCTTTACTTCTACACCCACCTGTCCGTCAAACAATACGAGTCTCGCT  
ACGCATCCAGCGCACGCACACCGAGAACCTGCTAACACACCATCTCCGCGACTAGTGCTTGCGCCACGCCCGCGCACTT  
CCTGCGTCCCTCCGCGTGTGCCCCACTCGAACGCGAGTACGCCCTCACCCCGGCTCTCGCGTTGCTCCTTCCCGTCTGT  
CCGCAAGCTCAAATGGAGCTTGAACGCGACGCGCTATCCAGCGGTTTCAGAGACGCGCGCGGTCGGTTCGCGGCGTCCG  
CAAGTGGGTTGAGGGGAAGGGGCGCGGCTCGTGTGCGAGAGCGAGCAATACGGCTCGCGGTCTGCCCGGATGTGCGGAA  
GATCGTATCTTTCTTGAAGGACTCAACGCGCGGAACTAGCTTTCATGAATCATTGTACGAACGCTGTATGATACCACGAC  
CTGCCACTACCCGTTGCCGCTGTCACAATTCATTTATTTCTATGCACGGACGCCAAATACATACTTTTTTTGCTCTACTTG  
TAACCTCAGATCGACTTCGCGACGCGTGTCTTACTTTTTGCTCGAGCTCTTTGCTCCGCGAGCAAGCACCA

>Pa\_cyc\_gen

GTCGCCGTGCATCCGCGATCCTTGGCTGGCTCAGGTAGCACCCGCGGTCCCTCGACCTCCTCTTCAACCGCAACCTTGACGAT  
GAGGATTATCCTACTGCTGGACTTGCCTCCAGAAACCTTCTGCATATTTGTATGTCTTTCCCTCATGCTGAGCCAAAGCCC  
CTAAACCTGAACGGTGGAGCGCAGTATCCTATCTCGACCTCCCGGACTTGGCGAGCTGCTGCGGTTTGGCCACTCCTG  
CGGGTCTTAGCAGCCGacccggtgctacatcattacagaatacgcgtcgctcgCACCTCGCGCGTCCGCCACGCCCTCTTC  
GGGCAGACCCCGCCACGGCCGACGGTTCGGCGAGCTCGTCCGCGCGGCGTTCATGCGTGGACTGGGCATCGAGCGACGCTGG  
CGTGCAGGTCTTTACTTCTACACCCACCTGGTAAGTACAGCACATCCCCAACGATCCCTCGCGCCTCGTCCGAACCGCAGT  
CGCCGCGCCCGCAGCTCCGCTAATCGCATCTTTATCTCCGCTTCCGCTCGCAGTCCGTCAAACAATACGAGTCCCTCGCTAC  
GCATCCAGCGCACGCACACCGAGAACctgctaacacacccatctccgcccactagtgcttgcgcccacgcccgcgcaacttcc  
tgcgctccctccgctgctgcccgaacctcgaacgcgagtagcctcaccggctctcgcggttcgctccttcccgtcgctcc  
gcaagctcaaatggagcttgaaacgcgacgcgctatcCCAGCGGTTACAGAGACGCCCGCGGTTGGTTCGCGCGCTCGCCA  
AGTGGGTTGAGGGGAAGGGGCGCGGCTCGTGTGCGAGAGCGAGCAATACGGCTCGCGGTCTGCCCGGATGTGAGGAAGA  
TCGTATCTTTCTTGAAGGACTCAACGCGCGGAACTAGCTTTCATGAATCATTGTACGAACGCTGTATGATACCACGACCT  
GCCACTACCCGTTGCCGCTGTCACAATTCATTTATTTCTATGCACGGACGCCAAATACATACTTTTTTTGCTCTACTTGTA  
ACCCTCAGATCGACTTCGCGACGCGTGTCTTACTTTTTGCTCGAGCTCTTTGCTCCGCGAGCAAGCACCA

>Pa\_cyc\_i1\_prot

MRIILLDLPPETLLHILSYLDLPDLASCLRVCHELLRVLAAADPVLHRYRIRVAPSRVAHALFGQTPPRPTVGELVARGVM  
RGLGIERRWRAGLYFYTHLSVKQYESSLRIRQRTHTENLLTHHLRRLVLAPTPAHFLRSLRVLPLDEREYASPRLSRSLLPV  
VRKWKSLKRDALSQRFRDAGRGRGVAKWVEGKGRGLVCESEIRLAVCPDVRKIVSFFEGLNARN

## Secuencias cyt (citocromo c)

>Pa\_cyt\_cds

ATGCCCTTTCGCTCAAGGTGACTCCGGCAAGGGGCCAGCCTCTTCAAACCTCGTTGTGCTCAATGCCACACCGTCCGGTGGG  
GGTGAGGGCCACAAAGTCGGCCCCAACCTTCATGGTGTCTTTGGCCGAAGACCGGCCAGGCTGAGGTTTCTCTTACT  
GCCGGAACGTCAACAAGGGCATTACCTGGTCCGAGCAGACCCTGTTTCGAGTACCTCGAGAACCCCAAAAGTACATACCC

GGCACGAAGATGGCGTTCGCGGGCTTGAAGAAGGAGAAGGATCGTAACGACCTCATCACATGGTTGAAGGAGTCGACTGCA  
TAG

>Pa\_cyt\_gen

ATGCCCTTCGCTCAAGGTACGTGCCCGTCATCCAGGATGCGTGCAATACAGAACCTGACCGCTTTTCTGCAGGTGACTCCG  
GCAAGGGCGCCAGCCTCTTCAAACCTCGTTGTGCTCAATGCCACACCGTTCGGTTCGGGTGAGGGCCACAAAGTCGGCCCCA  
ACCTTCATGGGTGCGTAGAGCCTTCCGCTGCCACCTCATCGCGCGACGCTGATACCTCCGTGCAGTGTCTTTGGCCGCAAG  
ACCGGCCAGGCTGAGGGTTTCTCTTACACTGCCGCGAACGTCAACAAGGGCATTACCTGGTCCGAGCAGACCCTGTTCGAG  
TACCTCGAGAACCCCAAAAAGTACATACCCGGCAGCAAGATGGCGTTCGCGGGCTTGAAGAAGGAGAAGGATCGTAACGAC  
CTCATCACATGGTTGAAGGAGTCGGTGAGTGTGCCCCCGTCTCGTTGACCCAGACGTATCCGCTAAACGGATGATTCTT  
AGACTGCATAG

>Pa\_cyt\_prot

MPFAQGDGSGKASLFKTRCAQCHTVGAGEGHKVGPNLHGVFGRKTGQAEGFSYTAANVNKGITWSEQTLFEYLENPKKIYIP  
GTKMAFAGLKKEKDRNDLITWLKESTA-

## Secuencias *gdpc* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)

>Pa\_gdpp\_cds

ATGGTTAAAGTCGGCATCAACGGTTTTCGGTTCGTATCGGCCGTATCGTCTCGCAATGCGCTCCTCCACGGCGACATCGAG  
GTCGTGGCCGTCAACGACCCTTTCATCTCGCTCGACTACATGGTCTACATGTTCAAGTACGACTCCGTCCACGGTTCGTAC  
AAGGGCACCGTCGAGCACAAGGACGGCAAGCTCTACGTGAGGGCAAGCCCATCACCGTCTTCGCCGAGAAGGATCCCGCC  
AACATCCAGTGGGGCTCTGCCGGCGCTGAGTACATCGTCGAGTCGACCGGTGTCTTACCACCACCAGAGAAGGCCCTCGCC  
CACTTGAAGGGCGGCGCAAGAAGGTTCATCATCTCCGCGCCCTCGGCCGACGCGCCCATGTTTCGTCTGCGGTGTCAACCTC  
GACCAGTACGACTCGAAGTACACCGTTCATCTCGAACCGTCTGCACGACCAACTGCCTCGCGCCGCTCGCCAAGGTCATC  
CACGACAAGTTTCGGCATCGCGGAGGGCTCATGACCACCGTCCACGCCACGACCCGACCCAGAAGACCGTCGACGGGCCG  
TCGAACAAGGACTGGCGCGGCGGCCGTTCCGTCAACGGCAACATCATCCCTCTTCCACCGGTGCCGCAAGGCCGTCGGC  
AAGGTATCCCCAGCCTCAACGGCAAGCTCACTGGTATGGCCTTCCGTGTCCCACCCCTCGATGTTTCCGTTGTGACCTC  
GTCGTCCGCTCGAGAAGGAGGCGTCTACGACGAGATCAAGGCCCGCTCAAGGAGCGCGACCCGCCCGCTCGCGGGC  
ATCATCCACTACACCGAGGACTCGGTCTGTCGACCGACTTCATCGCTCGGACCGCTCCTCCATCTTCGACCGCTCGGCC  
GGCATCGGATCAGCAAGACCTTCGTCAAGCTCATCGCTGGTACGACAACGAGTGGGGCTACTCTCGCCGTGTCTGCGAT  
CTCTCGCTACGCGGCAAGAAGGACGGCGCTCAGTAA

>pa\_gdpc\_gen

CAGGTTAAAGTCGGCATCAACGGGTACGTCCGGACCGTTTTTCCCGCGGGAGTCGTTTGTGGATGATTGCTCACTGATAA  
TCCTCTCATGTGCCATCAACAGTTTTCGGTGAGTTTTCAATGGCTTCGATCGCGTTCCTTTTCGTTTCGTAGCTTACC  
GTGGATTCAGGTTCGTATCGGCCGTATCGTCTCGCAATGCGCTCCTCCACGGCGACATCGAGGTTCGTGGCCGTCAACGA  
CCCCATCATCTCGCTCGACTACATGGTTCATGTTCAAGTACGACTCCGTCCACGGTTCGTACAAGGGCACCGTCGAGCA  
CAAGGACGGCAAGCTCTACGTGAGGGCAAGCCCATCACCGTCTTCGCCGAGAAGGATCCCGCCAACATCCAGTGGGGCTC  
CGCCGGCGCTGAGTACATCGTCGAGTCGACCGGTGTCTTACCACCACCAGAGAAGTGGCTCTTTCTATCCATCGCCAAACG  
TATCATATGCTGACGCTGACGCTCGCTATGCAGGGCCTTGCCTTGAAGGGCGGGCCCAAGAAGGTTCATCATCTCCGC  
GCCCTCGCCGACGCGCCCATGTTTCGTCTGCGGTGTCAACCTCGACCGTACGACTCGAAGTACACCGTTCATCTCGAACGC  
GTCCTGCACGACCAACTGCCTCGCGCCGCTCGCCAAGGTCATCCACGACAAGTTCGGCATCGCGGAGGGCCTCATGACCAC  
CGTCCACGCCACGACCCGACCCAGAAGACCGTTCGACGGCCCGTTCGAACAAGGACTGGCGCGGGCCGTTCCGTCAACGG  
CAACATCATCCCTCTTCCACCGGTGCCGCAAGGCCGTCGGAAGGTTCATCCCGACCTCAACGGCAAGCTCACGTAAGC  
ATATTATCCTCCCTCTTCAATCCTCTGCGCACGCCACTTACGTTTCGTCGCCGAGTGGTATGGCCTTCCGTGTCCCGACCC  
TCGACGTTTCCGTTCGTTGACCTCGTTCGCGCTCGAGAAGGAGGCGTCTACGACGAGATCAAGGCCCGCGTCAAGGAGG  
CCGCGACCGGCCCGCTCGCGGGCATCATCGACTACACCGAGGACTCGGTTCGTCTCGACCGACTTCATCGGCTCGGACCGCT  
CCTCcatcttcgacgcctcgcccgcatcgcgatcagcaagaccttcgtaagCTCATCGCCTGGTACGACAACGAGTGGG  
GCTACTCTCGCCGTGTCTGCGATCTCTCGCCTACGCGGCAAGAAGGACGGCGCTCAGTAA

>Pa\_gdpp\_prot

MVKVINGFGRIGRIVLRNALLHGDIEVVAVNDPFIISLDYVMVYFKYDYSVHGRYKGTVEHKDGKLYVEGKPIITVFAEKDPA  
NIQWGSAGA EYIVESTGVFTTTEKASAHKGGAKKVIISAPSADAPMFVCGVNLDDQYDSKYTVISNASCTTNCLAPLAKVI  
HDKFGIAEGLMTTVHATTATQKTVDGPSNKDWRGGRSVNGNIIPSS TGA AKAVGKVI PSLNGKLTGMAFRVPTLDVSVVDL  
VVRLEKEASYDEIKAAVKEAATGPLAGIIDYTEDSVVSTDFIGSDASSIFDASAGIAISKTFVKLI AWYDNEWGYSRRVCD  
LLAYAAKKGDAQ



GACTTCATAGCAGCAACGGAATTCCCTGGTAGAGAATAAATATGCGGCGCCTGGCAAAGTCGCCATCAATGGAGGCTCCAAC  
GGAGGTTTACTCGTTGCTGCGTCAGCATTCAGGCTCCTGAAGGGACGTTTGGCGCCGTCGTATCCGAAGTCGGCGTACAT  
GACATGCTCAAGTCTCGCAATTCACCATCGGCCATGCGTGGAGGTCGGACTATGGCGACCCACAAAAACGGAGGATTT  
GATTTTCATCAAGCTTATTTCTCCACTACACAACGTCCCAACGGATAAGATGCTTCCGCTACGATACTGTTGACCCGGAT  
CACGATGACCGCGTCCCACTACATAGTTTTAAGCTTGCAGCGACCCTTCAACACCTTCAACCGCAAAGCAAACATCCT  
CTCCTCATCCGCATACAGAAGAAGGCAGGGCATGGCGGGCAAGTCTACGGAACAAGCCATCAAAGAAGCTGCCGATAAA  
TGGGGCTTCGTAGTGCAGACGATGGATTTGTCCCCGAAGCCAGAGAAGGCAGCGCATATTGA

>Pa\_pep\_gen

ATGTCTACAGTACCATTACTACTACTACCGCCGCTCTCTGGCCCCGCCGTACCCGCCCGCGCCGATCCGACCACGTC  
GACGTGTACGACAGCGGAAGGAAGGCAAGGTCCACGTCCCGGACCCCTTATGAGTGGCTTGAGCACGACGGCCCGGAGACC  
GAGGCGTGGACGACGGCGCAGGAGCGGTTTACGCGCGAGTTCTTGGACGCTATAACGGAGAGGAAGATCTTGGAGGACAAG  
ATCAGGGAAAATATCAACTATGCGAAGGTACGTTTTATATGCACGTCCGCGGGCGTAAGAGGGATGACCTCCTCTTTTATC  
CTCCGCCCCCTAGTTACGCGCACCCCTCGTTGAAGAATGATGGGCGTGGTATTGGTACTATAACAGGTGTCGTGCAATCA  
TACCCCATCCGCTCTGAACATGGATTCTGACGATCGGAACAGTGGGCTGCAGGGCGAGTACAGTACGCTGGTCAATCCTT  
GAACATGGCCGGAGCGTAACGATGTATAAAAGCCCTCTATCGCTCTCGGACTCCACGCGTCCCAGCTTACGAAAAGCCC  
GGAACGGACGCGCATGTTTTCTTCGATGTCGGTCTCATACTAACACTGCCCCGGATGCTTCAATCTGATTTCTCCCCG  
CCCGTCTCCTGATAGGCCAACCTTCTGCCGAGGACGGGACTGCGTCTCTTGGCTCAACTAGCTTCGCGCCATCCGGGAA  
ATACTGGGCGTACTCGGTGTCGCGATCAGTGGGCTAGATATCATTTTTTATCGCACACGAGAAATGACATATGGCAATCCA  
GGGACGCGATAGCGTGACCATATACGTCCGCCGACCTCGTCCCCGTTTTTCTCCGGTTCGCACGACGACGGCCGTCTACC  
GGATGAGCTCAAGTACATCAAGTCTCGTCGATCACCTGGGATCTCAAATGCGAAGGGTCTTCTACCAGGTACTGTGACC  
TTTTCATGTTACCTTAGCCAGCCACCCCCCTCTGATTGAGAATTTCTTGGGTTTTGGTCTGTAGAGGTTCCCCCAGC  
GCGACACGCTGGAGCTCGCGCAGAGGACAAGGTCCGGGCGGAGGAGCGAGAAGGACGAATACGGCAAGCTGTACTACCATC  
GCCTCGGCACGTTACAATGTCGGTTTTGTCGCGACCTTGTGGTGGCGCAGAGAGCTCACACGGCCGATTTGTTATCGGTT  
AGCCGACGACTACTCATCTTGAAGGATGACAACCCCTCGCAATACCAGTGGAGCGCGCATGTAGCCGAAAGTCGACGAG  
GTACCTCGTCGTCACCGTCAGCGCGGATACCTCCCAGGTTAGCGTTCGATTCTACCTCTTCCCAGTCTTCCGGCTATCAT  
CGCTTCTGAGGGCACCTGATCATTTCTATTCTGACAGAAAATCTCCTGTGGATCTGTGACCTGGCGAACAACGAGATC  
GGGCCGACATGAAGTGTACAAGTCTGGGACAAGTTGAGGCGTGTACACCGTGAAGCGGCGGATATGACGCGCA  
GTCACCTTCGCGTGGCGTGTATCGTCTTCCAGCATCGCAATGAAGGGACCAAGTCTACATTCACACGAACAAGGACGC  
CGACAGTTCGAAGTCAATCACNNNNNNNNNNCCCTGAGGACAAAGGCGCCTGTTTAGAGCAAGTCAAGGCTGTGTCCAAGG  
ACAGGCTAGCCGTCGTGTACAACGAAACGCTCAAGGATGAGGTGTACGTCACGAGCTCTCGTCCGGGAAACAGCTCGCC  
GCGTCCGCTCCGATTTCTGTTGGGACGATGTCGCTCAGCGGTGACCGCGCCATCCCTGGTTCTTCTGTCAACATGACGGCT  
TCACCACGCCGCCATCGTCGGGACGACGACTTTTTCGGTGGAGGTGGAAGGGGAGCGGTGGGCGATACGGAGGCAGGCCG  
ATGTGCAAGGGTTAAGGCCGGACGACTTTGTGCGCAGACGCGGTGGTATCCGAGCAAGGACGGGACGAAGGTGCCGATGT  
TTATCGTCCGTCATAAGCGACCAAGTGGACGGGACAGCCCTGCCGATACAGTACCGTGCAGGATATATGCGTTCCGATGCC  
TAGCACGATGCTCACTATGATGTTTGGGGTTTAGGTTATGGCGGTTTCGGGATCTCGGTCAACCCGTTTTGGAGCCAGCG  
CTCCTCACCGTTATCGAGAGGTACGGCGGTGTGCTCGCGGTGGCCAAATCCGAGGCGGAGGAGTTTGGCGAGCCCTGG  
CATCTGCGCGTCAAGGACGCAAGGTCGGTCCAGGACTCAAAGTCTGACTGGACTCAGCATGACAAGTCCCTGCGC  
GTCCTAGCACAATTGCTTTGACGACTTCATAGCAGCAACGTGAGCATCCTCATTGCACCCAGAAGCATGCCTTTCTGACGT  
TTGTTCCAGGGAATTCCTGGTAGAGAATAAATATGCGGCGCCTGGCAAAGTCGCCATCAATGGAGGCTCCAACGGAGGTAT  
GGCGCTTCCGTCGGTAAAGATAGCCTTTCTAACGATTACAGACCGCCGTCAGGTTTACTCGTTGCTGCGTCAGCATTC  
GAGCTCCTGAAGGGACGTTTGGCGCCGTCGTATCCGAAGTCGGCGTACATGACATGCTCAAGGCGAGTTCCTCTGCACCTA  
CATGTTCCCGCTCGCTGACGAACCCGATTCAGTTCTCGCAATTCACCATCGGTAATTCAAACTCTGTCTCTCATGCCTGG  
CGTTCTGCTGATGCTGAGGTTAGCCATGCGTGGAGTCCGACTATGGCGACCCACAAAAACGGAGGATTTTCGATT  
TCATCAAGCCTATTTCTCCACTACACAACGTCCCAACGGATAAGATGCTTCCGCTACGATACTGTTGACCGCCGATCGTG  
AGTGCCCGCGTCTGCTATACGCGCCGTCATCCACTGAAAATGCGTGAATGCTCTCACAGACGATGACCGCGTCTGCCAC  
TACATAGTTTTAAGCTTGACGACCCCTCAACACCTTCAACCGCAAAGCAAACATCCTCTCCTCATCCGCATACAGAAGA  
AGGCAGGGCATGGCGCGGCAAGTCTACGGAACAAGCGTGAGTTAACTAAGTCTTCCGCTTCATTTTCGATGCTGAGAAA  
TCCATGTCATAGCATCAAAGAAGCTGCCGATAAATGGGGCTTCGTAGTGCAGACGATGGATTTGTCCCCGAAGCCAGAGAA  
GGCAGCGCATTATTGA

>Pa\_pep\_prot

MSTSTITTTTAAALWPRPYPPARRSDHVDVYDSAKEGKVHVPDPYEWLEHDPETEAWTTAQERFTREFLDAI PERKILEDK  
IRENINYAKFSAPSLKNDGRWYWYNSGLQAQYTYLRSRSDSTRPDFTKSPEADADVFFDANLLAEDGTASLGSTSFAPSGE  
CWAYSVSRSGSDSVTIYVRPTSSPFFSGSHDDGRLPELKYIKFSSITWDLKCEGFFYQRFPPQRDTLELAREDKVGAESEK  
DEYAKLYYHRLGTLQSDLLILKDDNHPQYQWSAHSVAVEDRRYLVTVSADTSQKNLLWICDLANNEIGPDMKWKYVVDKF  
EALYTVIANEGTKFYIHTNKDADQFKLITIDLADESRAQTDLIPEDKGACLEQVMAVSKDR LAVVYKRNVKDEVYVHELSS  
GKQLARVASDFVTMSLSGDRRHPWFVNMGTFTTPAIVGQYDFSVVEGERWAI RRQADVQGLRPDDFVAEQRWYPSKDG  
TKVPMFIVRHKATKLDGTAPAIQYGYGGFISVNPFWSPALLTVIERYGGVLAVANIRGGGEFGEAWHLAGTKERKHNCFD  
DFIAATEFLVENKYAAPGKVAINGGSNGLLVAASAFRAPEGTGFAVVSEVGVHMLKFSQFTIGHAWRSYDGPQKPEDF  
DFIKPISPLHNVPDKMLPPTILLTADHDDRVPVPLSHFKLAATLQHLHPQSKHPLLRIRIQKAGHGAGKSTEQAIKEAADK  
WGFVVQTMDSLKPEKAAHY

## Secuencias *phos* (metiltioadenosina fosforilasa)

>Pa\_phos\_cds

```
ATGTCGTCTGATCAAGTCCAAATCGGTGTCATCGGGGGCAGCGGGTGTACCATCTCGACAACCTCACCTTCATAAAACAC
GTCAATCCAGAGACGCCCTGGGGCTTACCATCATCCCCGATCAGCATCTGCTCTCTACCTCGGGCGCTCGCGTTGCCCTC
CTCGCACGCCACGGAACCTGGCCACAGCATCAACCCCTCCACAGTTCGCCCGCGCGAACATCGCAGCGCTCAAGTCGCTC
GGCGCACACACTGTCTCGCTTCTCCGCCGTCGGCTCGCTCCGGGAGGAAATCGCACCGGGCGACTTGTCTCGCCACG
CAGATCGTCGACCGCACGAAGGGCGTCCGCCCGTGAGCTTCTTCGAAGGCACGAGCGTCGTCGCCACGCCGCTTCGGC
GACCCGTTCTCGACCAAGCTCGTACAGTGGCTCGAGCGGAGGTGGCGAAGGGCGTGAAGGCCGTTGGTGTCAAGTTGCAC
AAAGAGAAGACAATCGTTTGCATGGAAGGCCACAGTCTCGACCAGGGCGGAGAGCATCCTTTACAGGAACCTGGGGATGC
GACATCATCAATATGAGTGTGCTCCCCGAGGCGAAACTCGCTCGGGAGGCCGAATTGTCATACGCTCTGATTGCCACGGCA
ACCGACTACGACGCTTGGCGCCACACGAAGAGACGGTTACCGCCGCTGAGGTATTCAAGACGCTGAAGACCAATGCCGAA
ACCTCTCGTCACGTCGCTGCCACTATATTAGAGGACCTCCATGCCGACGACTTCTCAAAGACGAGGTCCGATCGATGAAG
TTCTCCATCATGCCCTCGACGCGAGGCGAAAAGGATGAAGATCGGGAGAAGCTGGCATACGTGCTACCCGACTACTTCAGC
TAA
```

>Pa\_phos\_gen

```
ATGTCGTCTGATCAAGGTATGTCAAACACCACAAGTCTCAAGTTCATCGAATCTGAATGTCATATTCAAGTCCAAATCGGTG
TCATCGGGGGCAGCGGGTGTACCATCTCGACAACCTCACCTTCATGTAAGAACTCGTTGTGCGGGCGAGCACGGCTGA
ACGAATACTTTCATCAGAAAACACGTC AATCCAGAGACGGTACGTGCTTACGTGTCCCTCTCGCTCAGACCCTCCTCATTG
ACCTTCGCCAACCCAGCCCTGGGGCTTACCATCATCCCCGATCAGCATCTGCTCTCTACCTCGGGCGCTCGCGTTGCCCT
CCTCGCACGCCACGGAACCTGGCCACAGCATCAACCCCTCCACAGTTCGCCCGCGCGAACATCGCAGCGCTCAAGTCGCT
CGCGCTCACACCGTCTCGCTTCTCCGCCGTCGGCTCGCTCCGGGAGGAGATCGCACCGGGTACTCGTCTGCCAC
GCAGATCGTCGACCGCACGAAGGGCGTCCGCCCGTGAGCTTCTTCGAAGGCACGAGCGTCGTCGCCACGCCGCTTCGG
TGACCCGTTTTTCGACCAAGCTCGTACAGTGGCTCGAGCGGAGGTGGCGAAGGGCGTGAAGGCCGTTGGTGTCAAGTTGCA
CAAAGAGAAGACAATCGTTTGCATGGAAGGCCACAGTCTCGACCAGGGCGGAGAGCATCCTTTACAGGAACCTGGGGATG
CGACATCATCAACATGAGTGTGCTCCCTGAGGCGAAACTCGCTCGGGAGGCCGAATTGTCGTACGTTTTGTCAATTGAACCC
CTTCCATACGTTAGTTGATCTGGCGATCGCACAGATACGCTCTGATTGCCACGGCAACCGACTACGACGCTTGGCGCCAC
ACGAAGAGACGGTTACCGCCGCTGAGGTATTCAAGACGCTGAAGACCAATGCCGAAACCTCTCGTCACGTCGCTGCCACTA
TATTAGAGGTAGATCGACACCCCTTTGCGCGTTTTGTCGATAATGTTGATATCCCGCCTAGGACCTCCATGCCGACGACTT
CCTCAAAGACGAGGTCCGATCGATGAAGTTCTCCATCATGCCTCGCAGCGAGGCGAAAAGGATGAAGATCGGGAGAAGCT
GGCATACGTGCTACCCGACTACTTCAGCTAA
```

>Pa\_phos\_prot

```
MSSDQVQIGVIGGSLYHLDNLTFIKHVNPETPWGLPSSPISICSLPSGARVAFLARHGTGHSINPSTVPARANIAALKSL
GAHTVLAFAVAVGLSREEIAPGDFVLPQTIVDRITKGVREVSFFEGTSVVAHAAFGDPFSTKLVQWLEREVAKALEGRVVKLH
KEKTIVCMEGPQFSTRAESILYRNWGCIDIINMSVLPKAKLAREAEALYALIAATDIDYDAWRPHEETVTAAEVFKTLKTNAE
TSRHVAATILEDLHAADFLLKDEVEGSMKFSIMPRSEAAQKDEKREKLAIVLPDYFS
```

## Secuencias *sarl* (proteína de unión a GTP)

>Pa\_sarI\_cds

```
ATGTGGATTGTCAACTGGTTCTGGGACGTTCTCGCTCAGCTGGGTTTGACCCACAAGAATGCCAAGATTCTCTTCTGGGT
TTGGATAACGCTGGAAAGACGACTCTTCTGCACATGTTGAAGAACGACCGATTGGCGACCCCTACAGCCGACGCTTCACCCG
ACGTCGAGGAGCTGGCCATCGGTAACGTC AAGTTCACCACTTATGACCTCGGTGGCCATCAACAGGCTCGTCGCCCTTGG
CGGACTACTTCCCTGAAGTCGATGGTATCATCTTCCCTCGTTGACAGTGCAGACTTCGAGCGTTTTCCCGGAATCGAAGGCG
GAACTCGACTCCCTGCTTTCATCGAACAGCTCGCGAAGGTGCCTTTCCTGATCCTCGGAAACAAGATCGACGCGCCGGGC
GCCGTGAGTGAGGATGAGCTCCGTCCAGCTCGGTCTGTACCAGACCACCGGAAAGGGCAAGGTCCCTCTCAACGATATC
CGACCCATCGAGATTTTCATGTGCTCTGTGTCATGCCAGGGCTACGGTGAAGGTTTCCGTTGGCTTTCGCAATACCTC
TAA
```

>Pa\_sarIc\_gen

```
ATGTGGATTGTCAACTGGTTCTGGGACGTTCTCGCTCAGCTGGgtacgctgtcttttacgcttcgcgcggaacaggtcggtg
agagagcctagGTTTGACCCACAAGAATGCCAAGATTCTCTTCTTGGGTTTGATAACGCTGGAAAGACGgtgagcgcagc
atcaacggggttgaccgggtcctcattgaaaagtgtagACTCTTCTGCACATGTTGAAGAACGACCGATTGGCGACCCCTG
CAGCCGACGCTTACCCGAgtttagtccgttcgcaacgcagagtgcgcttcaaccgtgctcaatcaatactgcagCGTCC
GAGGAGCTGGCCATCGGTAACGTC AAGTTCACCACTTATGACCTCGGTGGCCATCAACAGGgtgtgtatttctcgtcgtgt
cgcgtgagactgcgctaaaatgagcctgcagCTCGTCGCTTGGCGGACTACTTCCCTGAAGTCGATGGTATCATCTTC
```

CTCGTTGACAGTGCAGACTTCGAGCGTTTCCCGGAATCGAAGGCGGAACTCGACTCCCTGCTTTCCATCGAACAGCTCGCG  
AAGGTGCCTTTCCTGATCCTCGGAAACAAGATCGACGCGCCGGGCGCCGTGAGTGAGGATGAGCTCCGTCACCAGCTCGGT  
CTGTACCAGACCACCGAAAaggtacgtgttttcgacgtctcgcataaggaacgtgtttcagagctatcacagGGCAAGGTCC  
CTCTCAACGATATCCGACCCATCGAGATTTTCATGTGCTCTGTGTCATGCGCCAGGGCTACGGTGAAGgtagtttccgc  
ttgctcagccgtttgggcttcgttttacgcgaccacgcagGTTTCGGTTGGCTTTCGCAATACCTCTAA

>Pa\_sarI\_prt

MWIVNWFWDVLAQLGLTHKNAKILFLGLDNAGKTTLLHMLKNDRLATLQPTLHPTSEELAIGNVKFTTYDLGGHQARRLW  
RDYFPEVDGIIFLVDSADFERFPESKAELDSLISIEQLAKVPFLILGNKIDAPGAVSEDELRLHQLGLYQTTGKGKVP LNDI  
RPIEIFMCSVVMRQGYGEGFRWLSQYL

### 7.3.4 Alineamientos de secuencias *mnpB1*, *B2* y *F*

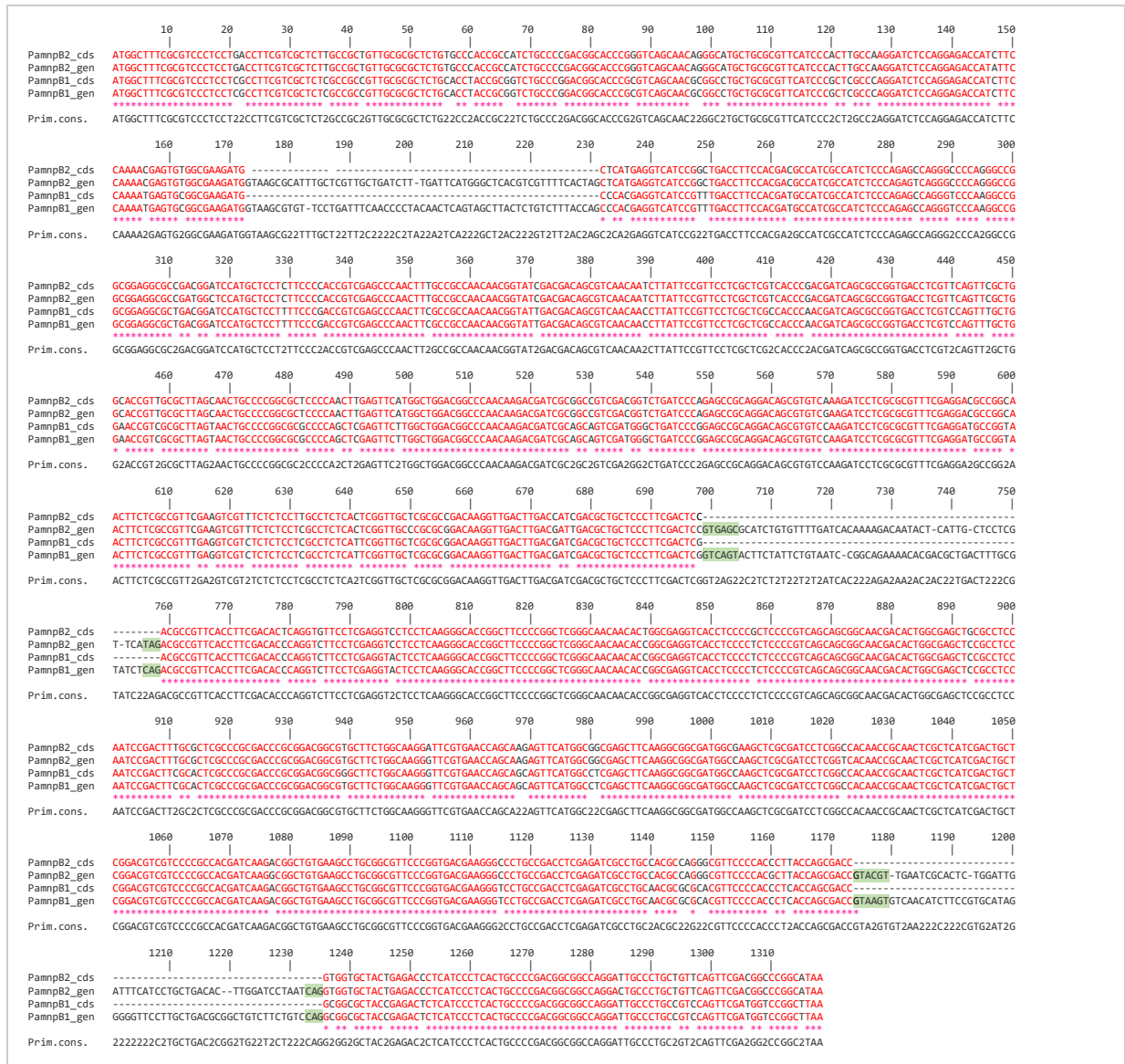


Figura A.9: Alineamiento de secuencias genómicas y transcriptómicas *mnpB1* y *mnpB2*. ClustalW. Las secuencias pie de intrón se indican con sombreado.

