

Primera determinación de la actividad lacasa en *Ramalina celastri* y su potencial asociación funcional con diferentes niveles de exposición a la luz

First laccase activity determination of *Ramalina celastri* and its potential functional association to different levels of light exposition

Leonardo M. Majul¹), Renato A. García²) & Alejandra T. Fazio¹)

¹) Laboratorio de Micología Experimental, INMIBO (UBA-CONICET), DBBE, FCEN, UBA, Buenos Aires, Argentina.
Email: leonardomajul@gmail.com, fazio.alejandra@gmail.com

²) Laboratorio de Biodiversidad y Genética Ambiental, Universidad Nacional de Avellaneda, Avellaneda, Argentina.
Email: ragarcia@undav.edu.ar

Resumen

Los escasos estudios enzimáticos en líquenes muestran que la acción de las lacasas estaría asociada a una respuesta a condiciones de estrés, siendo este comportamiento similar al de especies de hongos saprofitos. En el presente estudio se analizó la actividad lacasa en la especie *Ramalina Celastri* (Spreng.) Krog & Swinscow con el fin de detectar su presencia y evaluar sus niveles de actividad en relación a su exposición a la luz. Para ello se recolectaron ejemplares de *R. celastri*, que se encontraban expuestos a alta o baja luminosidad a campo y se expusieron en cámara húmeda durante 24 hs a la luz y a oscuridad. Para determinar la actividad lacasa, inicialmente se molieron los talos en buffer fosfato pH 7 y se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos para recuperar el sobrenadante. A partir de estos se determinó la actividad lacasa siguiendo la oxidación de 2,6-dimetoxifenol (DMP) en buffer acetato de sodio 50 mM a pH 3.5. Los resultados muestran actividad lacasa en todos los extractos. A su vez, se encontraron diferencias significativas entre los individuos expuestos a baja o alta luminosidad y solo entre aquellos que cambiaron de una alta exposición a la luz a oscuridad. Por otro lado, el perfil de actividad lacasa respecto al pH fue diferente en los individuos que estuvieron expuestos a diferentes intensidades de luz. Estas diferencias podrían estar asociadas a un cambio en el perfil isoenzimático y potencialmente a cambios fisiológicos.

Palabras clave: Líquenes, *Ramalina Celastri*, enzimas, lacasas, Argentina.

Abstract

The few enzyme studies done on lichens indicate that the activity of laccases is might be related to stress response, which is similar to that of saprophytic fungal species. In this study, laccase activity was analyzed in *Ramalina celastri* (Spreng.) Krog & Swinscow to detect its presence and evaluate its expression in response to light exposure. Specimens of *R. celastri* were collected from exposed to high or low light levels in the field, then exposed to light and darkness in a humid chamber for 24 hours. To measure laccase activity, the thalli were ground in pH 7 phosphate buffer, then centrifuged to obtain the supernatant, which was used to determine laccase activity by oxidizing 2,6-dimethoxyphenol (DMP) in 50 mM sodium acetate buffer at pH 3.5. The results showed laccase activity in all extracts, with significant differences between individuals exposed to high or low light and those exposed to darkness after high light exposure. Additionally, the laccase activity profile in relation

to pH differed among individuals exposed to different light intensities, which could be due to changes in the isoenzyme profile and potential physiological changes.

Key words: Lichens, *Ramalina Celastri*, enzymes, laccases, Argentina

Introducción

Las lacasas son enzimas pertenecientes a la familia de oxidasas multicobre (MCOs, del inglés multicopper oxidases). Estas enzimas catalizan mediante sus centros cobre, la oxidación de una amplia variedad de compuestos aromáticos con la consecuente reducción de oxígeno a agua (Solomon *et al.*, 1996). Dichas enzimas fueron descritas ampliamente para plantas, animales, bacterias y hongos (Berthet *et al.*, 2012; Dwivedi *et al.*, 2011; Dittmer & Kanost, 2010), mientras que en líquenes son escasos (Laufer *et al.*, 2006; Zavarzina y Zavarzin, 2006).

Las lacasas participan en diferentes procesos como la transformación de los fenoles solubles y sustancias húmicas (Zavarzina, 2006), así como en la síntesis y descomposición de la lignina (Montoya *et al.*, 2014; Boerjan *et al.*, 2003; Levín, 1998). Específicamente en los hongos las lacasas cumplen múltiples funciones, ya que intervienen en la síntesis de pigmentos (como la melanina), en procesos de morfogénesis (como formación de estructuras reproductivas) y, según Arregui *et al.* (2019), participarían también en la detoxificación de compuestos de bajo peso molecular como fenoles y quinonas, incluyendo derivados de la degradación de lignina, así como también fitoalexinas y otros compuestos fenólicos sintetizados por las plantas en respuesta al ataque por fitopatógenos. Las lacasas oxidan sustratos como *o*-, *p*- difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas y diarilaminas, así como también algunos iones inorgánicos (Kjaergaard *et al.*, 2012; Augustine *et al.*, 2008).

Los estudios de enzimas líquénicas son escasos, pero necesario para aumentar el conocimiento sobre la fisiología del grupo. En el caso de la actividad lacasa en líquenes, la mayoría de los estudios han sido realizados principalmente para el género *Peltigera* Willd. y al igual que en otros organismos, no es posible relacionarla con una única función (Laufer *et al.*, 2006). Se cree que la actividad lacasa podría estar relacionada a la respuesta a la comunidad bacteriana asociada al talo líquénico y su la defensa contra patógenos y propiedades antibióticas (Leiva *et al.*, 2016; Cáceres, 2015). Por otro lado, en los líquenes terrícolas, la descomposición de la turba debajo de las llamadas "costras líquénicas" que crecen en el suelo, se ha asociado a la actividad lacasas involucradas en la descomposición microbiana de compuestos fenólicos (Harris *et al.*, 2018).

Por otro lado, cabe remarcar que debido a la naturaleza poiquilohídrica de los líquenes y a su metabolismo, son capaces sobrevivir en condiciones extremas mediante una rápida restauración de su actividad metabólica (Purvis, 2000). En este sentido, la luz resulta un factor ecológico decisivo ya que influye en la tasa fotosintética y por lo tanto en producción de hidratos de carbono, pero también en el estrés hídrico en condiciones de alta intensidad. Debido a esto, los líquenes desarrollaron mecanismos de protección que le permiten resistir este tipo de estrés, entre ellos la anatomía del talo, su capacidad para mantenerse inactivo y la producción de sustancias específicas del córtex (Barreno y Pérez-Ortega, 2003). Por otro lado, si bien los estudios enzimáticos en líquenes son escasos, la mayoría muestran que la acción de las lacasas estaría asociada a una respuesta a condiciones de estrés, siendo este comportamiento similar al de especies de hongos saprófitos (Piscitelli *et al.*, 2011). En particular, los estudios de estrés lumínico en líquenes asociado a dicha actividad resultan escasos. El trabajo realizado por Matee *et al.* (2016) es único en esta temática e indica que individuos de *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. muestran una alta actividad lacasa en condiciones de alta intensidad lumínica a campo.

Ramalina celandri (Spreng.) Krog & Swinscow presenta un talo fruticoso cortícola. Su distribución es Pantropical, con numerosos registros en todo el mundo, excepto en la Antártida y el Ártico, desde el nivel del mar hasta los 1000 m s.n.m. (Gumboski 2016). Es una especie común que crece preferentemente en zonas iluminadas y sensible a la contaminación atmosférica, en Argentina se distribuye en provincias templado cálidas, pudiendo encontrarlas en bosques templados, secos, húmedos y también sobre materiales manufacturados (Calvelo y Liberatore, 2002; Bermudez *et al.* 2009; Estrabou *et al.*, 2014; Filippini *et al.*, 2014). En el presente estudio se analizó la actividad lacasa en la especie *R. celandri* con el fin de detectar su presencia y evaluar nivel de actividad en relación a su exposición a la luz.

Materiales y métodos

Recolección de material

La recolección de los talos fue realizada en dos reservas de la costa sur del río de la Plata, la Eco Área de Avellaneda (34°39'45.0"S 58°19'07.2"W) durante los años 2019 y 2021 y la Reserva Natural de Punta Lara (34°47'25.3"S 58°00'27.4"W) durante el año 2022. Se recolectaron ejemplares de la especie *R. Celandri* en 2 condiciones diferentes de exposición a la luz, una en la que se encontraban los ejemplares creciendo bajo el dosel de árboles a la sombra (baja exposición) y ejemplares creciendo sobre árboles solitarios (alta exposición) (figura 1). Los ejemplares se recolectaron sin dañar el talo retirándose con el disco basal, se guardaron en bolsas de papel y se mantuvieron a -20 °C hasta su posterior análisis.

Ensayos in vitro de incubación a condiciones de luz y oscuridad y obtención de fracciones acuosas a partir de talos de R. celandri

Para evaluar la incidencia de la luz sobre ejemplares de *R. celandri* se obtuvieron extractos de las muestras luego de su recolección como condición inicial y luego de ser incubadas en cámara húmeda a 25 °C a la luz o en oscuridad durante 24 hs. Para obtener los extractos se molieron los talos de forma individual con mortero hasta alcanzar un polvo fino y se agregó buffer fosfato de potasio 0.1 M, pH 7 hasta una concentración de 0.1 g/ml. Para separar los sólidos del extracto se centrifugaron los homogenatos a 5000 rpm durante 20 minutos (Rolco 2036) y se recuperó el sobrenadante. Las muestras se reservaron a -20 °C.

Actividad lacasa

La actividad lacasa se determinó espectrofotométricamente como el aumento de la absorbancia a 469 nm debido a la oxidación de 2,6 dimetoxifenol (DMP) 5 mM ($\epsilon_{369} = 27,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 30 °C en buffer fosfato de potasio 0,5 mM a pH 3,5 (Hofrichter, *et al.*, 1998). Por otro lado, se obtuvo el pH óptimo de actividad lacasa de los extractos realizando las reacciones a pH 2; 3,5; 4; 5; 6; 7 y 8. Se calculó la actividad relativa al punto de mayor actividad mediante la fórmula:

$$\text{Actividad relativa} = (\text{actividad a evaluar} / \text{actividad máxima}) * 100$$

Se definió unidad enzimática (UE) como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de DMP por minuto.

Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. En los ensayos en que se realizaron extracciones, cada una correspondió a un individuo de *R. celandri*. Los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA de dos vías. El contraste de los tratamientos se efectuó a posteriori mediante test

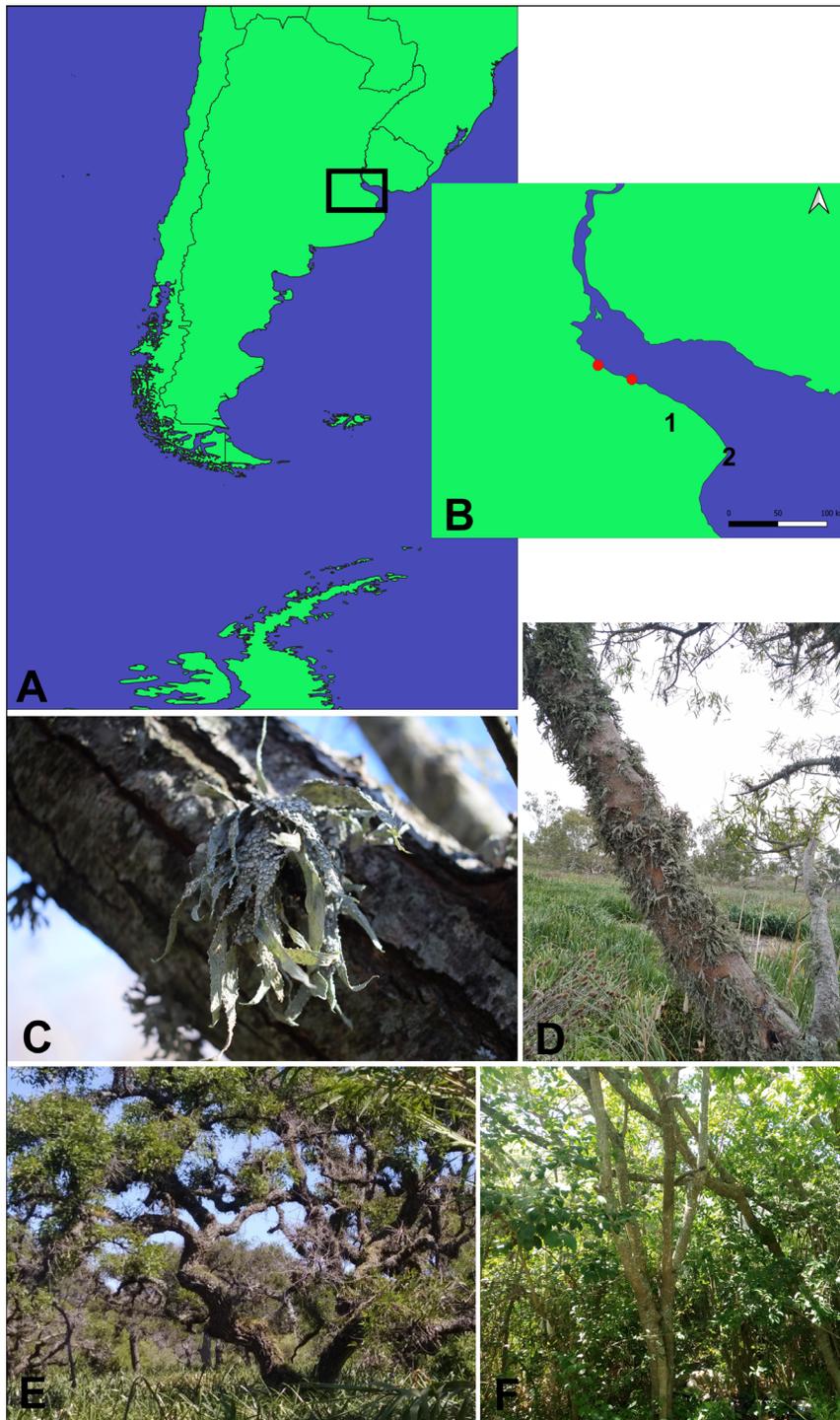


Fig. 1. A. Mapa de Argentina indicando el área de muestreo. B. Detalle de los sitios donde se recolectaron muestras (1. Eco Área de Avellaneda; 2, Reserva Natural Punta Lara). C. Detalle de *R. celastri*. D. Rama colonizada por *R. celastri*. E. ejemplares creciendo sobre árboles solitarios (alta exposición). F. Ejemplares creciendo bajo el dosel de árboles a la sombra (baja exposición).

de Tukey. En ambos casos, el valor de significancia establecido fue de $p < 0.05$. Se utilizó el software Graphpad Prism 8.0.1 (GraphPad Software).

Resultados

Incidencia de la luz sobre la actividad lacasa de R. celsastri

Se detectó actividad lacasa en todas las muestras de *R. celsastri* analizadas. Las muestras correspondientes a condiciones de alta exposición a la luz mostraron una mayor actividad lacasa que aquellas que se encontraban en condiciones de baja exposición ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos recolectados los diferentes años ($p > 0.05$) mostrando una tendencia marcada por la incidencia de la luz (Fig. 2).

Con el fin de analizar el efecto de la luz sobre los niveles de actividad lacasa en los talos liquénicos, individuos recolectados que se encontraban en alta y baja exposición a la luz se incubaron durante 24 hs en luz u oscuridad. Los resultados muestran que sólo aquellos individuos que pasaron de estar expuestos de una exposición alta a oscuridad mostraron un aumento en la actividad lacasa, mientras que aquellos que mantuvieron la condición inicial o pasaron de baja a alta exposición no mostraron diferencias significativas (Fig. 3).

Se determinó el pH óptimo de actividad lacasa de los extractos de los talos liquénicos expuestos en el campo a alta y baja exposición a la luz. Como se puede observar en la figura 4, las muestras provenientes de individuos con alta exposición a la luz alcanzan su máximo de actividad entre pH 3 y 3.5, mientras que las muestras provenientes de individuos con baja exposición a la luz lo hacen alrededor de pH 5.

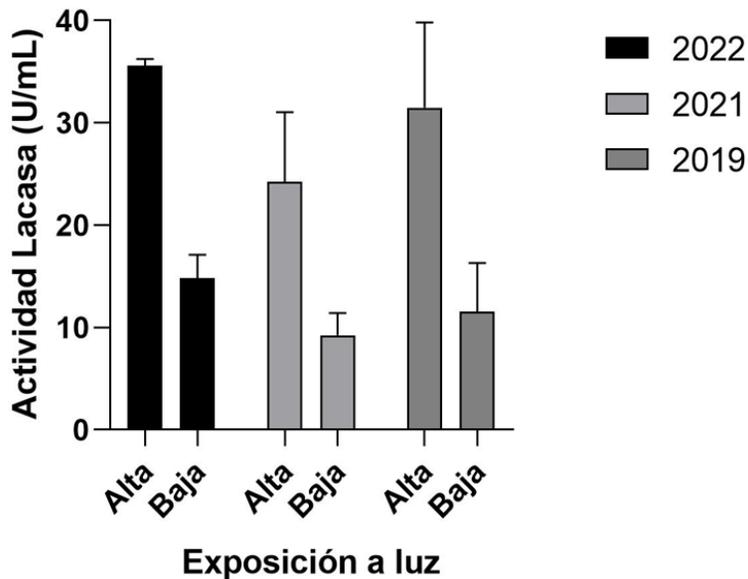


Fig. 2. Actividad lacasa de fracciones acuosas derivadas de talos de *R. celsastri* recolectados en condiciones de alta y baja exposición a la luz.

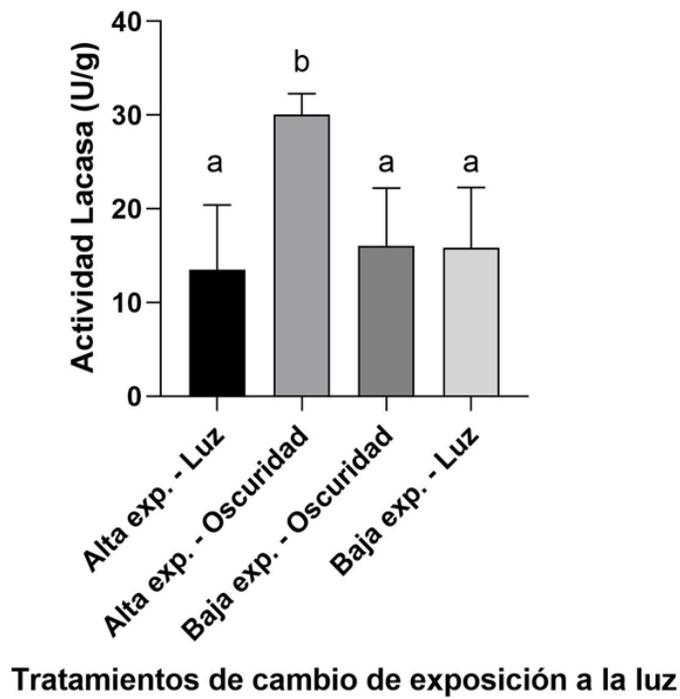


Fig. 3. Actividad lacasa determinada a partir de extractos de talos de *R. celastri* expuestos a campo a alta o baja exposición a la luz (Alta exp. o Baja exp.) y que luego fueron incubados *in vitro* a la luz o a la oscuridad.

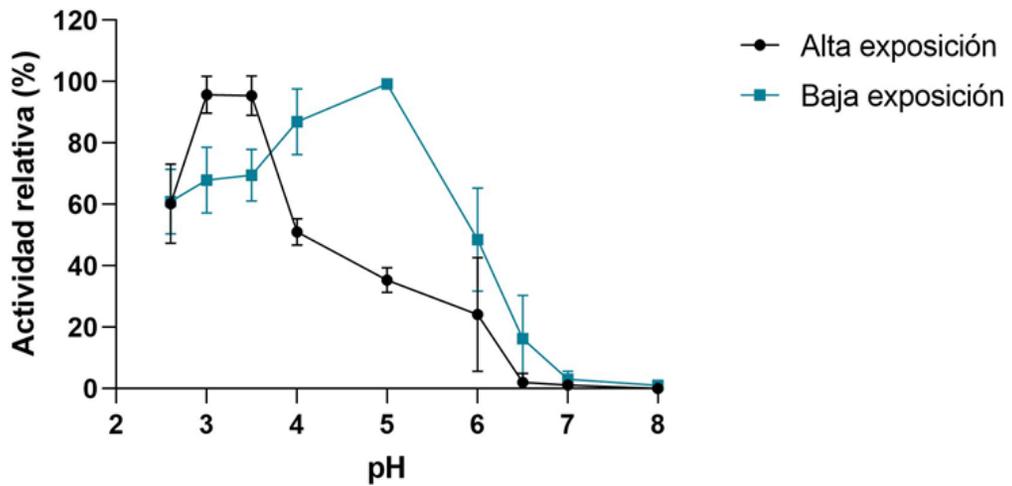


Fig. 4. Perfil de pH de actividad lacasa de extractos de individuos en alta y baja exposición a la luz.

Discusión

La actividad lacasa se encuentra ampliamente distribuida en algas, hongos, bacterias y animales (Janusz *et al.*, 2020) pero en líquenes fue reportada en un grupo acotado, principalmente en algunas especies pertenecientes a los órdenes Peltigerales y Lecanorales (Zavarzina & Zavarzin, 2006; Beckett *et al.* 2005).

En el caso de *R. celastri* los individuos expuestos a la luz mostraron una tendencia a duplicar la actividad lacasa respecto a aquellos que estaban en bajos niveles de exposición. Esta tendencia parecería indicar que la exposición a la luz podría modificar los niveles de expresión de la enzima. Esta tendencia se observó en talos liquénicos de *L. pulmonaria* que al ser expuestos a luz con filtros UV mostraron menor actividad lacasa que aquellos sin filtrar (Matee *et al.*, 2016).

Por otro lado, se evaluó la actividad lacasa de individuos que se encontraban en niveles altos y bajos de exposición a la luz que fueron incubados en condiciones de oscuridad y luz. En este ensayo solo se observó un aumento en la actividad lacasa de aquellos que pasaron de una condición de alta exposición a la luz a oscuridad. Este cambio en los niveles de actividad, que aparenta ser opuesto a lo determinado para los individuos provenientes del campo, podría tratarse de una adaptación fisiológica. Hay evidencia parcial que relaciona a la actividad peroxidasa con la degradación de ácido úsnico en momentos de baja intensidad lumínica. Esta teoría explica que al actuar el ácido úsnico como protector a niveles altos de intensidad lumínica la abundancia del mismo en condiciones de baja intensidad podría disminuir la tasa fotosintética y como respuesta a esto, el líquen podría degradarlo por medio de las enzimas. A su vez, se cree que en condiciones de baja exposición a la luz, la actividad lacasa podría formar parte de cocteles enzimáticos que permitirían a los líquenes breves etapas de heterotrofia (Beckett *et al.*, 2015).

Asociado a los cambios en los niveles de exposición a la luz se observó que los extractos de los individuos recolectados mostraron perfiles de actividad diferentes respecto al pH. Aquellos que estaban a niveles altos de exposición a la luz tuvieron máximos de actividad a pH 3,5, mientras que aquellos expuestos a niveles bajos de exposición los mostraron a pH 5. Estos cambios podrían indicar la presencia de isoformas de lacasas con funciones fisiológicas diferentes. La expresión de isoformas específicas al cambiar las condiciones de cultivo fue altamente reportada en hongos de vida libre (Majul *et al.*, 2020; Baldrian 2006), así como también en menor medida, a partir de cultivos de micobiontes liquénicos (Değerli *et al.*, 2019). En talos de *Solorina crocea* (L.) Ach. se detectaron al menos 2 isoformas de lacasa una monomérica con pH óptimo de oxidación de DMP 4,5 y una oligomérica con pH óptimo de 4 y diferentes potenciales de oxidación (Lisov *et al.*, 2012). De forma similar, en el trabajo de Beckett *et al.* (2005), los autores informaron la expresión de lacasas en especies del género *Peltigera* con un pH óptimo de oxidación de ABTS igual a 5.

Cabe destacar que el presente constituye la primera caracterización de enzimas provenientes de líquenes en sudamérica y su relación con la calidad del ambiente. Consideramos importante el abordaje de los estudios enzimáticos y fisiológicos en la diversidad y abundancia de especies de líquenes para obtener nuevos y mejores parámetros de calidad ambiental y monitoreo.

Conclusiones

Se comprobó la presencia de actividad lacasa en extractos de talos de *R. celastri*. La expresión de la enzima fue mayor en individuos con alta exposición a la luz y en aquellos que provenían de alta exposición pero que pasaban a la oscuridad. Por otro lado, se observó que el perfil de actividad lacasa en función del pH fue diferente para los individuos con alta y baja exposición a la luz, siendo posible que estos patrones sean debidos a reacciones desencadenadas por la luz.

Agradecimientos

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-2020-SERIE A-00021).

Referencias

- AUGUSTINE, A. J., KRAGH, M. E., SARANGI, R., FUJII, S., LIBOIRON, B. D., STOJ, C. S., KOSMAN D. J., HODGSON, K. O., HEDMAN B. & SOLOMON, E. I. (2008) Spectroscopic studies of perturbed T1 Cu sites in the multicopper oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and *Rhus vernicifera* laccase: allosteric coupling between the T1 and trinuclear Cu sites. *Biochemistry* **47**(7): 2036–2045.
- BARRENO, E., & PÉREZ-ORTEGA, S. (2003) *Líquenes de la reserva natural integral de Muniellos, Asturias*. KRK ediciones.
- BALDRIAN, P. (2006) Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS microbiology reviews* **30**(2): 215–242.
- BECKETT, R. P., MINIBAYEVA, F. V. & LAUFER, Z. (2005) Extracellular Reactive Oxygen Species Production by Lichens. *The Lichenologist* **37**: 397–407.
- BECKETT, R. P., NTOMBELA, N., SCOTT, E., GURJANOV, O. P., MINIBAYEVA, F. V. & LIERS, C. (2015) Role of laccases and peroxidases in saprotrophic activities in the lichen *Usnea undulata*. *Fungal Ecology* **14**: 71–78.
- BERMUDEZ, G. M., RODRIGUEZ, J. H. & PIGNATA, M. L. (2009) Comparison of the air pollution biomonitoring ability of three *Tillandsia* species and the lichen *Ramalina celastri* in Argentina. *Environmental Research* **109**(1): 6–14.
- BERTHET, S., THEVENIN, J., BARATINY, D., DEMONT-CAULET, N., DEBEAUJON, I., BIDZINSKI, P., LEPL, J. C., HUIS R., HAWKINS S., GOMEZ, L. D., LAPIERRE C., JOUANIN, L. & LAPIERRE, C. (2012) Role of plant laccases in lignin polymerization. In: JOUANIN, L. & LAPIERRE, C. (eds.) *Advances in Botanical Research*: 145–172. Academic Press.
- BOERJAN, W., RALPH, J. & BAUCHER M. (2003) Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 519–46.
- CÁCERES, D. L. (2015) *Relación de la producción de metabolitos y la actividad fenoloxidasa de líquenes del género Peltigera con sus comunidades bacterianas asociadas*. Tesis de Magister, Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- CALVELO, S., & LIBERATORE, S. (2002) Catálogo de los líquenes de la Argentina. *Kurtziana* **29**(2): 7–170.
- CAMARERO, S., IBARRA, D., MARTINEZ, M. J. & MARTINEZ, A. (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied Environmental Microbiology* **71**: 1775–1784.
- DEĞERLI, E., YANGIN, S. & CANSARAN-DUMAN, D. (2019) Determination of the effect of RBBR on laccase activity and gene expression level of fungi in lichen structure. *3 Biotech* **9**(8): 1–11.
- DITTMER, N. T. & KANOST, M. R. (2010) Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **40**(3): 179–188.
- DWIVEDI, U. N., SINGH, P., PANDEY, V. P. & KUMAR, A. (2011) Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **68**(2): 117–128.
- ESTRABOU, C., QUIROGA, C. & RODRÍGUEZ, J. M. (2014) Diversidad de la comunidad líquénica en un bosque remanente del sur de la región chaqueña (Córdoba, Argentina). *Bosque* **35**(1): 49–55.
- FILIPPINI, E. R., RODRIGUEZ, J. M. & ESTRABOU, C. (2014) Comunidad líquénica de un bosque en peligro de extinción, con diferentes situaciones de manejo en el centro de Argentina. *Lazaroo* **35**: 55–64.
- GARCÍA, R. A. (2018) *Contribución al estudio de la liquenobiota del patrimonio edilicio de la provincia de Buenos Aires (Argentina)*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- GUMBOSKI, E. L. (2016) *Estudos taxonômicos em espécies de Ramalina Ach. (Ascomycota liquenizados, Ramalinaceae)*. Tese de Doutorado. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Brasil.
- HARRIS, L. I., MOORE, T. R., ROULET, N. T. & PINSONNEAULT, A. J. (2018) Lichens: A limit to peat growth? *Journal of Ecology* **106**: 2301–2319.
- HOEGGER, P. J., KILARU, S., JAMES, T. Y., THACKER, J. R. & KÜES, U. (2006) Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal* **273**: 2308–2326.
- HOFRICHTER, M., ZIEGENHAGEN, D., VARES, T., FRIEDRICH, M., JÄGER, M. G., FRITSCH, W. & HATAKKA, A. (1998) Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. *FEBS letters* **434**(3): 362–366.

- JANUSZ, G., PAWLIK, A., Świdarska-Burek, U., POLAK, J., SULEJ, J., JAROSZ-WILKOLAZKA, A. & PASZCZYŃSKI, A. (2020) Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International journal of molecular sciences* **21**(3): 966.
- KJAERGAARD, C. H., DURAND, F., TASCA, F., QAYYUM, M. F., KAUFFMANN, B., GOUNEL, S., SURANITI, E., HODGSON, K. O., HEDMAN, B. & MANO, N. (2012) Spectroscopic and crystallographic characterization of “alternative resting” and “resting oxidized” enzyme forms of bilirubin oxidase: implications for activity and electrochemical behavior of multicopper oxidases. *Journal of the American Chemical Society* **134**: 5548–5551.
- LAUFER, Z., BECKETT, R. P., MINIBAYEVA, F.V., LÜTHJE, S. & BÖTTGER, M. (2006) Occurrence of laccases in lichenized ascomycetes of the Peltigerineae. *Mycological Research* **110**(7): 846–853.
- LEVIN, L. N. (1998) *Biodegradación de materiales lignocelulósicos por Trametes trogii (Aphyllophorales, Basidiomycetes)*. Tesis doctoral, Universidad De Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- LEIVA, D., CLAVERO-LEÓN, C., CARÚ, M. & ORLANDO, J. (2016) Intrinsic factors of *Peltigera* lichens influence the structure of the associated soil bacterial microbiota. *FEMS Microbiology Ecology* **92**: 1–9.
- LISOV, A., ZAVARZINA, A., ZAVARZIN, A., DEMIN, V. & LEONTIEVSKY, A. (2012) Dimeric and monomeric laccases of soil-stabilizing lichen *Solorina crocea*: purification, properties and reactions with humic acids. *Soil Biology and Biochemistry* **45**: 161–167.
- MAJUL, L., WIRTH, S. & LEVIN, L. (2020) High dye removal capacity of *Peniophora laxitexta* immobilized in a combined support based on polyurethane foam and lignocellulosic substrates. *Environmental Technology* **43**(5): 684–695.
- MATEE, L. P., BECKETT, R. P., SOLHAUG, K. A. & MINIBAYEVA, F. V. (2016) Characterization and role of tyrosinases in the lichen *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. *The Lichenologist* **48**(4): 311–322.
- MOROZOVA, O. V., SHUMAKOVICH, G. P., GORBACHEVA, M. A., SHLIEV, S. V. & YAROLOPOV, A. I. (2007) “Blue” laccases. *Biochemistry (Moscow)* **72**(10): 1136–1150.
- MONTOYA, S. B., SÁNCHEZ O. T. & LEVIN, L. (2014) Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustria* **12**: 115–124.
- PISCITELLI, A., GIARDINA, P., LETTERA, V., PEZZELLA, C., SANNIA, G., & FARACO, V. (2011) Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current genomics* **12**(2): 104–112.
- POLLEGIONI, L., TONIN, F. & ROSINI, E. (2015) Lignin-degrading enzymes. *The FEBS journal* **282**(7): 1190–1213.
- PURVIS, W. (2000) *Lichens*. Natural History Museum. London.
- ZAVARZINA, A. G., & ZAVARZIN, A. A. (2006) Laccase and tyrosinase activities in lichens. *Microbiology* **75**(5): 546–556.