

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



“Especies de oxígeno reactivas, melanina y FLR1 en la virulencia del hongo fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis*: estudios moleculares.”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

OLGA ELIZABETH ODRIEZOLA CASAS

DIRECTOR

DR. MIGUEL J. BELTRÁN GARCÍA

CODIRECTORA

DRA. MONICA CARRILLO BELTRÁN

Mexicali, B. C.

Junio 18, 2014

ÍNDICE

•	ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
•	ÍNDICE DE CUADROS.....	7
•	ÍNDICE DE TABLAS.....	7
I.	INTRODUCCIÓN.....	8
II.	OBJETIVOS GENERALES.....	13
III.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
IV.	HIPÓTESIS.....	14
V.	ANTECEDENTES.....	15
	1. Sigatoka negra: El cultivo de plátanos y la biología de la enfermedad.....	15
	▪ Plátano y Banano.....	15
	▪ Sigatoka Negra.....	16
	▪ Complejo Sigatoka.....	17
	▪ Ciclo de vida de <i>M. fijiensis</i>	18
	▪ Variabilidad genética.....	20
	▪ Patogenesis.....	22
	▪ Impacto de la enfermedad sobre <i>Musa spp</i>	23
	▪ Control de la enfermedad y resistencia a fungicidas.....	25

▪ Interacción planta patógeno.....	28
▪ Factores de virulencia.....	29
• Hongos biotróficos.....	29
• Hongos necrotróficos.....	31
• Hongos hemi-biotróficos.....	32
▪ Factores de virulencia en <i>M. fijiensis</i>	34
• Toxinas selectivas del hospedante.....	34
• Toxinas no selectivas del hospedante.....	34
• Juglona.....	36
• Secretoma.....	37
• Melanina.....	38
▪ Especies de oxígeno reactivas en la interacción plata patógeno.....	40
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
i. Materiales.....	45
A) Reactivos.....	45
B) Equipo.....	46
ii. Métodos.....	48
1. Cultivo de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	48
2. Cinética de producción de melanina y determinación del porcentaje de crecimiento en <i>M. fijiensis</i> mediante técnicas espectrofotométricas.....	49
3. Tinción de melanina en micelio.....	50
4. Obtención y exposición de los productos de inhibición	

de la formación de 1, 8 DNH de <i>M. fijiensis</i>	51
5. Determinación de toxicidad del micelio de hongos y bacterias a la Juglona.....	53
- <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	53
- <i>Fusarium spp.</i>	54
- <i>E. coli</i>	54
6. Toxicidad de la Juglona por inyección directa en hojas de <i>Musa acuminata</i> variedad Cavendish.....	55
7. PCRq- SYBR® Green.....	56
A) Diseño de oligonucleótidos.....	56
B) Inducción.....	56
C) Extracción y cuantificación de ARN.....	57
D) Tratamiento con DNAsa.....	58
E) Verificación de ARN libre de ADN.....	59
F) Reacción de la Transcriptasa reversa.....	59
G) Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	60
H) PCR-Tiempo Real.....	60
I) Análisis de la expresión de ARNm.....	61
VII. RESULTADOS	62
1. Tinción de DHN melanina.....	62
2. Determinación la dinámica de secreción de melanina producida por tres cepas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> en un medio de cultivo	

líquido Papa Dextrosa.....	64
3. Evaluación del efecto sobre el desarrollo del micelio de 2 cepas de <i>M. fijiensis</i> ejercido por los productos solubles formados durante la inhibición de la síntesis de la 1,8 DHN.....	67
4. Evaluación del desarrollo en presencia de varias concentraciones de juglona, una fitotoxina no específica del hospedante activada por la luz.....	70
• <i>M. fijiensis</i>	71
• <i>Fusarium spp</i>	73
• <i>E. coli</i>	74
• <i>Musa spp</i>	76
5. Análisis de la expresión de genes relacionados en la síntesis de melanina y estrés oxidativo.....	79
VIII. DISCUSIÓN.....	86
IX. CONCLUSIÓN.....	97
X. LITERATURA CITADA.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>M. fijiensis</i>	20
Figura 2. Desarrollo de la enfermedad de <i>M. fijiensis</i>	23
Figura 3. Análisis de metabolitos acumulados en cultivos de <i>M. fijiensis</i> en presencia de triziclazol y pyroquilon.....	35
Figura 4. Producción de $^1\text{O}_2$ por juglona.....	37
Figura 5. Formación de los productos de inhibición de la síntesis de melanina....	52
Figura 6. Gel de integridad de ARN.....	58
Figura 7. Curva de fusión.....	61
Figura 8. Visualización microscópica de hifas teñidas con Plata-Sulfato de Cobre.....	63
Figura 9. Dinámica de secreción de melanina en medio PDB.....	66
Figura 10. Efecto de productos solubles formados durante la inhibición de la síntesis de la 1,8 DHN sobre el desarrollo del micelio de <i>M. fijiensis</i>	69
Figura 11. Evaluación del desarrollo de <i>M. fijiensis</i> , <i>Fusarium spp.</i> y <i>E. coli</i> en presencia de varias concentraciones de la toxina juglona.....	75
Figura 12. Visualización microscópica de cortes histológicos de hoja de banano inyectados con juglona y teñidos con DAB.....	78
Figura 13. Niveles de expresión de ARNm de Mf1 con respecto a la B-tubulina en presencia de la toxina juglona.....	84
Figura 14. Valores relativos de expresión de las cepas albinas en función de la cepa pigmentada.....	85

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Digestión enzimática con DNAsa.....	58
Cuadro 2. Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR).....	59
Cuadro 3. Reacción de la transcriptasa reversa (RT).....	60
Cuadro 4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCRq).....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aspectos fisiológicos y fenotípicos de las cepas de <i>M. fijiensis</i> utilizadas en este trabajo.....	48
Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias del genoma de <i>M. fijiensis</i>	57

I. INTRODUCCIÓN

El hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*), es el fitopatógeno del plátano que provoca la enfermedad llamada Sigatoka negra. Es considerado el miembro más destructivo del llamado complejo “Sigatoka” que también incluye a *M. musicola* y *M. eumusae*. Las bananas se cultivan en más de 120 países, principalmente en aquellos de áreas tropicales. *M. fijiensis* restringe la producción de la fruta y su enfermedad es la más costosa y dañina en todos los países productores de banana del mundo. El fitopatógeno afecta estrictamente al tejido foliar. Sus ascosporas se diseminan a través del aire por varios cientos de kilómetros entre las plantaciones vecinas. Cuando la espóra llega a la hoja candela o cigarro, penetra el tejido foliar a través del estoma, post-desarrollo epifítico en aproximadamente 6 días. El micelio al invadir el tejido foliar y reduce la capacidad fotosintética de la planta, de tal forma que esta se debilita y produce fruta de muy baja calidad. La maduración es causada por un estrés que aumenta los niveles de etileno.

M. fijiensis es un hongo hemibiotrófico (Hayden *et al.*, 2003). Esto significa que para desarrollar la enfermedad, cursa por dos fases con comportamientos fisiológicos y bioquímicos diferentes. En la primera fase llamada de biotrofia, el micelio se alimenta de los exudados de las células vegetales sin dañarlas, en un periodo que dura aproximadamente 20-25 días post-penetración. El cambio a la fase de necrotrofia se ha sugerido que se debe a la liberación de metabolitos secundarios que son tóxicos para las plantas tales como: juglona, fijiensina, 2,4,8

trihidroxi-tetralona, 4 hidroxiscitalona, y algunas otras toxinas hidrofílicas (Molina y Krausz, 1988; Stierle et al., 1991; Harelimana et al., 1997; Lepoivre, 2000; Hoss et al., 2000; Cruz-Cruz et al., 2009 y 2011). Algunos de estos metabolitos derivan de la síntesis de la melanina. La tetralona se produce *in vitro* hasta 30 veces más que los otros metabolitos, lo que sugiere que esta es la principal toxina de *M. fijiensis*. Sin embargo la juglona es más fitotóxica que la tetralona. Estos metabolitos provocan la muerte celular para tener acceso a los nutrientes ya que macroscópicamente se observan lesiones con rayas negras entre zonas cloróticas, secando la hoja (fase 5 y 6 de Meredith y Lawrence, 1969; Upadhyay et al. 1990) con una mayor producción de esporas, que posteriormente son diseminadas. Al inicio de esta fase se forman conidios y las ascosporas al final.

La juglona (1,4-naftoquinona) tiene como blanco el cloroplasto. Muchos estudios conllevan a la hipótesis que la fitotoxicidad de la juglona depende de su activación por luz. Sin embargo es considerada una toxina que juega un papel secundario como determinante de la patogenicidad y no hay evidencia que esta participe durante la fase biotrófica, que conlleva al estadio 1 de la enfermedad, ya que la clorosis ocurre hasta el estado 5.

Hoss et al. 2000, identificaron que plantas infectadas con *M. fijiensis* y tratadas con un inhibidor de la DHN melanina, el triciclazol, desarrollan rápidamente un mayor daño que las plantas infectadas con el hongo sin tratamiento con el inhibidor. Estos datos apoyaron la hipótesis que los metabolitos derivados de la síntesis de la melanina contribuyen con el desarrollo de los síntomas. Churchill en (2010) propone la hipótesis de que el metabolismo de la melanina está íntimamente ligado a y depende del primer paso de síntesis, la formación de tetra-

hidroxinaftaleno por la policetido-sintasa (*MfPks1*). Como resultado de esta mutación, se obtuvo una cepa de color cremoso, que fue igual de virulenta que la cepa silvestre y proponen que la melanina no está involucrada en la virulencia del hongo. Sin embargo, durante años ha sido observado que los síntomas de la Sigatoka disminuyen, cuando las plantas son cultivadas en la sombra lo que sugiere nuevamente de la participación de una toxina activada por la luz por este hongo. Durante años se propuso que este hongo producía una toxina fotosensible del tipo de las cercosporinas, por su relativa proximidad genética con el hongo fitopatógeno del tabaco y el maíz, *Cercospora*. Sin embargo esta toxina o los genes que la producen no han sido hallados en *M. fijiensis*. Tanto la activación de la melanina como la activación de la cercosporina, implica la formación de especies de oxígeno reactivas (EOR's) tales como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dioxígeno en singulete (1O_2) y el radical hidroxilo (OH).

Se ha demostrado que las EOR's son agentes causales del daño a los tejidos vegetales (Gill et al., 2010). Las EOR's reaccionan rápidamente y dañan membranas, lípidos, proteínas, pigmentos y ácidos nucleicos, llevando a un deterioro del funcionamiento provocando a la muerte celular vegetal (Benitez-Alfonso et al., 2011). Por ejemplo, la sobreproducción de 1O_2 provoca la pérdida de la integridad de los cloroplastos lo que precede a la ruptura de la vacuola central, para generar la muerte celular. Este proceso de muerte favorece la nutrición del hongo patógeno para completar su ciclo de vida en la hoja.

Este año una publicación de nuestro grupo propone que la melanina está asociado a una activación por luz, generando la muerte celular vía la generación de 1O_2 , una especie de oxígeno reactiva altamente citotóxica (Beltrán-García et al,

2014). Durante el curso de la infección este pigmento se va acumulando en las hojas después de la fase 1, y la máxima acumulación ocurre en la fase 4, previo a la muerte masiva de células de la hoja y donde otros autores proponen que el hongo está en la fase de necrotrofia.

Aún se desconocen muchos aspectos de la patogenicidad de este hongo, sobre todo la relación especies de oxígeno reactivas (EOR's), melanina, metabolitos derivados de la síntesis de este pigmento y los cambios en el comportamiento de biotrofia a necrotrofia.

Mycosphaerella fijiensis al ser un hongo fitopatógeno estrictamente foliar vive normalmente con: limitación de nutrientes, cambios bruscos de temperatura, cambio de presión osmótica y luz ultravioleta constante, los cuales son factores que modifican el estado redox, ocasionando un estrés oxidativo (Beltrán-García *et al.*, 2006). Esto, significa que por adaptación el hongo sobrevive al efecto de las especies de oxígeno reactivas en su nicho por las condiciones ambientales y en la interacción incompatible planta-patógeno. Pero en otro sentido, el hongo aprendió a utilizar EOR's como segundos mensajeros para procesos de señalización en la patogenicidad, probablemente en la producción de factores de virulencia.

La posibilidad de combatir la enfermedad por medio de agentes químicos es cada vez menos efectiva. En este caso la activación de sistema de transferencia de señales y sus factores de transcripción específicos, aumentan la expresión de genes que codifican para proteínas antioxidantes y otras proteínas que expulsan los agentes tóxicos de la célula fúngica (Odriozola-Casas, manuscrito en preparación). Es probable que MfAP-1, el homólogo de AP-1 de mamífero, perciba el estrés oxidativo y en consecuencia active sistemas que disminuyen los niveles

de EOR's, así como sistema de reparo de los daños producidos por estos oxidantes.

Este proyecto aborda desde un acercamiento bioquímico y molecular, el papel de las especies de oxígeno reactivas y moléculas como la juglona en la activación de genes, que son importantes en la modificación de la sensibilidad a los fungicidas e influyen en la virulencia. Hemos propuesto la hipótesis que el cambio de fase biotrófica a necrotrófica en *M. fijiensis* está ligada a la producción de EOR's donde el dioxígeno en singulete puede ser la señal a través de la síntesis y activación de la melanina. Encontramos que existe una conexión entre factores de virulencia y resistencia a fungicidas: La proteína Flr1.

II. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de las especies de oxígeno reactivas en la activación de genes relacionados en la virulencia del hongo *M. fijiensis*.

III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudios de Virulencia

1.- Determinar la dinámica de secreción de melanina producida por tres cepas de *Mycosphaerella fijiensis* en un medio líquido Papa Dextrosa.

2.- Evaluar el efecto citotóxico sobre el desarrollo del micelio de 2 cepas de *M. fijiensis* ejercido por los productos solubles formados durante la inhibición de la síntesis de la 1,8 DHN.

3.- Evaluar el desarrollo de *Mycosphaerella.fijiensis*, *Fusarium spp.* y *Escherichia coli* expuesto a varias concentraciones de Juglona, una fitotoxina generadora de dióxigeno en singulete producida por *M. fijiensis*.

4. Analizar la expresión de genes relacionados con la síntesis de melanina (*pks1*, *pks2* y *scytd*) y estrés oxidativo (*cat-1*, *sodcuzn*, *pdx* y *flr1*) en presencia de Juglona.

IV. HIPÓTESIS

En el hongo fitopatógeno de la banana *Mycosphaerella fijiensis*, el fenómeno de virulencia está relacionado a la producción de EOR's, de tal forma que el dioxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$) funciona como un regulador de su expresión genética.

V. ANTECEDENTES

1. Sigatoka negra: El cultivo de plátanos y la biología de la enfermedad.

A) Plátano y banano

Los plátanos y bananos son vitales para la seguridad alimentaria en muchos países tropicales y subtropicales, y es una fruta popular en los países industrializados (Lescot, 2011). El banano es el cuarto cultivo más importante por su consumo mundial, así como por su contenido de fuentes de carbohidratos en especial el almidón, vitaminas y minerales. La producción anual en el mundo asciende a 102 millones de toneladas, en una superficie de 4,843, 595 hectáreas (ha) distribuidas en 120 países de zonas tropicales y subtropicales. Los principales países productores son India, Filipinas, China, Brasil, Ecuador e Indonesia, donde México ocupa el octavo lugar (FAOSTAT, 2012). Los principales países importadores de bananas a nivel mundial son: Estados Unidos, Bélgica, Alemania, Rusia, Reino Unido y Japón. Mientras que los principales países exportadores de bananos son Ecuador, Bélgica, Colombia, Costa Rica, Guatemala. México exporta 45,000 toneladas anualmente, y representa el 3% de la producción nacional (FAOSTAT, 2012).

México, presenta una superficie de 78,130 ha, y una producción de 2'232,361 ton. Los principales estados productores se agrupan en tres regiones: Golfo de México que comprende los estados de Tabasco, Veracruz y Oaxaca; Pacífico Sur

representado por Chiapas, y Pacífico Centro que abarca los estados de Colima, Michoacán, Jalisco, Guerrero y Nayarit (SIAP, 2011).

Los bananos y plátanos son afectados por enfermedades que reducen el rendimiento y calidad del fruto. Los problemas fitopatológicos más importantes en México son: sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), nematodo barrenador (*Radopholus similis* (Cobb) Thorne), mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense), moko del plátano (*Ralstonia solanacearum* raza 2), pudrición del cormo (*Erwinia* sp.) y mancha café por Cordana (*Cordana musae* A. Zimmerm.) (Orozco, et al., 2001).

B) La Sigatoka negra

La Sigatoka negra es la enfermedad que más afecta la producción comercial de bananos (*Musa* AAA) y plátanos (*Musa* AAB) en la mayoría de las regiones productoras del mundo (Fullerton y Stover, 1990). En el Continente Americano, la Sigatoka negra se identificó por primera vez en Honduras en el año de 1972 (Stover y Dickson, 1976), de ahí se diseminó a todos los países de América Central, México y parte de América del Sur (Fullerton y Stover, 1990). La enfermedad se conoce en Asia y África como la raya negra de la hoja. En México se identificó por primera vez en los estados de Chiapas y Tabasco en 1981 (Contreras, 1983).

La Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, anamorfo *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, es considerada la enfermedad más importante que afecta la producción comercial de banano y plátano (*Musa* spp.) en la mayoría de las regiones productoras del mundo (Marín

et al., 2003), debido a que causa altas pérdidas económicas como resultado de la disminución en el rendimiento del cultivo y la calidad del fruto (Arzanlou et al., 2007).

C) Complejo Sigatoka

Existen 3 diferentes especies de *Mycosphaerella* (Aptroot, 2006) patógenas de bananos y plátanos en el mundo (Stover, 1963; Stover, 1969; Carlier et al., 2000; Marín et al., 2003; Crous et al., 2003). Entre ellas *Mycosphaerella musicola* (anamorfo *Pseudocercospora musicola*), agente causal del “chamusco” o Sigatoka amarilla, 2) *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Paracercospora fijiensis* Deighton), causante de la Sigatoka negra (Mülder y Stover, 1976; Marín et al., 2003) y 3) *Mycosphaerella eumusae* (anamorfo *Pseudocercospora eumusae*), agente causal de la mancha foliar eumusae (Crous y Mourichon, 2002).

La morfología de estas especies es muy similar y muchas veces co-habitan en la misma lesión (Crous 1998). Se cree muy probable que existan otras especies de *Mycosphaerella* de este complejo que aún no han sido reconocidas, los científicos se han enfrentado a nuevos retos, tratando de identificar de una forma rápida y confiable. Por lo que en 2007, Arzanlou y colaboradores, desarrollaron un método altamente sensible para distinguir a *M. fijiensis* de *M. musicola* y *M. eumusae* en la misma hoja.

Dentro del complejo Sigatoka, la sigatoka negra es la más importante en la mayoría de las regiones productoras de musáceas en el mundo de bananos (*Musa* AAA) y plátanos (*Musa* AAB), por su amplia distribución y su agresividad en los diferentes cultivares de bananos y plátanos, así como por los períodos de

incubación cortos y su gran capacidad de diseminación (Churchill, 2011), además de las grandes pérdidas económicas que se generan como resultado de la disminución en el rendimiento del cultivo y la calidad del fruto (Arzanlou et al., 2007). La enfermedad se reportó por primera vez en la isla de Fiji. En el Continente Americano, la Sigatoka negra se identificó por primera vez en Honduras en el año de 1972 (Stover y Dickson, 1976), de ahí se diseminó a todos los países de América Central, México y parte de América del Sur (Fullerton y Stover, 1990). La enfermedad se conoce en Asia y África como la raya negra de la hoja. En México se identificó por primera vez en los estados de Chiapas y Tabasco en 1981 (Contreras, 1983).

D) Ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis*

Sexual: Este hongo se reproduce sexualmente por la formación de estructuras de reproducción como los peritecios, espermagonios y ascosporas. El peritecio y espermagonio ocurren en proporciones variables durante los estados 2 y 3 de desarrollo de los síntomas. Los espermagonios son más abundantes en el envés de la hoja al colapsar las lesiones, son oscuros, de forma picuda y tienden a dar brotes (Bennett and Arneson, 2003). Frecuentemente se desarrollan en la cámara subestomática; constituyen la parte masculina y en estado maduro contienen espermatides en forma de bastoncillos o varillas hialinas que actúan como gametos, que fertilizan a los peritecios que aparecen en los estados 5 y 6 de la enfermedad (Meredith y Lawrence, 1969). Los peritecios son estructuras globosas de paredes oscuras y células poligonales, ligeramente hundidos en el tejido de la hoja. Se presentan más frecuentemente en el envés de las hojas y su estado

maduro contiene numerosas ascas que contienen ocho ascosporas cada una como resultado del proceso sexual (Meredith y Lawrence, 1969). Una vez realizada la fecundación, se desarrollan en su interior, ascas que contienen a su vez las ascosporas (Stover, 1980). Una lesión de sigatoka negra en estado de mancha gris es capaz de producir hasta 480 pseudotecios, los cuales en su interior tienen de dos a cuatro ascas cada uno. Las ascas poseen ocho ascosporas por lo que un peritecio produce de 16 a 32 ascosporas, mientras que una lesión puede liberar eventualmente de 7,680 a 15,360 ascosporas. Con lo anterior se respalda el elevado potencial de inóculo del hongo *M. fijiensis* en una lesión. Las ascosporas son la fuente principal de inóculo de la enfermedad (Stover, 1980), son diseminadas por el viento y depositadas principalmente en la hoja "cigarro" y en las cuatro hojas más jóvenes de la planta (Mulder y Stover, 1976). La dispersión de esporas a larga distancia es limitada y puede viajar por las corrientes de aire a pocos cientos de kilómetros, ya que son susceptibles a la radiación de rayos ultravioleta (Parnell *et al.*, 1998).

Asexual: *Paracercospora fijiensis* se caracteriza por producir conidios individuales y apicales en el conidióforo, son hialinos, cilíndricos, rectos a ligeramente curvos, con 6 a 9 septos, delgados en el ápice y más anchos en la base con una cicatriz en el hilum basal del conidio (Meredith y Lawrence, 1969). Los conidióforos pueden emerger directamente por el estoma de manera individual o en grupos, o bien pueden formarse a partir de células del estroma de color oscuro y son fácilmente vistos en el estado 2 de la enfermedad (Mulder y Stover, 1976). A partir de un solo conidióforo pueden formarse cuatro conidios maduros

(Meredith y Lawrence, 1969).

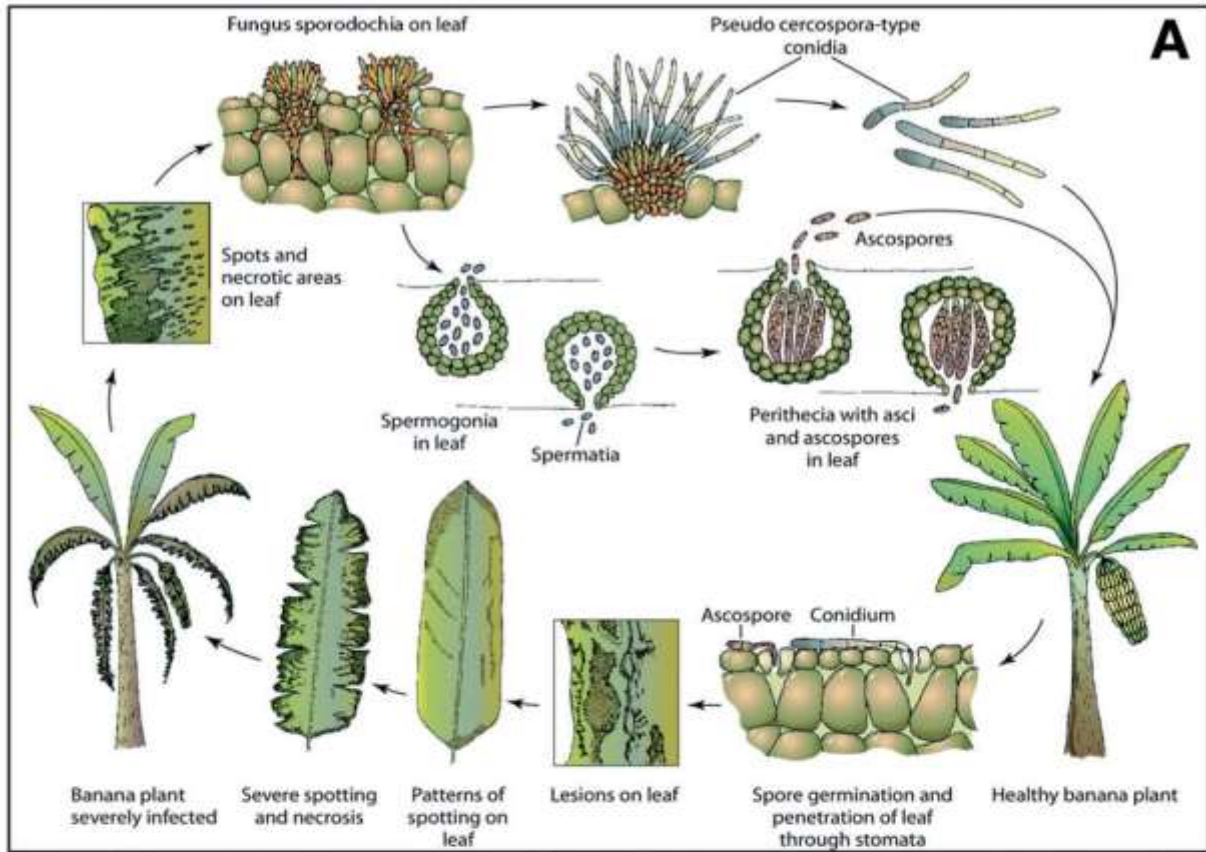


Figura 1. Desarrollo del ciclo de vida de la sigatoka negra. (Figura tomada de Agrios, 2005, Churchill et al., 2010.)

E) Variabilidad genética

Se han realizado estudios de análisis genético molecular en este hongo, donde el apareamiento solo puede ocurrir entre cepas que tengan un tipo de apareamiento opuesto (mating type). Estos apareamientos son determinados por medio de secuencias que son muy diferentes, llamadas, idioformas, las cuales están unidas a regiones que son comunes en todos los aislados de determinadas especies, y

donde las secuencias conservadas se les llama “caja alfa” (mat-1) y (caja HGM) mat-2. (Turgeon y Yoder, 2000). La distribución de los alelos de apareamiento no significa que exista una etapa sexual, sin embargo, la presencia de dos idioformas a frecuencias iguales es indicativo de la recombinación sexual en una población dada (Linde et al., 2003). La reproducción sexual promueve el flujo de genes entre individuos y el reacomodo como resultado del cruce los cuales generan nuevas combinaciones de alelos, y por lo tanto incrementando la cantidad de variabilidad genética entre el patógeno (Queiroz et al., 2013).

En México, se han realizado estudios sobre análisis genético molecular de aislados de *M. fijiensis* colectados en los estados bananeros de Colima, Michoacán, Tabasco, Chiapas y Oaxaca. Esto con el fin de conocer la diversidad genética presente dentro y entre las regiones productoras de banano. El resultado demostró agrupamientos genéticos formados principalmente por aislamientos con el mismo origen geográfico (estados). Esto significa que no existe una población homogénea de *M. fijiensis* en la República Mexicana, sino que existen subpoblaciones regionales, demostrando la existencia de diversidad genética entre los aislados del patógeno. El hongo *M. fijiensis*, se distribuye como subpoblaciones regionales (Manzo-Sánchez, et al., 2012). Estas diferencias genéticas pueden conferirle a las subpoblaciones diferencias en agresividad y resistencia a fungicidas. En poblaciones de *M. fijiensis*, la distribución equitativa de alelos de apareamiento confirma la transmisión hereditaria de estos genes (Conde-Ferrández et al., 2010).

F) Patogénesis

Las esporas de Sigatoka Negra se desplazan con el viento, lluvia y rocío de agua, las cuales son la principal fuente de infección (Marín et al., 2003). Las ascosporas del hongo son expulsadas de los cuerpos fructíferos conocidos como peritecios, son transportadas por las corrientes de aire y depositadas sobre la superficie de las hojas. En cambio, los conidios se producen en esporodoquios en lesiones jóvenes (pizcas y estrías), son diseminadas por el salpique de las gotas de agua de lluvia, por las gotas de agua de rocío y corrientes de aire. En ambos casos, la llegada de inóculo y la infección ocurre en las hojas más jóvenes y la penetración es exclusivamente por estomas. Las ascosporas y conidios germinan en la hoja (Stover y Simmonds, 1987), y posteriormente presentan un crecimiento epifítico de los tubos germinativos, los cuales penetran a través del estoma, y proliferan en el tejido intercelular de la hoja (Meredith y Lawrence 1969).

El patógeno establece una relación biotrófica durante 3 a 4 semanas previo a la aparición de síntomas necróticos (Hoss et al., 2000). La enfermedad se desarrolla favorablemente cuando existe una humedad relativa y precipitación alta; mientras que a temperaturas menores de 20 °C y periodos secos inhiben el crecimiento del hongo (Craenen, 1998). Meredith y Lawrence (1969) y Fouré (1985) identificaron seis estados de evolución de síntomas de la enfermedad: 1) Estado de punto inicial: aparición de puntos pequeños de color amarillo pálido visibles en el envés de la hoja; 2) Primer estado de estría: la estría es de color castaño son visibles en el haz y paralelas a las venas laterales de la hoja; 3) Segundo estado de estría: las estrías se alargan las cuales toman una coloración marrón oscuro y son visibles en el envés como rayas amarillas; 4) Primer estado

de manc: las estrías se amplían y se tornan color marrón oscuro y son rodeadas por una zona amarilla pálida; 5) Segundo estado de mancha: la mancha inicia un colapso y se forma un halo amarillo ligero, el cual rodea el borde acuoso de la mancha; 6) Tercer estado de mancha: el centro de la mancha se seca, adquiere un color gris claro y es rodeada por un halo amarillo brillante y por un borde oscuro.

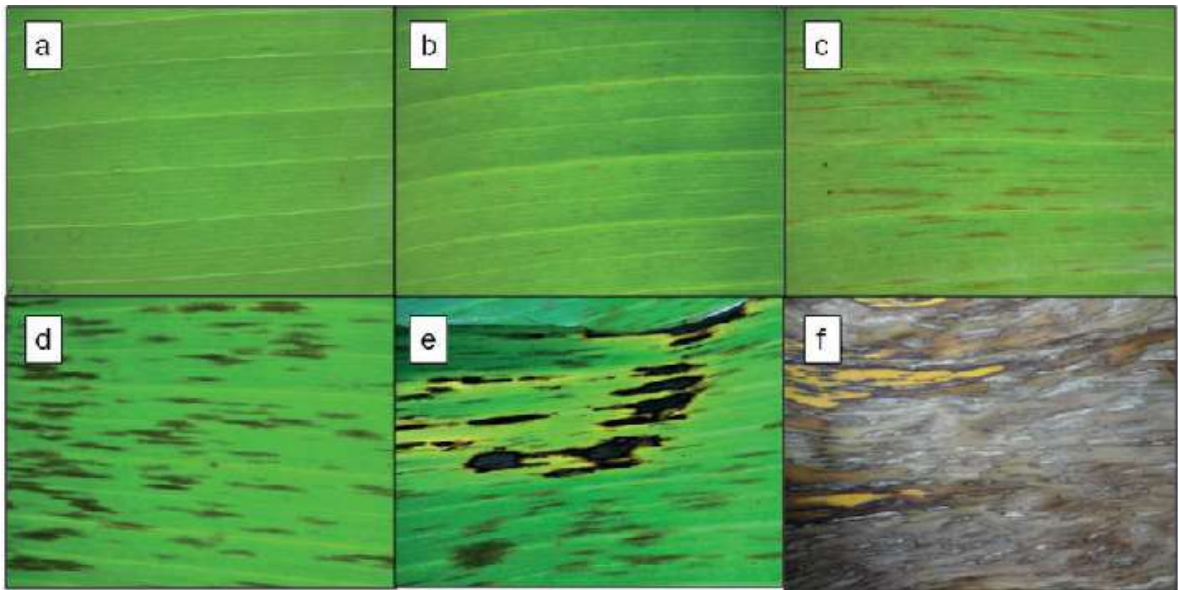


Figura 2. Desarrollo de la enfermedad. Imagen tomada del libro de Sigatoka negra (Orozco-Santos, 2011).

G) Impacto de la enfermedad sobre *Musa spp.*

El hongo provoca lesiones foliares necróticas que se expanden y destruyen los tejidos, reduciendo la capacidad fotosintética, el volumen de producción e inducen la maduración del fruto (Stover, 1974; Chillet et al., 2009). Durante el desarrollo del

fruto, grandes cantidades de carbono (12-13% del peso fresco) son acumulados como almidón, el cual es parcial o completamente degradado a azúcares solubles durante el proceso de maduración (8-20%) dependiendo del cultivar (Cordenunsi et al., 1995; Soares et al., 2011). Las lesiones foliares que son provocadas en el transcurso de la enfermedad llevan a una reducción del área fotosintética de la planta reduciendo el contenido de clorofila y por consiguiente la actividad fotosintética en las hojas. Derivado de lo anterior las cantidades de almidón y azúcares solubles en las hojas también son reducidas, provocando la obtención de frutos de menor tamaño a comparación de plantas sanas (Ramsey et al., 1990). El proceso intermedio entre la cosecha y el proceso de maduración (fruto inmaduro o verde) es aproximadamente un 33% más corto, es decir la maduración del fruto se lleva a cabo de forma prematura en las plantas infectadas con Sigatoka negra (Ramsey et al., 1990), por lo que la etapa de la poscosecha se ve severamente afectada en cuanto a la calidad de la fruta, provocando pérdidas económicas importantes (Castelan et al., 2012). Naturalmente en los frutos se produce etileno, la cual acelera la maduración de los frutos, así mismo el ácido indolacético tiene función en la maduración, por lo que Castelan y colaboradores (2012) observaron la existencia de un incremento en la producción de etileno en frutos provenientes de plantas infectadas con Sigatoka negra.

H) Control de la enfermedad y resistencia a fungicidas

La Sigatoka negra, desde su aparición en México en 1980-81, se ha convertido en el principal problema fitosanitario en todas las regiones productoras de banano en México. En los últimos veinte años, la enfermedad se diseminó a todas las áreas bananeras de México, en donde el control químico es el método más usado para su combate. Sin embargo, el uso de este control se ha visto limitado por diferentes factores como: la naturaleza compleja del patógeno (tipo de reproducción, patogenicidad, diseminación, entre otros) y a las características del hospedero (uniformidad genética por su reproducción sexual, plantaciones extensas y tejido susceptible disponible durante todo el año), lo cual ha permitido una estrecha relación entre el huésped y el parásito. La enfermedad se ha adaptado a las diversas condiciones ambientales y con el tiempo el patógeno se ha vuelto más agresivo, lo cual dificulta su manejo e incrementa los costos de producción. En las regiones de trópico seco, su incidencia y severidad es menor con relación a las regiones tropicales húmedas por las diferencias notables en la cantidad y distribución de las lluvias. En el Occidente de México (trópico seco), la enfermedad presenta un comportamiento cíclico: una fase epidémica de alta severidad relacionada con la época de lluvias y otra fase de baja prevalencia asociada a la estación seca (Orozco-Santos, 1996; Orozco-Santos, 1998).

Se estima que el combate de Sigatoka negra se encuentra entre un 35 a 48% del total de costos de producción del cultivo, ya que además de utilizar control químico se ha estado mejorando la nutrición, densidad de población, deshoje, deshoje, control de plagas y maleza, lo que trajo como consecuencia aún un mayor incremento en los costos de producción. Sin embargo, también provocó un

aumento en el rendimiento y calidad del fruto por unidad de superficie debido a un mejor manejo agronómico (Orozco-Santos *et al.*, 2013). En México, anualmente se gastan más de 500 millones de pesos (40 millones de dólares) para el combate de sigatoka negra (Orozco-Santos *et al.*, 2010). El excesivo uso de fungicidas utilizados en el combate de la sigatoka negra ha desarrollado problemas alternos en cuestiones de contaminación ambiental, desequilibrio ecológico, enfermedades degenerativas y más aún pérdida de sensibilidad del hongo a muchos de los fungicidas usados. Con todo esto, es necesario utilizar nuevas alternativas que sean amigables con el ambiente para reducir la cantidad de compuestos químicos.

La resistencia a fungicidas es un factor muy importante ya que limita la eficiencia de los programas de manejo integrado del hongo, al incrementar dosis o frecuencias de aspersiones. Varios estudios muestran la capacidad de *M. fijiensis* para desarrollar resistencia a fungicidas sistémicos de los grupos benzimidazoles (Aguilar *et al.*, 2013), triazoles (Romero y Sutton, 1997; Pérez, *et al.*, 2003) y estrobirulinas (Sierotzki, *et al.*, 2000; Marín *et al.*, 2003). A nivel nacional hasta el año de 1995, la base del control de sigatoka negra eran los fungicidas de acción sistémica. Anualmente se aplicaban alrededor de 430 mil kilogramos de ingrediente activo. En la actualidad, la base del control químico de sigatoka negra en México son los fungicidas protectantes (80 a 90% del total de ciclos) y en menor proporción los sistémicos (10 a 20%). Sin embargo, la cantidad aplicada de ingrediente activo de fungicidas por unidad de superficie se ha incrementado, debido a las dosis más altas de protectantes y al mayor número de ciclos de aspersión. Se estima que más de 2.5 millones de kilogramos de ingrediente activo de fungicidas protectantes son depositados anualmente a escala nacional

(Orozco-Santos *et al.*, 2010). En regiones productoras como Tabasco, en donde las condiciones climáticas (2,500 a 3,000 mm de precipitación anual) son muy favorables para el desarrollo de la enfermedad, se requieren cada año de 45 a 60 aspersiones de fungicidas, principalmente del tipo protectantes y en una baja proporción sistémicos. En cambio, en la región del Pacífico Centro, son necesarias de 25 a 38 aplicaciones, mientras que en el Pacífico Sur son necesarias de 35 a 45 ciclos en los programas de aspersión de fungicidas protectantes y en mucho menor escala de sistémicos (Orozco-Santos *et al.*, 2010).

Fungicidas protectantes o multisitios: llamados así por que su acción en diferentes procesos que son vitales para el desarrollo del hongo como: metabolismo de las proteínas, interfieren la oxidación de ácidos grasos, afectan la producción de energía/ATP (trifosfato de adenosina) y bloquean la enzima deshidrogenasa (Fig. 43) (FRAC, 2013). No penetran el tejido foliar, solo son distribuidos uniformemente en la hoja formando una especie de “capa protectora” evitando que el hongo penetre. Actúan al inhibir la germinación de la espora o el tubo germinativo. Un ejemplo de este tipo de fungicidas es la familia de los ditiocarbamatos, a la cual pertenece el Mancozeb y el Propineb.

Otro método de control además de los químicos y culturales son las variedades de banano resistentes. Se han desarrollado híbridos experimentales con la finalidad de generar plantas que sean genéticamente resistentes a *Mycosphaerella fijiensis* (Ferreira *et al.*, 2004). Sin embargo la alta diversidad genética que presenta *M. fijiensis* (Yang *et al.*, 2008; Fahleson *et al.*, 2009) ha representado un obstáculo para el desarrollo de plantas resistentes ya que al generarlas existe la gran posibilidad de ser rápidamente sustituida (Santana *et al.*, 2012).

Desde la obtención del genoma completo de *Mycosphaerella fijiensis*, se ha logrado eficientizar el desarrollo de técnicas moleculares para adquirir información del fenómeno de resistencia, ya que no solo es un proceso de mutación, si no, que a su vez se debe a la activación de la expresión de genes que codifican para factores antioxidantes (*Cat-1*, *Cat-perox*, *SodCuZn*, *Trr*) en el caso de fungicidas que generan estrés oxidativo, así como de bombas que participan en la desintoxicación como es el caso de genes de resistencia a multidroga como *Flr1* y el factor de transcripción *MfAp-1* (*Odriozola-Casas, manuscrito en preparación*).

I) Interacción planta-Patógeno

En la interacción planta-patógeno, las plantas son capaces de reconocer la presencia de los patógenos a diferentes niveles durante la infección (Jones y Dangl, 2006; Dodds y Rathjen, 2010). Sin embargo, la primer línea de defensa por parte de la planta está constituida por barreras físicas tales como: la cutícula y la pared celular. La segunda línea de defensa se activa en el momento en que la planta reconoce a una proteína efectora específica del patógeno las cuales son producidas en primera instancia por el patógeno para evadir al Sistema inmune de la planta. En este momento la planta activa mecanismos moleculares y biológicos para contrarrestar este efecto: siendo las fitoalexinas y la producción de EORs a nivel de la superficie celular, provocando estrés oxidativo (Doke et al., 1983). Algunos investigadores han indicado que el estrés oxidativo puede servir no solo como un agente protector contra el patógeno si no también como un activador de señales de la defensa en la planta (Kim et al., 2008; Van Breusegem et al., 2008; Karpinski et al., 2013). El estudio de efectores de hongos ha sido escaso,

por lo que no se sabe con claridad si secretan estas moléculas al apoplasto o los llevan a las células huésped donde pueden suprimir las respuestas de defensa o alterar el metabolismo del huésped (Kamoun, 2009; Panstruga and Dodds, 2009; Ellis *et al.*, 2009). Los primeros efectores identificados en hongos se descubrieron al clonar las proteínas Avr que son reconocidas por las proteínas R del huésped, lo que indica el reconocimiento en el citoplasma de la célula (Dodds *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2000). Así mismo, se han detectado efectores fúngicos dentro de la célula huésped (Kemen *et al.*, 2005; Khang *et al.*, 2010; Rafiqi *et al.*, 2010). Algunos autores sugieren que el estrés oxidativo que se da en la interacción planta patógeno lleva al cambio de fase de biotrofia a necrotrofia en hongos hemibiotróficos. Siendo el estrés oxidativo y estos factores de virulencia que pueden provocar la muerte celular por parte de la planta.

J) Factores de virulencia relacionados con hongos hemibiotróficos

1. – Definición de Hongos biotróficos

Los hongos fitopatógenos han sido clasificados en base a su mecanismo de alimentación como: 1) biotróficos; 2) necrotrofos; y 3) hemibiotróficos. Los hongos biotróficos se definen por su dependencia del hospedante para completar su ciclo de vida, es decir utilizan nutrientes de las células vivas (Thomazella *et al.*, 2012), teniendo como características fundamentales las siguientes: 1. Desarrollo de estructuras altamente desarrolladas para el proceso de infección; 2. Actividad limitada de enzimas líticas; 3. Existencia de capas de separación interfaciales formadas a partir de carbohidratos y proteínas, cuya función es la separación de

las membrana del hongo con la de la planta; 4. Inhibición prolongada por parte de la planta (Mendgen and Hahn, 2002; Thomma *et al.*, 2005). Por ejemplo, *C. fulvum* es un hongo biotrófico patógeno del tomate (Thomma *et al.*, 2005), el cual coloniza las hojas del hospedero creciendo en los espacios extracelulares sin penetrar las células (Koek *et al.*, 2011). El primer efector fúngico que fue caracterizado fue la proteína Avr9 de *C. fulvum* (Vandenackerveken *et al.*, 1992). Sin embargo, con la ayuda de otros efectores, los cuales actúan a nivel de la pared celular evadiendo el reconocimiento al inhibir la síntesis de quitinasas (de Jonge *et al.*, 2010). Otro ejemplo de hongo biotrófico es el patógeno del maíz *Ustilago maydis* el cual penetra la célula fúngica y forma una invasión masiva con sus hifas las cuales rodean a la membrana plasmática y se piensa que ahí es donde ocurre la mayor absorción de nutrientes así como el intercambio de señales (Brefort *et al.*, 2009). La patogenicidad de *U. maydis* se debe a proteínas secretadas (429) el 20% de genes que codifican para estas proteínas están organizados en 12 clusters los cuales se ha observado que incrementan su expresión en el proceso de infección (Kamper *et al.*, 2006), un ejemplo de estas proteínas es la Pep1 la cual es necesaria colonizar. *Blumeria graminis* es otro ejemplo de hongo biotrófico. Es un patógeno del trigo y la cebada (*B. graminis* f.sp. *hordei*- *B. graminis*). Su crecimiento es a través de hifas filamentadas en la superficie de la hoja, sin embargo, después de penetrar la pared de las células epidérmicas se forman estructuras especializadas: haustoria, dichas estructuras rodean la membrana plasmática (Koeck *et al.*, 2011).

2. - Hongos Necrotrotóxicos

En contraste con los hongos biotróficos, los necrotrotóxicos, deben matar a los tejidos para tomar los nutrientes de las células muertas. Macroscópicamente se observan síntomas de necrosis. Dicha necrosis se atribuye se atribuye a la secreción de toxinas y enzimas, para que posteriormente se tomen los nutrientes liberados del tejido necrotico (Horbach *et al.*, 2011). Esta fase tardía de necrotrotía es muy agresiva por lo que limita la capacidad de la planta para el establecimiento de una respuesta como sucede en la fase de biotrotía. *Stagonospora nodorum*, es un hongo ascomiceto necrotrotóxico que provoca la mancha del trigo. Se ha encontrado que el patosistema de *S. nodorum* está basado en interacciones que incluyen efectores proteicos. Analisis genéticos y genómicos de este hongo han revelado la habilidad de este patogeno y otros hongos *Pleosporales* para producir toxinas específicas del hospedante, las cuales son parte importante de la patogénesis (Friesen *et al.*, 2008; Hane *et al.*, 2007; Pandelova *et al.*, 2009). La toxina ToxA es una de ellas y provoca la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y la acumulación de H₂O₂ (Kwon *et al.*, 1998; Manning *et al.*, 2009). *Pyrenophora tritici-repentis* es el agente causal de la mancha parda del trigo, hasta ahora se han identificado dos efectores proteicos: PtrToxA y PtrToxB, Por otro lado tenemos la producción de tóxicas no específicas del hospedante como la SnTox1 la cual tiene un alto contenido de residuos de cisteina. En *Cochliobolus victoriae* se produce una molécula llamada victorin que utiliza como factor de virulencia o en su defecto efector. *Alternaria alternata* produce la toxina AAL la cual es crucial para su virulencia (Walton 1996; Wolpert *et al.* 2002). Para *Alternaria brassicae* patógeno de las *Brassicaceas*, produce efectores proteicos

que inducen necrosis (Parada *et al.*, 2008) como la toxina *Abr* en *Penicillium digitatum*, este es el agente causal del moho verde enfermedad de postcosecha. Su mecanismo de acción necesita de una lesión previa en la fruta para poder penetrar al tejido vegetal, para su posterior colonización a través de enzimas de “maceración”, este patógeno presenta un alto grado de especificidad al hospedante (Barkai-Golan *et al.*, 2005).

Pyrenophora teres patógeno de cebada, sintetiza proteínas que inducen fuertemente la necrosis (PtrToxA y SnToxA) siendo dependiente de la luz para dicho efecto (Sarpeleh *et al.* 2008). Por otro lado tenemos al hongo necrotrófico *Rhynchosporium secalis* patógeno de cebada provocando la escaldadura en el cual se han identificado dos proteínas que participan en la virulencia: Nip1,2 y 3. Nip1 y 3 alterando el gradiente electroquímico del proton (Wevelsiep *et al.* 1991, 1993), también se ha encontrado que Nip1 se une a un receptor por parte de la planta, de este modo deshabilita la defensa de la (van't Slot *et al.* 2007).

3. - Hongos Hemi-Biotróficos

En algunos patosistemas, el patógeno inicia alimentandose de las secreciones de las células vivas (fase biotrófica), sin embargo, al transcurrir el tiempo y en la etapa de infección se alimenta de células muertas (fase necrotrófica), al tener ambas características se dice que es un hongo hemibiotrófico (Glazebrook, 2005). Dichas características hacen que la infección sea exitosa ya que la fase biotrófica se dice que es asintomática hasta llegar a la fase necrotrófica provocando síntomas visibles en la planta (Munch *et al.*, 2008). Uno de ellos es *Magnaporthe oryzae*, provoca el añublo del arroz (Couch and Kohn, 2002). Después de penetrar

el tejido foliar se forma una hifa primaria filamentosa rodeando la membrana plasmática, se forma una estructura lobular llamada complejo biotrófico interfacial (Khang *et al.*, 2010). Previo a la translocación al citosol el hongo acumula proteínas efectoras en dicho complejo y en las primeras 12 horas postinoculación las estructuras especializadas se proliferan y la producción de estas proteínas continua de célula en célula (Kankanala *et al.*, 2007). Así mismo tenemos el ejemplo del patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* previo a la penetración de la pared celular, el crecimiento se da de una forma biotrófica con una hifa intracelular primaria por algunos días, posteriormente se forma una hifa más estrecha las cuales matan a las células del hospedero y se proliferan alimentándose de ellas (Mendgen *et al.* 2000). Un hongo hemibiotrófico reconocido por reaccionar con H₂O₂ en diferentes fases del crecimiento es *Septoria tritici*, Shetty *et al.*, 2003 encontró que al inicio de la infección poco H₂O₂ es acumulado, sugiriendo el inicio de la fase biotrófica después de la penetración del estoma, sin embargo al transcurrir 11 días se acumula gran cantidad de H₂O₂ lo que provoca un colapso del tejido y necrosis que coincide con la esporulación del patógeno. Esto sugiere que durante la fase biotrófica el hongo es parcialmente inhibido por la respuesta oxidante, posterior al cambio de biotrófico a necrotrófico el hongo se beneficia en presencia de altas concentraciones de H₂O₂. Estudios *in vitro* muestran que *S. tritici* puede ser inhibido con 10 mM en un cultivo de 4 días de inóculo, por otra parte el micelio de un cultivo de 16 días se inhibe menos que el de 4 días, sin embargo esta diferencia en la sensibilidad coincide con los cambios en la fisiología del hongo durante la transición de la biotrofia a la necrotrofia (Shetty *et al.*, 2007).

K) Factores de virulencia en *Mycosphaerella fijiensis*

Fitotoxinas

1. Toxinas selectivas del hospedante (TSH)

Las TSH son consideradas como determinantes primordiales en la patogenicidad ya que su producción es requerida para la colonización de la planta por parte del patógeno. Estos metabolitos pueden provocar síntomas de la enfermedad aún en ausencia del patógeno y son tóxicas únicamente para el hospedante que fueron producidas (Markham and Hille 2001; Walton 1996; Wolpert et al. 2002). La 2, 4, 8-trihidroxitetralona (2,4,8-THT) es una toxina selectiva del hospedante (Hoss *et al.*, 2000), era considerada la fitotoxina más importante al ser encontrada en grandes cantidades en los extractos obtenidos (Strobel *et al.*, 1993), sin embargo se encontró que la activación temprana del metabolismo de la 2,4,8-THT por cultivos resistentes provoca microlesiones necróticas ya que se active la defensa por parte de la planta, lo que lleva a una incompatibilidad del patógeno hacia la planta.

2. Tóxicas no selectivas del hospedante (TNSH)

A diferencia de las TSH las TNSH no son esenciales en el proceso de infección, pero si contribuyen en la virulencia por parte del patógeno, así mismo son reconocidas como metabolitos secundarios en la patogenicidad. Dichos metabolitos pueden dañar un amplio rango de hospedantes, provocando una gran variedad de síntomas (Ballio and Graniti 1991; Knogge, 1996; Mitchell, 1984).

Compound Structure	Retention time (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Product ions (m/z)
 (1,2,4,5-THN)	7.2	191	173 [M-H-H ₂ O], 155 [M-H-2H ₂ O], 117 [M-H-(-COH-COH-CH= + 3H)], 111 [M-H-(-COH-CH-CH-CH-C=)], 85 [M-H-2H ₂ O-(-COH-CH-CH-CH- + 2H)], 73 [M-H-2H ₂ O-(-COH-CH-CH-CH-C- + 2H)]
 (1,3,6,8-THN)	7.6	191	129 [M-H-H ₂ O-(-COH=CH- + 2H)], 111 [M-H-(-CH-COH-CH-C-CH=)], 87 [M-H-H ₂ O-(-CH=COH-CH-COH- + 2H)], 85 [M-H-H ₂ O-(-CH=COH-CH-COH- + 4H)]
 (J)	13.7	173	129 [M-H-(-COH=CH- + 2H)], 111 [M-H-H ₂ O-(-CO-CH= + 3H)], 85 [M-H-H ₂ O-(-COH-CH-CH-CH- + 2H)]
 (4-HJ)	23.1	209	165 [M-H-(-COH=CH- + 2H)], 123 [M-H-(-COH-CH-COH-CH- + 2H)], 81 [M-H-(-C-CO-CH ₂ -CHOH-CHOH-C= + 2H)]
 (J)	27.2	205	187 [M-H-H ₂ O], 177 [M-H-CO], 161 [M-H-CO ₂]
 (3-HJ)	31.5	189	161 [M-H-CO]
 (2-HJ)	36.4	189	161 [M-H-CO]

Figura 3. Análisis de metabolitos acumulados en cultivos de *M. fijiensis* en presencia de triziclazol y pyroquilon. Compuestos encontrados: 1,2,4,5 tetra-hidroxinaftaleno (1,2,4,5-THN), 1,3,6,8 tetra- hidroxinaftaleno (1,3,6,8 THN), Juglone (3-HJ, 4-HJ). Figura tomada de Beltrán-García et al., 2014.

A) Juglona

La fitotóxina juglona es una tóxina no específica del hospedante y produce síntomas en banana y en otras especies vegetales (Molina and Krausz, 1988). Como su nombre lo define la juglona no es considerada necesaria para la patogenicidad, sin embargo funciona como un factor de virulencia provocando un incremento en la progression de la enfermedad (Molina and Krausz, 1988; Upadhyay et al., 1989; Lepoivre, 2000). Ha sido reportada como la toxina más fitotóxica en extractos de cuatro filtrados de cultivos de *M. fijiensis*, donde han observado su actividad dependiente de la luz (Busogoro *et al.*, 2004a, b), sin embargo, estos resultados no concuerdan con los reportados por Cruz-Cruz et al., 2011 en donde ellos demuestran que las fitotoxinas de la fracción hidrofílica tienen niveles similares de actividad tanto en luz como en oscuridad; la fitotoxicidad de las fracciones y el metabolito puro no es dependiente de luz y por lo tanto no incluye al aparato fotosintético como su sitio directo de acción. Por otro lado se ha encontrado que la juglona a un nivel sub-celular induce muchos efectos bioquímicos como la alteración del gradiente electroquímico del proton a través de la membrana plasmática así como el incremento de salida de electrones (Lepoivre et al., 2002). Los efectos mencionados llevan a la disminución del ATP celular y probablemente a la inhibición de enzimas involucradas en la respiración (Lepoivre et al., 2002). Otros experimentos realizados por Busogoro et al., 2004 a,b han identificado a los cloroplastos como el sitio de acción de la juglona, y por lo tanto han sido considerados como un posible blanco para las tóxicas de *M. fijiensis* (Busogoro *et al.*, 2004a,b). De igual forma la juglona ha sido considerada y demostrada como un generador de oxígeno en singulete, uno de los radicales

libres más agresivos que existen, por lo que se piensa que su toxicidad se da a través de estrés oxidativo.

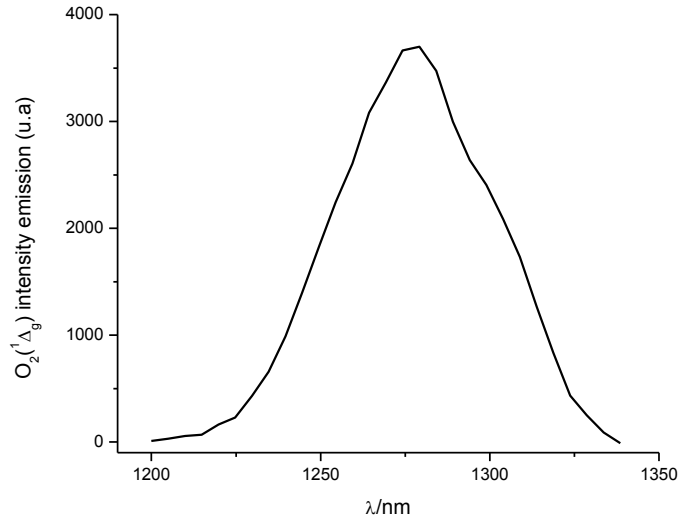


Figura 4. Producción de 1O_2 por juglona

B) Secretoma

Otro factor de virulencia reportado por Chu-Uc et al., 2001 es el llamado secretoma el cual está compuesto por proteínas secretadas, tales como enzimas: proteasas principalmente. Chu-Uc et al., en 2001 caracterizaron el secretoma in vitro de *M. fijiensis* al aplicarlo sobre la superficie de la hoja en un cultivo silvestre de banano resistente a sigatoka negra y observaron la formación de lesiones necróticas. Al realizar varias pruebas por separado ellos concluyeron que la necrosis se debió a la combinación de las actividades hidrolíticas de las toxinas no selectivas del hospedante y de las proteínas secretadas (secretoma) así como por la acción de las fitotoxinas.

C) Melanina

Los pigmentos de melanina son polímeros multifuncionales, son obicuos en la natularezza ya que son producidos por una gran variedad de organismos (bacterias, hongos, plantas y animales). Las melaninas tienen carga negativa, son hidrofóbicas y tienen compuestos de alto peso molecular además de ser poco solubles (Taborda et al., 2008). Existen diversos reportes donde muestran que la melanina tiene un papel importante en la protección de estrés ambiental, lo cual ha contribuido a la adaptación en los hongos (Bell & Wheeler, 1986; Butler & Day, 1998; Henson et al., 1999). En los hongos incrementa su tolerancia a los rayos UV (Rehnstrom et al., 1996; Kawamura et al., 1996; Wang et al., 1994), a la lisis enzimática (Hyakumachi et al., 1987), y a temperaturas extremas (Rehnstrom et al., 1996; et al., Rosas et al., 1997). La melanina también es utilizada para la penetración mecánica del hongo al hospedante, al fortalecer las hifas (Howard et al., 1989). La melanina es comúnmente localizada en la pared celular donde generalmente está unida a polisacáridos y algunas veces es excretada al medio como un polímero extracelular y de forma soluble.

En la naturaleza existen 3 diferentes tipos de melanina, las eumelaninas y las feomelaninas que pertenecen al grupo de las DOPA, melaninas (dihidroxifenilalanina) y las alomelaninas formadas a través de la oxidación y polimerización de la DHN (dihidroxinaftaleno).

M. fijiensis tiene di-hidroxinaftaleno melanina (DHN) el mismo tipo de melanina que presentan otros hongos hemibiotróficos y necrotróficos como: *A. fumigatus*, *Bipolaris oryzae*, *Colletotrichum lagenarium*, *Magnaporthe grisea*, and *Alternaria alternata*. Su biosíntesis involucra 6 genes principalmente, dichos genes son

expresados en un cluster, y se han observado primordialmente la producción de melanina de las conidias (Pihet et al., 2009). Esta vía metabólica es compleja e inicia su síntesis con acetil-CoA y malonil-CoA los cuales son convertidos por la actividad de policetido sintetasa (*PKSP*) a 1,3,6,8 tetrahidroxinaftaleno (THN). Posteriormente y en pasos sucesivos de reducción y deshidratación (scitalona dehidratasa y vermelona dehidratasa) la 1,3,6,8-THN es convertida a 1,8-DHN, la cual es finalmente polimerizada por la lacasa a Melanina (Pihet et al., 2009). Se ha encontrado que las fitotoxinas 2,4,8-THT, juglona y 4-hidroxycitalona son metabolitos de bloqueo de la vía de síntesis de esta melanina (Langfelder et al., 2003; Wheeler et al., 2008), al alterar el gen *pks1* el cual se ha establecido que actúa en el primer paso de la síntesis de melanina en *M. fijiensis*. Al inhibir este paso se han observado hifas sin pigmento, sin embargo, se comprobó que actúan de una forma virulenta igual que las cepas pigmentadas (sin mutación) (Donzelli and Churchill, 2005; resultados no publicados), demostrando que la melanina no es requerida para la virulencia de *M. fijiensis*. Cho et al., 2012 demostraron que al alterar y deletar genes involucrados en la síntesis de melanina (como *pks*) en cepas de *A. brassicicola*, se producían conidias deficientes de melanina, teniendo cepas de color anaranjado a los tres días post- inoculación, el color fue incrementando con el tiempo y al ser expuesto a luz, dicho pigmento no mostró efectos fitotóxicos en la planta (mutantes con delección). Las cepas mutantes que fueron alteradas, si se observó lesiones comparadas con las cepas silvestres de *B. oleracea*, demostrando que la melanina no es un factor de virulencia en este hongo, aunque concluyeron que si existe una relación entre la síntesis de melanina y la disminución de la virulencia, probablemente por el cambio del ciclo

de patogénesis a la reproducción (Cho et al., 2012). Por otro lado, estudios recientes demuestran que la DHN melanina en *M. fijiensis* es considerada como un factor de virulencia al ser generadora de $^1\text{O}_2$ en presencia de luz UV posiblemente sirviendo como una foto-toxina dependiente de la luz al comprometer la integridad celular provocando la muerte en hojas infectadas por sigatoka negra (Beltrán-García et al., 2014).

L) Especies de oxígeno reactivas en interacciones planta-patógeno

Las EORs han sido involucradas en diferentes procesos relacionados a las interacciones con sus hospedantes: al inicio de la interacción en el proceso de defensa, así como en las fases tardías durante la colonización (Shetty et al., 2008), también en diferentes vías de señalización de mecanismos de defensa como la respuesta hipersensible, acumulación de fitoalexinas entre otras (Frenkel et al., 2009; Chang et al., 2009; Karpinski et al., 2013). Se ha sugerido que las EORs son sensadas por las plantas a través de tres mecanismos (Mittler et al., 2004): proteínas no identificadas, factores de transcripción sensibles a cambios redox o de choque térmico (NPR1-HSFs), y por una inhibición directa de la fosfatasa (Apel and Hirt 2004; Mittler et al., 2004; Neill et al., 2002). El exceso de EORs en las plantas es dañino para las biomoléculas como: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, sin embargo, su acumulación en la célula es contrarrestada por la activación de vías enzimáticas y no enzimáticas (Barna et al., 2012). De igual manera las EORs están involucradas en la regulación del desarrollo y crecimiento vegetal, pero también son parte esencial de la defensa en contra del ingreso del

patógeno a la planta (Apel et al., 2004; Mittler et al., 2011). Una gran variedad de enzimas antioxidantes han sido reportadas en las plantas después de un reconocimiento del patógeno tales como: NADPH oxidasa (Bedard et al. 2007; Carter et al. 2007; Grant et al. 2000), SOD (Auh and Murphy 1995; Deepak et al. 2006), oxalato oxidasas (Hu et al. 2003; Zimmermann et al. 2006), peroxidasas y catalasas (Bindschedler et al. 2006; Bolwell et al. 2002), lipoxigenasas (Babitha et al. 2004) y amino oxidasas (Allan and Fluhr 1997; Cona et al. 2006; Walters 2003). La toxicidad de las EORs en una interacción planta-patógeno va a depender de la sensibilidad del patógeno a dichas concentraciones (Levine et al. 1994). Estas moléculas también han sido propuestas como segundos mensajeros en las respuestas a hormonas vegetales y a su vez éstas hormonas pueden provocar la inducción de EORs y de los antioxidantes (Kwak et al., 2006; Robert-Seilaniantz et al., 2011). Por ejemplo: concentraciones micromolares de H_2O_2 inhiben la germinación de esporas de un gran número de hongos fiopatógenos in vitro (Peng and Kuc 1992). Shetty et al. 2007, demostró que 5 mM de H_2O_2 inhibió el desarrollo de cultivos de 4 días de *S. tritici*, donde una concentración de 50 mM fue requerida para cultivos de 16 días. Beltrán-García et al., 2009 demostró que *M. fijiensis* fue capaz de sobrevivir a una concentración de 100 mM. reflejando la habilidad del patógeno a tolerar el H_2O_2 . Shetty et al. 2007 también demostró en la interacción trigo-*S. tritici*, al infiltrar 4 mM H_2O_2 a un cultivo susceptible lo hizo más resistente, ya que los síntomas parecieron 6 días después que en el control, mientras que al infiltrar catalase, los síntomas fueron visibles 4 días antes. Este efecto no se sabe si fue directo por la toxicidad de las EORs o indirectamente al afectar la transducción de señales o la expression de los genes involucrados en la

defensa (Shetty et al., 2008). En una interacción mutualista, endofítica y biotrófica, el ignorar o suprimir las EORs en la respuesta de la planta es necesaria para establecer dicha interacción, sin embargo los hongos necrotróficos parecen tener una estimulación e incluso necesidad de este estallido oxidativo de la planta (Heller and Tudzynski, 2011). El H₂O₂ se ha reportado como un factor efectivo en la supresión de crecimiento de patógenos biotróficos o hemibiotróficos en su primer fase tales como *B. graminis* (Mellersh et al. 2002; Thordal-Christensen et al. 1997; Trujillo et al. 2006) *M. fijiensis*. Por otra parte, las EORs como H₂O₂ se les ha atribuido como compuestos benéficos para los patógenos necrotróficos (Govrin and Levine 2000; Von Gönner and Schlösser 1992). Por ejemplo: Govrin & Levine (2000) concluyeron que *Botrytis cinerea* al infectar *Arabidopsis thaliana* induce acumulación de H₂O₂ para matar las células del hospedante y facilitar su invasión. Otros ejemplos de patógenos necrotróficos y hemibiotróficos de los cuales las EORs son importantes en la patogenicidad son: *Drechslera* spp., *Rhynchosporium secalis* and *Bipolaris sorokiniana* (Gönner & Schlösser, 1993; Kumar et al., 2001; Able, 2003), *S. tritici* (Shetty et al., 2003). Cavalcante et al., 2012 desarrolló un estudio comparativo histológico evaluando una cinética del proceso de infección utilizando tres genotipos de bananos con fenotipos que difieren en la Resistencia sigatoka negra: Gran enano (susceptible), *Pisang Madu* (Parcialmente resistente) y Calcutta 4 (Resistente) con la finalidad de caracterizar el proceso de interacción entre *M. fijiensis* y *Musa acuminata*. La germinación de las conidias ocurrió 24 horas después de la inoculación, concluyendo que la enzima peroxidase y el H₂O₂ están asociados con la reacción de tipo hipersensible en el genotipo resistente sugiriendo un posible papel de la enzima o su product en el mecanismo de

defensa en contra de *M. fijiensis* (Cavalcante et al., 2012). Otro posible factor involucrado en la producción de especies de oxígeno reactivas en la interacción planta patógenos son las fitotoxinas no específicas del hospedante, tales como: cercosporina toxina producida por *Cercospora* spp. (Daub et al., 2000) que al igual que la juglona se ha reportado como dependiente de la luz y generadora de oxígeno en singulete (Daub, 1986; Remotti et al., 1997; Heisser et al., 1998; Daub and Eherenshaft, 2000). La otra toxina es la mencionada juglona en donde El Hadrami et al., 2009 observó un incremento en la producción de EORs en un tratamiento de 8-24 h de 100 y 500 ppm de juglona en hojas de banano, se observó un incremento en H₂O₂.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio 310 de Bioquímica y Biología Molecular y 314 del edificio del Instituto de Ciencias Exactas y Terrestres (ICET) en la Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG), la Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica (UBMF) del Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica del Estado de Jalisco (CIATEJ), laboratorio de microscopía del Instituto de Ingeniería en la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) campus Mexicali y en el laboratorio de Química del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo (USP).

i. MATERIALES

A) Reactivos

- Acetato de sodio (Sigma)
- Aceite de inmersión (Zeiss)
- Ácido acético (Fermont)
- Ácido bórico (Sigma)
- Ácido cítrico (Sigma)
- Ácido clorhídrico (Fermont)
- Agar bacteriológico (Bioxon)
- Agar para métodos estándar (Bioxon)
- Agar Papa Dextrosa (Merk)
- Agar Trypticaseína de Soya (Bioxon)
- Agarosa (Promega)
- Agua bidestilada (Osmopura)
- Buffer de carga 6X (Thermo)
- Buffer 10X PCR (Thermo)
- Buffer DNAsa 10X (Promega)
- Buffer RT (Thermo)
- Caldo Papa Dextrosa (Difco)
- Caldo Trypticaseína de Soya (Bioxon)
- Cloruro de magnesio grado reactivo (Fermont), (Thermo)
- Cloruro de potasio (Merk)
- Cloruro de sodio (Merk)
- Dietil pirocarbamato (Sigma)
- Dimetilformamida (Sigma)
- DMSO (sigma)
- DNAsa (Promega)
- dNTPs (Thermo)
- EDTA (Sigma)
- Etanol grado reactivo (Sigma)
- Fosfato de potasio monobásico (JT Baker)
- Fosfato de potasio dibásico (JT Baker)
- Gel Red (Biotin)
- Glicerol (Sigma)
- Hidróxido de sodio (Merk)
- Isopropanol grado reactivo (Sigma)
- Juglona (Sigma)

- Marcador de peso molecular 1 kb
(Thermo) 100bp (Sigma)
- Mix PCR Tiempo Real SYBR Green
(Thermo)
- Nitrato de plata (J.T. Baker)
- Nitrogeno líquido (Praxair)
- Oligonucleótidos (Uniparts)
- Oligo (dT) 12-18 (Promega)
- Peróxido de hidrógeno (Riedel-de
Häen)
- Pyroquilon (Sigma)
- RNAsin (Promega)
- Sacarosa (Jalmek)
- Solución de Stop DNAsa (Promega)
- Sulfato de magnesio (Merk)
- Taq Polimerasa (Fermentas),
(Promega)
- Transcriptasa reversa (Thermo)
- Trizma base (Sigma)
- Triciclazol (Sigma)
- Trireagent (Sigma)

B) Equipo

- Agitador en orbital (Envirion), (New Brunswick Scientific Co.)
- Autoclave (Felisa)
- Balanza analítica (Adventurer, DHAUS)
- Cámara de electroforesis Easy-Cast (Owl scientific)
- Cámara bioclimática (Thermo)
- Campana de flujo laminar (Veco) (Labconco)
- Centrifuga (Naire)
- Congelador -20 °C (Kelvinator), -70°C (Defco)
- Espectrofotómetro UV/Vis Lambda2 (Perkin-Elmer), (Nanodrop ND-1000)
- Fotodocumentador (Apollo Instrumentation)
- Fuente de poder (E-C, Apparatus Corporation)
- Incubadora (Felisa)
- Microcentrifuga (Centrifuge 5415 C, Eppendorf)
- Microscopio de contraste de fases (Zeiss)
- Micropipetas (Beta Pette, Poseidon)
- Potenciómetro
- SpeedVac Vacufuge (Eppendorf)
- Termociclador (Nyx Technik), gradients y Pikoreal 96 pozos (Thermo)
- Vortex (Select vortexer, Bioproducts)

ii. MÉTODOS

1. Cultivo de *Mycosphaerella fijiensis*

Cepas de *M. fijiensis* se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA) durante 7 días, posteriormente se inoculó aproximadamente un 1 cm³ del micelio en un medio líquido de papa dextrosa (PDB). Los matraces se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm a una temperatura de 25 a 30°C el cual se incubó 8 días. Al finalizar el período de incubación los pellets celulares formados se colectaron y se lavaron con agua bidestilada estéril para su posterior utilización.

Tabla 1 Aspectos fenotípicos y fisiológicos de cepas de *Mycosphaerella fijiensis* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Año y sitio de colecta	Color del micelio en medio PDA	Grado de resistencia a fungidas
<i>Mf-1</i>	1999, Colima, México	Verde oscuro en la parte superior y muy oscuro en la parte inferior	Alta sensibilidad a Carbendazim, Propiconazol, Azoxistrobina, Mancozeb Clorotalonil.
102	2007, Michoacan, México	Blanco-rosado en la superficie y blanco con pequeñas manchas negras en la parte inferior.	Mayor resistencia a fungidas.
<i>NCHR2K</i>	2001, Yucatán, México	Blanco-rosado en la superficie y blanco con pequeñas manchas cafés y negras en la parte inferior.	Sensibilidad a fungidas

2. Cinética de producción de melanina y determinación del porcentaje de crecimiento en *M. fijiensis* mediante técnicas espectrofotométricas.

Se pesaron 150 mg de micelio de 8 días cultivado en medio sólido (PDA), se eliminó la mayor cantidad de agar con un bisturí para que no interfiriera con el peso, estos 150 mg fueron transferidos a 20 ml de medio PDB fresco para realizar una cinética de cuantificación de melanina de 24 días, las mediciones se realizaron cada dos días (por triplicado) en condiciones de luz-oscuridad (14 horas luz: 10 horas oscuridad), teniendo un control de oscuridad constante. Al finalizar cada tiempo, la biomasa se separa del medio líquido por filtración en membrana millipore de 0.22 micras, la cantidad de melanina secretada se ajustaba a su volumen inicial con PDB fresco, posteriormente la melanina secretada se midió en el espectrofotómetro UV-VIS realizando un barrido de 200 a 800 nm, en cuatro diferentes longitudes de onda (240, 280, 320 y 400 nm). Se utilizó como blanco el medio de cultivo sin inocular (PDB). Se realizaron curvas de calibración con melanina estándar para cada longitud de onda, y a partir de la absorbancia obtenida se obtuvieron las concentraciones de melanina secretada en el medio. Los datos reportados en este trabajo fueron únicamente de la longitud de onda de 400 nm. La acumulación de biomasa en función del tiempo se colectó el micelio y este a su vez fue filtrado al vacío dejándose secar de 10-15 días a 60°C hasta obtener peso seco constante.

3. Tinción de melanina en micelio

Las cepas Mf1 y 102 fueron cultivadas en medio PDB adicionado con tween 80 (1.5% y 1% respectivamente) para evitar la agregación del micelio en un pellet. Al transcurrir 8 días se tomó 1 ml de medio y se realizó la tinción de plata-sulfato de cobre (Butler et al., 2005). El micelio fue colocado en una solución de 10 mM de Sulfato de cobre durante 2 horas a temperatura ambiente. Al finalizar el periodo de incubación el micelio fue lavado en 10 ml de agua destilada por 1 minuto. Posterior al lavado, las muestras fueron trasladadas a una solución de Sulfito de sodio 1%, se dejaron incubando por 1 hora a una temperatura de 45 a 60°C este proceso se mantuvo en oscuridad. Más tarde se realizó otro lavado por un minuto con agua destilada, posteriormente las muestras se dejaron secar 10 minutos para poder ser transferidas a 30 ml de una solución con lactato de plata e hidroquinona disuelta en un buffer de citrato a 0.1 M y pH 3 las cuales se incubaron de 30 minutos a una hora a 26°C. La visualización de las muestras fue realizada en un microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss Axiolab) y las fotos fueron tomadas con la ayuda de una cámara Canon adaptada al microscopio.

4. Obtención y exposición de los productos de inhibición de la formación de 1, 8 DNH de *M. fijiensis*.

Se tomaron 100 mg de micelio (cepas: 102 y Mf1) que fueron inoculados en medio PDB adicionado respectivamente con 50 ppm de Pyroquilon (Inhibidor de la síntesis de melanina) disuelto en etanol al 100% grado reactivo. Al transcurrir 7 días el medio fue filtrado a través de un sistema de filtración millipore y posteriormente por medio de jeringas, mediante filtros Millipore 0.22 micras esteriles. Al obtener los productos de inhibición estériles se prepararon distintas concentraciones (0, 25, 75, 100%) de dichos productos en medio PDB y fueron colocadas en placas de 12 pozos, se inocularon 100 mg de micelio (cada concentración se realizó por triplicado), el experimento se llevó a cabo en condiciones de luz constante y oscuridad constante en un agitador en orbital, dentro de una cámara bioclimática con control de luz, la condición de oscuridad se obtuvo al tapar en su totalidad las placas con aluminio. Al transcurrir 7 días de incubación se colectó el micelio, se lavó y se filtró al vacío para eliminar la mayor cantidad de humedad posible, posteriormente el micelio se sometió a una temperatura de 60°C para secarlo por 10 hasta 15 días según fuera necesario para obtener peso seco. El experimento se repitió en placas de 24 pozos utilizando PDA, agregando únicamente 1 pellet, bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Los pigmentos obtenidos a partir de la exposición a Pyroquilon son toxinas que produce *M. fijiensis* y tienen gran toxicidad para su hospedero, teniendo efecto necrótico en la hoja, por esto que se decidió probarlas en contra del mismo fitopatógeno para evaluar el efecto que tiene sobre él, esperando que el desarrollo de *M. fijiensis* se viera comprometida. Los datos

obtenidos fueron en función al control sin inducción para obtener un porcentaje de inhibición.

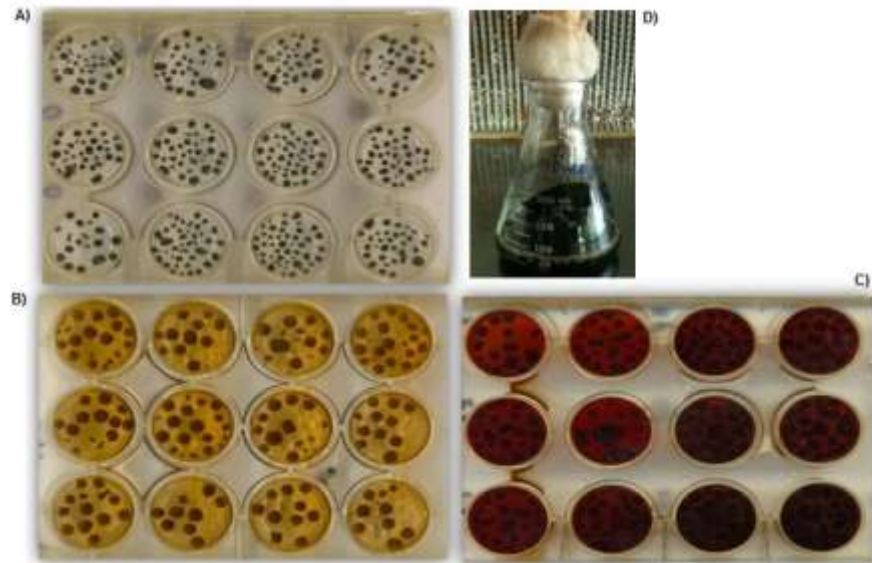


Figura 5. Formación de los productos de inhibición de la síntesis de melanina A) primer día de inculo, B) Segundo día de inculo, C) 7 días de inculo en microplaca y D) 7 días de inculo en matraz.

5. Determinación de toxicidad del micelio de hongos y bacterias a la Juglona.

Mycosphaerella fijiensis

El hongo fue cultivado en medio líquido para la obtención de micelio en forma de pellet, al transcurrir siete días el micelio fue lavado y se pesaron 100 mg los cuales fueron trasladados a microplacas de 12 pozos (Corning) previamente adicionados con 2 ml de medio líquido papa dextrosa con diferentes concentraciones de 1, 4 naftoquinona o juglona comercial (Sigma) (0, 25, 50 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 y 500 ppm) disuelta en agua destilada estéril, para asegurar una mejor disolución de la toxina se sometió a sonicación por 30 minutos. Las cepas utilizadas en este ensayo fueron: Mf1, 102 y NCHR2K (cada concentración se realizó por triplicado), el experimento se llevó a cabo en condiciones de luz constante y oscuridad constante en un agitador orbital, esta condición lograda como se menciona en el punto 4. Después de 7 días de incubación se colectó el micelio, se lavó y se dejó secar a 60°C de 10 a 15 días hasta obtener peso seco. Se repitió el mismo procedimiento en placas de 24 pozos utilizando agar papa dextrosa, agregando únicamente 1 pellet. En base al peso final obtenido se realizó el cálculo del porcentaje de inhibición para su posterior obtención de la CE₅₀.

Fusarium spp.

Se inocularon 100 mg de micelio previamente filtrado al vacío en caldo papa dextrosa adicionado con juglona a diferentes concentraciones las cuales fueron seleccionadas del experimento descrito anteriormente (300, 350, 375, 400, 450, 475 y 500)(cada concentración se realizó por triplicado), el experimento se llevó a cabo en condiciones de luz constante y oscuridad constante en un agitador orbital como se ha descrito anteriormente. Al transcurrir 7 días de incubación se colectó el micelio, se lavó y se dejó secar a 60°C de 10 a 15 días a 60°C hasta obtener una biomasa constante. El peso seco sirvió para obtener el porcentaje de inhibición y posteriormente la CE₅₀.

Escherichia coli

La bacteria se cultivó en 50 ml de caldo CASOY por 16 horas, después de ese periodo el cultivo fue centrifugado a 4°C para obtener una pastilla celular y de esta forma ajustar a una OD de 0.5 a 600nm en medio CASOY por medio de un espectrofotómetro UV/VIS (Perkin Elmer). Posteriormente se tomaron 500 ul del cultivo ajustado y fueron centrifugados nuevamente a 4°C a velocidad máxima, el medio fue eliminado. Posteriormente se agregó 1 ml de PDB en tubos de 2 ml con las concentraciones de juglona que se eligieron en base a los experimentos previos (300 y 500 ppm), se realizó una cinética de 0, 30, 60 y 120 minutos en condiciones de luz y oscuridad constante previamente descritas en un agitador en orbital (por triplicado). Al transcurrir cada periodo de incubación se colectaron los tubos y se realizaron hasta 6 diluciones seriadas de 1/10 con soluciones de glucosa al 0.04%, al finalizar las diluciones se plaquearon con la ayuda de una

varilla de vidrio 100 ul en agar para métodos estándar. Después de 24 horas de incubación se hizo el conteo de colonias. Para obtener unidades formadoras de colonia y posteriormente en base al tiempo cero el cual fue el control se obtuvo el porcentaje de inhibición para dar una CE₅₀.

6. Toxicidad de la Juglona por inyección directa en hojas de *Musa acuminata* variedad Cavendish.

La toxina Juglona fue disuelta en metanol al 10%. Se inocularon 500 ppm en la vena central de la hoja de banano, a su vez se inoculó únicamente metanol al 10% como control del efecto del solvente y se realizó un daño mecánico como testigo de la inyección. Se dejó en presencia de luz solar durante 6 horas (El-Hadrami et al., 2009). Posteriormente se realizaron cortes histológicos longitudinales de cada punto de inyección y el daño mecánico, y se realizaron dos cortes de una zona libre de lesión y de inyección para ser utilizado como control (uno teñido y otro sin tinción). Posteriormente se realizó la tinción para la detección de H₂O₂ mediante la técnica de DAB 3,3 diaminobencidina descrita por Thordal-Christensen, 1997. Los cortes histológicos fueron colocados en una solución de DAB disuelto en un buffer de Tris-HCl 0.05 M a un pH de 3.8 por 5 horas en oscuridad. Al finalizar el periodo de incubación las muestras fueron lavadas tres veces por 10 minutos en agua destilada para evitar residuos de DAB. Los cortes fueron visualizados en un microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss). La coloración café visualizada denota la presencia de peróxido de hidrógeno.

7. PCRq- SYBR® Green

D) Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados con la ayuda del programa Primer 3 plus, se construyeron a partir de las secuencias completas de los genes de *M. fijiensis* obtenidas de <http://genome.jgi-psf.org>. Los oligonucleótidos diseñados fueron sometidos a un análisis comparativo entre diferentes secuencias de otros organismos a través de un alineamiento básico a través de una base de datos BLAST por sus siglas en inglés (Basic Local Alignment Search Tool) para evitar cualquier posible contaminación, al tener algún porcentaje de similitud en la secuencia de otros organismos. Al descartar el posible apareamiento con otras secuencias se prosiguió con la inducción y extracción de ARNm.

A) Inducción

La inducción se realizó con un cultivo de *M. fijiensis* de 7 días en medio líquido. 300 mg de micelio fueron pesados y transferidos a 20 ml de caldo papa dextrosa fresco y se mantuvieron en un periodo de aclimatación por 4 horas. Dicha incubación se realizó en luz y en oscuridad constante en un agitador en orbital. Al finalizar el periodo se agregaron 500 ppm de una solución de juglona previamente preparada. El ensayo se realizó en una cinética de 0, 30, 60, 120 y 360 minutos. Cada condición y tiempo se realizó por triplicado.

Tabla 2 Oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias obtenidas del genoma de *Mycosphaerella fijiensis*

Primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño del producto esperado (pb)
<i>Tub F</i> <i>Tub R</i>	ATT CCC ACG TCT CCA CTT CTT C CGC CGC GGC TGG TA	58
<i>Cat-1 F</i> <i>Cat-1 R</i>	CCA CAG GCG TGA AGG GTT AC TTG TGG GTG CCG TTG AAC T	58
<i>Cat-Perox F</i> <i>Cat-Perox R</i>	GGG CAG CAG CGG TTT CCT TGT CCA AGC TGA CAT TGT C	58
<i>Cat-3 F</i> <i>Cat-3 R</i>	CCG GTG CTC ATG GCT TTT TGA AAG CTT CTC GGC GAA GT	53
<i>Sod CuZn F</i> <i>Sod CuZn R</i>	TTG GCC GCA CAA TCG TT GAC CAC CCT TTC CAA GAT CGT	54
<i>Pdx F</i> <i>Pdx R</i>	GGC GTA GCC CGC ATG TC TGG TGA CGG TTC GCA TGA	60
<i>Pks1 F</i> <i>Pks1 R</i>	TGG TCA ACA ATG CTG CTC TC ACA GTC AAT GCC ATG TCA GC	60
<i>Pks2 F</i> <i>Pks2 R</i>	TCG ACG ACA AGA TGA ACC TG ATG AAC GTT GCG ATG CAG TG	60
<i>ScytD F</i> <i>ScytD R</i>	CCC AAC TCT CAA AAC CCA AC CGC TCA CTT TCT CCC ACT TC	55
<i>Flr1 F</i> <i>Flr1 R</i>	ACC GGC TTT CCG CTT TTC CCA AGC AAC CCC GAC ATT C	58
<i>MfAp-1 F</i> <i>MfAp-1 R</i>	TGG CCT CCC TGG AAC TAT GA AGA GAG TTC CGA TGT CCA TTG AG	60
<i>Trr1 F</i> <i>Trr1 R</i>	CGG CAT GCG CAG TCT GT GGG CTT TTC GCG GAA GA	55

B) Extracción y cuantificación de ARN.

En cada periodo de inducción el micelio fue colectado, lavado con agua destilada estéril y congelado con nitrógeno líquido para ser procesadas posteriormente. El micelio fue molido con un mortero y pistilo hasta obtener un polvo fino usando nitrógeno líquido. La extracción del ARN se realizó en secuencia de inducción y cada una con sus respectivos controles por el método TriReagen (Sigma). Al método se adicionó un periodo de incubación de 12 horas con etanol al 100% y acetato de sodio en una relación 1/10. Al finalizar la extracción se procedió con la cuantificación de ARN mediante un espectrofotómetro de UV-

Visible a 260-280nm y la verificación de la integridad del ARN por medio de un gel de agarosa al 2% utilizando buffer TAE (1X) en cámaras electroforéticas horizontales. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: 80 V aproximadamente y 60 minutos. Los geles fueron visualizados en un fotodocumentador a través de un transiluminador de luz UV utilizando gel red (Biotum). Esto se repitió para cada inducción con cada cepa.

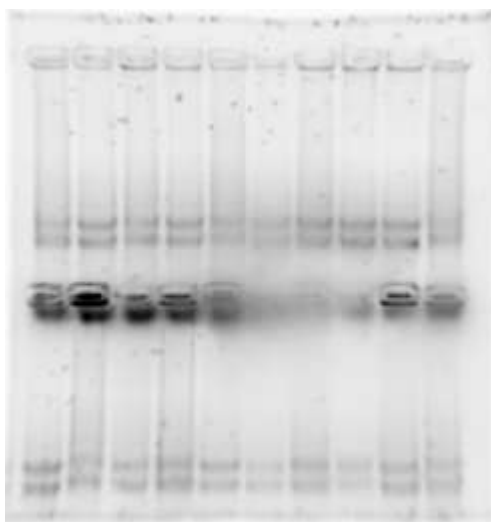


Figura 6. Gel de integridad de ARN.

C) Tratamiento con DNAsa

Con la finalidad de eliminar posible contaminación de ADN se realizó una digestión la enzima DNAsa utilizando las siguientes condiciones:

Cuadro 1. Digestión enzimática (DNAsa)

Reactivos	Cantidad (ul)	Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (Min)
ARN	1 ug	Digestión	37	60
RQ DNAsa	1 ul	Inactivación	65	10
RQ DNAsa Buffer	1 ul			
Agua (DEPC)	ul *			

Kit DNAsa de Promega * ul de agua necesaria para completar el volumen final de reacción de 10 ul.

}

D) Verificación de ARN libre de ADN

Para verificar la pureza del ARN posterior a la digestión con DNAsa se realizaron PCRs utilizando como templado el ARN y los primers del control endógeno (B-tubulina), esperando un resultado negativo en la amplificación. Al término de la reacción se corroboró la falta de amplicón por medio de un gel de agarosa al 1%, las condiciones de corrimiento fueron las descritas anteriormente.

La preparación de la PCR con ARN se realizó de la siguiente manera:

Cuadro 2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR punto final)

Reactivos	Cantidad (ul)	Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (Min)
Buffer PCR	2.5			
MgCl ₂	1.5	Pre-desnaturalización	94	5 min
dNTP's	0.5			
Primer Forward	0.5	Desnaturalización	94	30 seg
Primer Reverse	0.5	Alienamiento	56	20 seg
Taq	0.5	Extensión	72	30 seg
ARN	2	Extensión	72	5 min
Agua	17			

Kit PCR Thermo. Volumen final de reacción 25 ul Se utilizó como templado ARN para verificar que estuviera libre de ADN
Se utilizaron los oligos de *Tub*.

E) Reacción de la transcriptasa reversa.

Una vez corroborado la pureza del ARN se prosiguió con la obtención de ADN complementario, utilizando un kit de Thermo® el proceso se realizó en dos pasos como se describe abajo:

Cuadro 3. Transcriptasa Reversa (RT)

Reactivos	Cantidad (ul)	Temperatura (°C)	Tiempo (Min)
Pre-Tratamiento del ARN			
ARN tratado con DNAsa	1	65	5
Oligo dT	1	4	5
Agua (DEPC)	3		
RT			
Buffer RT	4	42	60
dNTP's	2	70	10
RT	1		
Ribonucleasa	0.5		
Agua (DEPC)	8		

Kit Transcriptasa reversa Thermo. Volumen final de reacción 20 ul. Oligo dT Primer 15 Promega

F) PCR Tiempo Real

Previo a la PCRq el ADNc fue verificado mediante PCR punto final con las condiciones descritas previamente en el cuadro 2. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se realizó en Piko real (Thermo®) utilizando placas de 96 pozos, la preparación se realizó en condiciones estériles utilizando una mezcla maestra de SYBR Green de Thermo®. Las condiciones son descritas abajo.

Cuadro 4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR-Tiempo Real)

Reactivos	Cantidad (ul)	Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (Min)
Mix PCR	2	Pre-desnaturalización	94	5 min
dNTP's	0.5	Desnaturalización	94	30 seg
Primer Forward	0.5	Alienamiento	56	20 seg
Primer Reverse	0.5	Extensión	72	30 seg
ADNc	1	Extensión	72	5 min
Agua	1	Extensión	72	

Kit PCR-Tiempo Real SYBR Green Thermo. Volumen final de reacción 5 ul. 40 ciclos. Al finalizar se llevó a cabo Melt Curve.

40 ciclos. Controles utilizados: A) Control positivo: ADN genómico *M. fijiensis*. B) Control negativo: Agua libre de RNAsas

C) Control ADN: ARN tratado con DNAsa. D) Control de inducción: ADNc sin inducción.

E) Control endógeno: B- tubulina

Al finalizar cada reacción se realizó una curva de fusión para comprobar la ausencia de dímeros, evitando así un falso positivo, como se presenta en la figura

7.

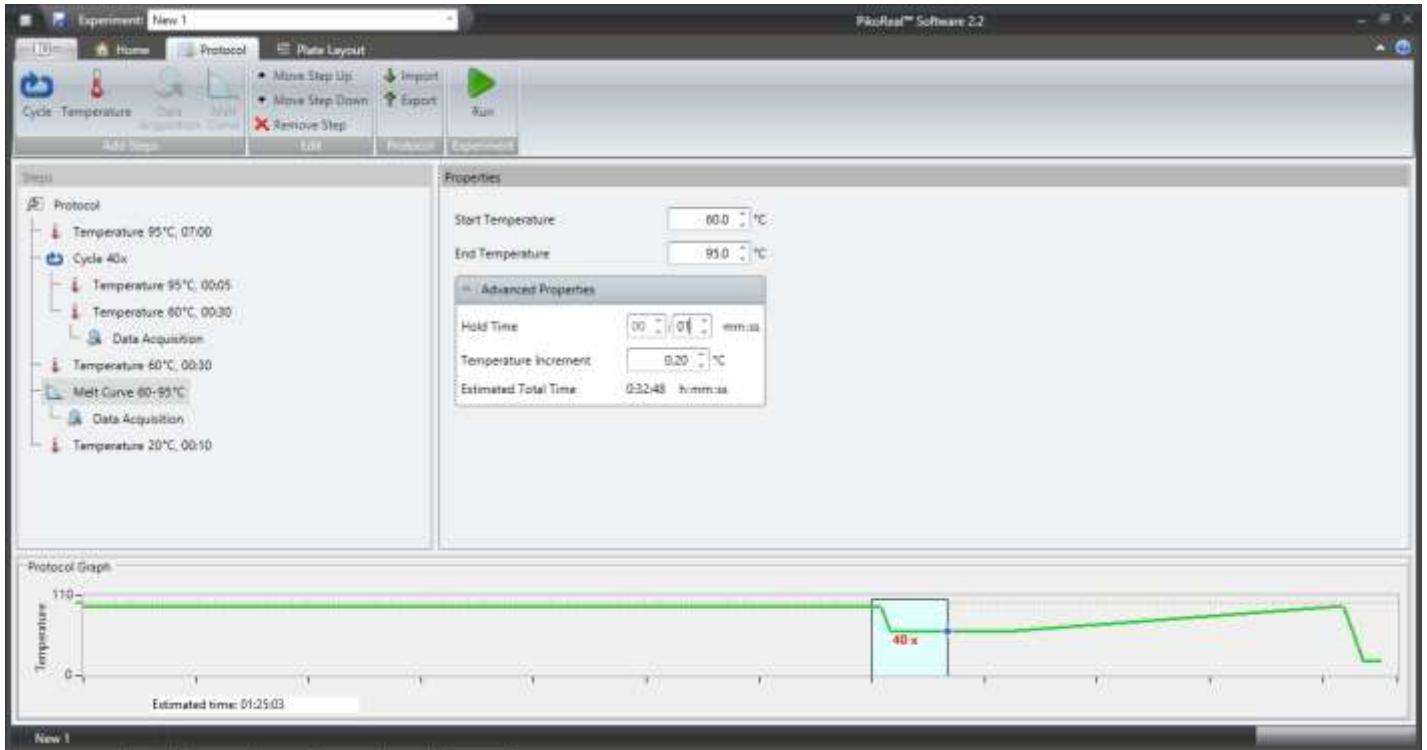


Figura 7. Curva de fusión. Se realiza posterior a finalizar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para reconocer la existencia de dímeros.

G) Análisis de la expresión del ARNm

El análisis de la expresión del ARNm se llevó a cabo por el método de $2\Delta\Delta C_T$. Utilizando la fórmula propuesta por (Pfaffl, 2001):

$$\text{ratio} = 2^{-(\Delta C_P \text{ SAMPLE} - \Delta C_P \text{ CONTROL})}$$

$$\text{ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_P}$$

Previamente a la C_T de cada gen tanto para el tratamiento como para el control sin inducción se le restó el valor de C_T .

VII. RESULTADOS

6. Tinción de DHN melanina

Mediante la tinción de sulfato de cobre-plata que sirve para detectar la presencia de melanina especialmente la DHN se logró observar la diferencia de las hifas entre una cepa pigmentada (Mf1) y una cepa albina (102) (Fig. 8). Se observa una marcada diferencia en las características morfológicas de cada cepa, en las figuras 5 y 6 se puede observar que la cepa Mf1 presenta hifas de mayor grosor que las hifas de la cepa 102, así mismo se observa una mayor pigmentación (café) en la cepa Mf1 indicativo de la presencia de melanina, por otro lado, en la cepa 102 se observa un pigmento de menor intensidad (amarillo), lo cual se corrobora con la observación macroscópica (Fig.5) donde la cepa 102 es albina y la cepa Mf1 es oscura. Es evidente que la cepa Mf1 presenta una delgada membrana café que rodea a la pared celular de la hifa sugiriendo presencia de melanina en pared celular. Además en la figura 5 se puede observar con claridad la presencia de secciones de filamentos melanizados, así mismo la cepa 102 presenta estos fragmentos (Fig.8A-C), sin embargo, la pigmentación es muy baja a comparación de la cepa Mf1.

102

Mf1

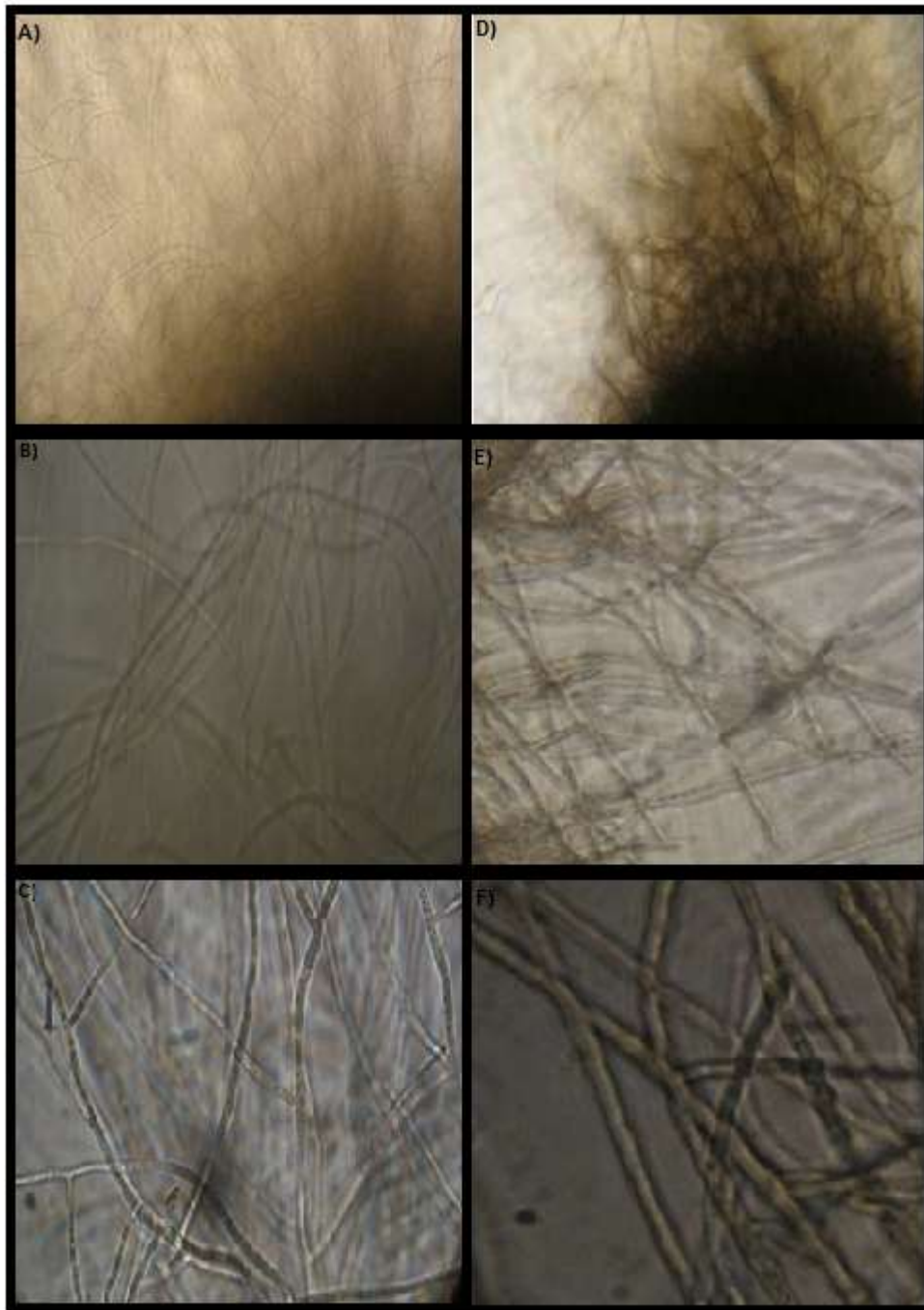


Figura 8. Visualización microscópica de hifas teñidas con Plata-Sulfato de Cobre. Cepa albina; A) 10X, B) 40X, C) 100X. Cepa pigmentada: D) 10X, E) 40 y F) 100X. Se observa la diferencia morfológica de las hifas así como la pigmentación de melanina. Micelio obtenido a partir del crecimiento en PDB adicionado con Tween 80.

7. Determinación la dinámica de secreción de melanina producida por tres cepas de *Mycosphaerella fijiensis* en un medio de cultivo líquido Papa Dextrosa.

La cuantificación de la secreción de melanina fue medida por 24 días cada dos días y se comparó con el incremento de la biomasa. Se usaron tres cepas dos albinas (NCHR2K y 102) o con menor producción de melanina en medios solidos (agar PDA), y la cepa oscura Mf-1 (Fig. 9). Estas cepas tienen comportamientos de resistencia a los fungicidas diferentes. Las cepas Mf-1 y NCHR2K son sensibles a los fungicidas y la cepa 102 altamente resistente.

La figura 9A y B muestra que la cepa Mf-1 alcanza la fase logarítmica a los 8 días (61.4 mg peso seco) y esta se mantiene hasta el día 20 (242 mg peso seco) y se observa una diferencia significativa en el incremento de la biomasa en respuesta a la luz discontinua (14 horas luz: 10 horas oscuridad). En el día 24 el hongo experimenta una disminución en la acumulación de biomasa, probablemente alcanzo la fase de declinación y este fenómeno es mayor en condiciones de oscuridad constante. Se observó una cantidad mayor de detritus celulares imposibles de retener en el filtro. Hubo un incremento de sustancias mucoides que rodeaban esos detritus celulares. Sin embargo no se puede asegurar que la luz mantiene la biomasa ya que el experimento se detuvo en este tiempo. Por otra parte la acumulación de melanina correlaciona con el incremento de la biomasa, disparándose la acumulación de melanina en el medio a partir del día 10 (8 ug/ml), hasta el día 16 (22.48 ug/ml), ya que después de este momento y hasta el día 20 no hay cambios y se mantiene una diferencia de 5 μ g/ml. La

cantidad del pigmento en el medio decae a $12 \mu\text{g/ml}$ en el día 22. En el día 24 ($2.3 \mu\text{g/ml}$) la cantidad de melanina es menor en el cultivo mantenido en oscuridad. Este dato concuerda con la entrada a la fase de declinación de la biomasa. A lo largo del experimento y salvo el día 24, los cultivos mantenidos en la oscuridad tienen una mayor cantidad de melanina.

La cepa NCHR2K mantiene el mismo comportamiento de desarrollo que la cepa Mf-1 alcanzando la fase estacionaria a los 8 ($18.7 \text{ mg peso seco}$) días. Sin embargo la cantidad de biomasa acumulada es cerca del 50% menor comparada con la Mf-1. Esta cepa llega al final de la fase estacionaria en el día 20 ($71.4 \text{ mg peso seco}$), dos días antes que la cepa Mf-1. En los días 22 y 24 aumenta la formación de detritus y la secreción de la sustancia mucoide. La cantidad de melanina secretada en el medio oscila con respecto a los días de desarrollo y el mayor valor ocurre en el día 14, sin mostrar diferencia entre el efecto de la iluminación y la oscuridad ($14.25 \text{ vs } 13.21 \mu\text{g/ml}$), mostrado en la figura 9C y D. En la cepa 102, podemos observar el mismo comportamiento en el desarrollo de la biomasa. La acumulación de la biomasa es ligeramente mayor (10%) a la cepa Mf-1. ($51.1 \text{ mg peso seco}$) al día 8. También se observa que la cantidad de biomasa en esta cepa se ve claramente influida por los ciclos de luz-oscuridad ya que es mayor que en la oscuridad hasta cinco veces en algunos puntos de la cinética (día 12). De la misma manera que ocurre en la cepa NCHR2K, la cantidad de melanina en el medio de cultivo oscila durante el desarrollo del hongo, sin embargo esta ligeramente mayor comparada con la cepa Mf-1 en algunos puntos (por ejemplo 242 mg peso seco en el día 16 contra 215 mg peso seco).

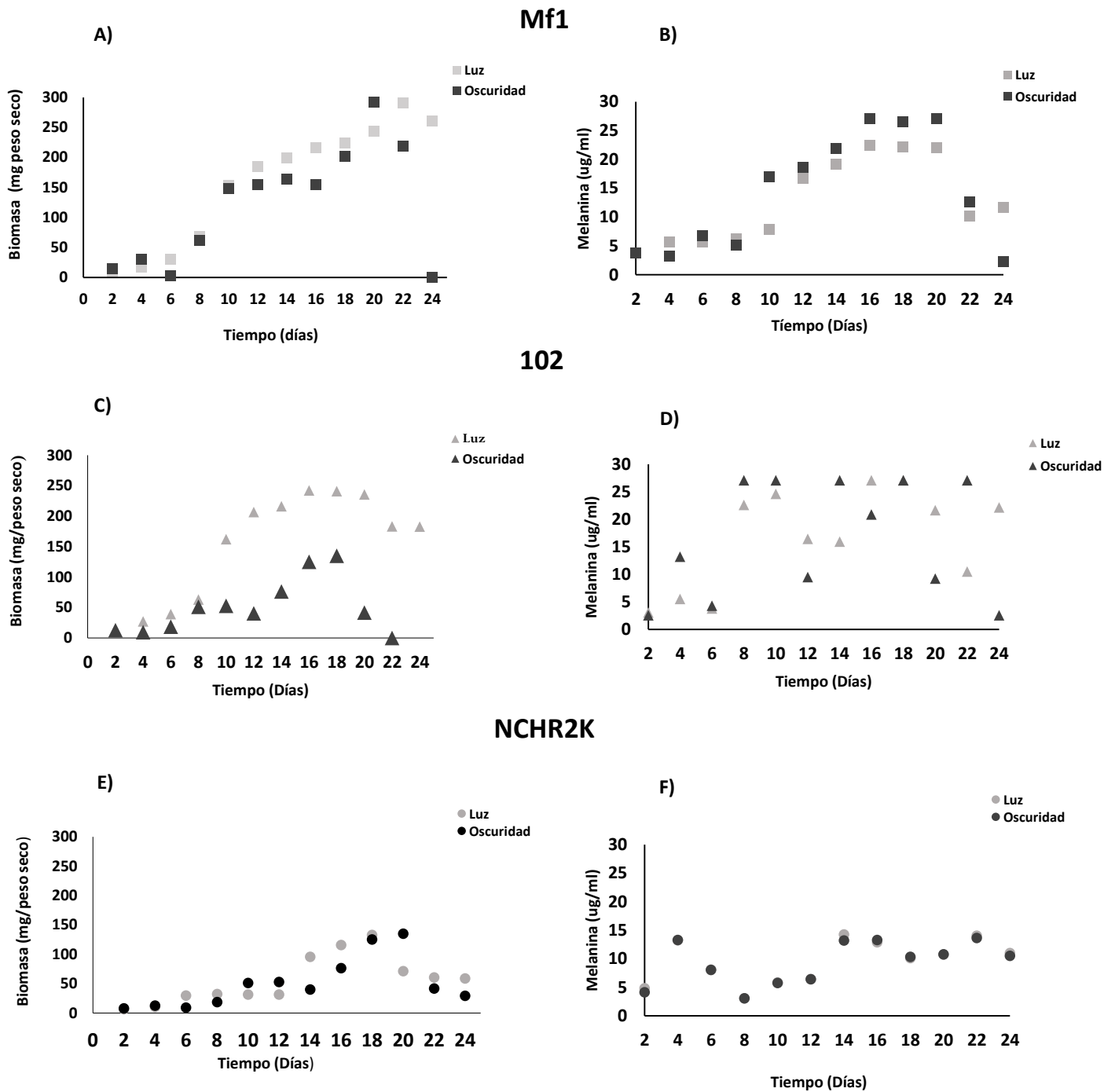


Figura 9. Dinámica de secreción de melanina en medio líquido Papa Dextrosa. Cepa pigmentada (Mf1) A) Biomasa de micelio en peso seco y B) Concentración de melanina (ug/ml). Cepa albina (102) C) Biomasa de micelio en peso seco y D) Concentración de melanina (ug/ml). Cepa albina (NCHR2K) E) Biomasa de micelio en peso seco y F) Concentración de melanina (ug/ml). Se utilizaron condiciones de luz-oscuridad (14 horas luz: 10 horas oscuridad). La cinética se realizó por 24 días.

8. Evaluación del efecto sobre el desarrollo del micelio de 2 cepas de *M. fijiensis* ejercido por los productos solubles formados durante la inhibición de la síntesis de la 1,8 DHN.

El pyroquilon inhibe la síntesis del precursor de la DHN melanina al bloquear la síntesis de la 3-hidroxi naftaleno reductasa, la cual cataliza la reducción de 1,3,8-trihidroxinaftaleno a vermelona. Estos productos solubles son liberados a las células vegetales, siendo parte del arsenal de factores de virulencia de *M. fijiensis*, por lo que en este ensayo se evaluó la capacidad de resistencia del hongo a sus mismos productos secretados.

La obtención de los productos solubles formados en el proceso de inhibición de la síntesis de melanina a partir de 50 ppm se observaron desde el segundo día de inoculación al encontrar un cambio de coloración del medio a amarillo (Fig.6) sugiriendo que la inhibición de la síntesis de melanina ocurre antes de las primeras 48 horas del cultivo, sin embargo al paso de 7 días observamos la pigmentación roja-café en el medio. Al evaluar la tolerancia a estos productos, encontramos que la cepa pigmentada (Mf1) en medio líquido fue capaz de crecer en todas las concentraciones probadas (0, 25, 50, 75 y 100%), no se observó una inhibición total, sin embargo, es llamativo que en condiciones de oscuridad las inhibiciones fueron mayores desde la concentración de 25% con 94% de inhibición, siguiendo con la de 50% (95% inhibición) y en 75% alcanzando una inhibición del 96% siendo el dato más alto en términos de inhibición. Curiosamente en la concentración de 100% observamos una inhibición menor (58%) sugiriendo el restablecimiento del desarrollo fúngico (Fig. 10). Los valores obtenidos en

condiciones de luz constante fueron distintos, encontramos que el porcentaje de inhibición más alto se dio en la concentración de 100% con un 75% de inhibición (Fig. 10), seguido de la concentración de 75% con 60% de inhibición así mismo encontramos que la concentración de 25% (58% inhibición) tiene una inhibición mayor que en la de 50% teniendo 41% de inhibición. Lo anterior sugiere que la activación de estos productos solubles no es totalmente dependiente de la luz. Los productos solubles no representan un gran reto para *M. fijiensis* ya que a pesar de que las inhibiciones obtenidas son altas el desarrollo del micelio siempre se dio. Una de las características observadas en este ensayo fue la acumulación del pigmento en función del tiempo, al día 7 el pigmento se observó muy oscuro de rojo a tendencia café como se observa en la figura 10A.

Por otro lado el ensayo se realizó a su vez con una cepa albina (102), esta cepa produce melanina en medio líquido pero en menor cantidad que la cepa Mf1. Este ensayo se decidió realizar para correlacionar la producción de metabolitos al inhibir la síntesis de la melanina entre una cepa pigmentada y una cepa albina. La cepa 102 mostró un porcentaje de inhibición mayor en la concentración de 75% con 69% de inhibición en la condición de luz (Fig. 10B) a diferencia del tratamiento en oscuridad constante donde se obtuvo 75% de inhibición en la concentración de 50% (Fig. 10AB). Lo anterior sugiere que la activación de las toxinas no son del todo dependientes de luz. Es importante resaltar que la coloración del pigmento rojo en las placas con PDB aumentó de intensidad para ambas cepas pero con mayor intensidad para la cepa Mf1 (Fig. 10B-C), sugiriendo que la cantidad de productos de inhibición fue aumentando con respecto al tiempo, haciendo casi

imposible observar a la vista la diferencia de crecimiento, sin embargo el resultado que se arroja es a partir de peso seco (Fig. 10).

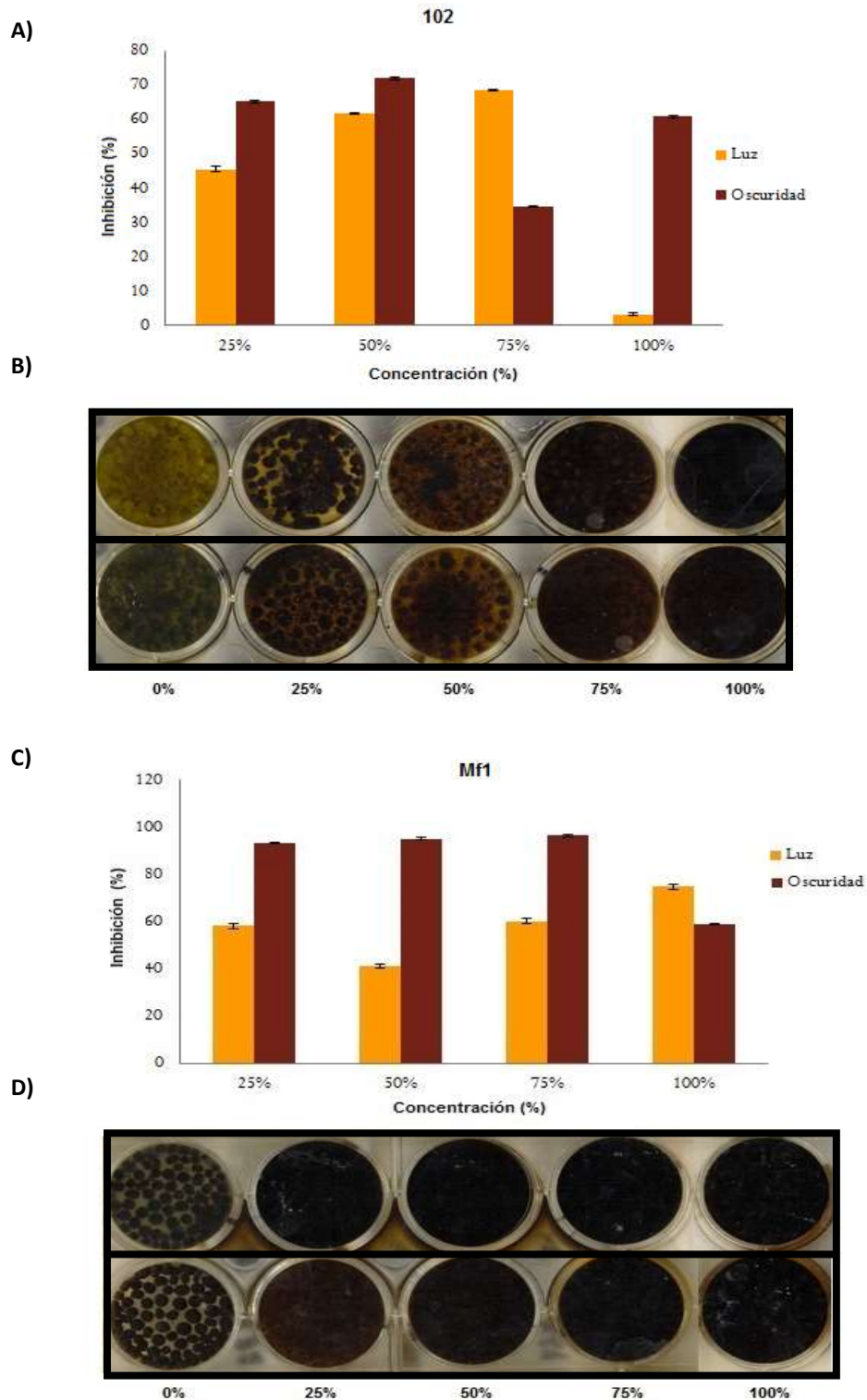


Figura 10. Evaluación del efecto de productos solubles formados durante la inhibición de la síntesis de la 1,8 DHN sobre el desarrollo del micelio de *M. fijiensis*. Cepa albina (102) A) Porcentaje de inhibición del desarrollo, B) Productos de inhibición en contacto con el micelio. Cepa pigmentada (Mf1) C) Porcentaje de inhibición del desarrollo, D) Productos de inhibición en contacto con el micelio. Productos de la inhibición de la síntesis de la DHN melanina obtenidos a partir de 50 ppm de Pyroquilon en medio PDB. Datos colectados después de 7 días y 15 días para obtención de peso seco

9. Evaluación del desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium spp.* y *Escherichia coli* en presencia de varias concentraciones de juglona, una fitotoxina no específica del hospedante activada por la luz.

M. fijiensis

La determinación de la Concentración mínima inhibitoria del desarrollo (CMID) sirve para estimar la concentración en la cual en el crecimiento se inhibe al estar en contacto con un agente tóxico. En primera instancia el ensayo se realizó en medio sólido (PDA), utilizando concentraciones de 0 a 500 ppm (probando de 25 en 25 ug/ml) (Fig. 11). Los resultados obtenidos en este ensayo no arrojaron un dato numérico, pero sí un dato observacional, ya que el desarrollo del micelio nunca se vio afectado por las concentraciones utilizadas, no existe una concentración que inhiba el desarrollo del micelio en su totalidad por lo menos en medio sólido y para las condiciones y concentraciones utilizadas en este experimento. Sin embargo podemos describir los resultados obtenidos con un inicio de inhibición observado para la cepa pigmentada (Mf1) en condición de luz constante tiene una disminución del desarrollo en 375 ppm (Fig. 11), sin embargo el desarrollo del micelio continua, ya que en ninguna concentración se observa inhibición total como se menciona anteriormente (Fig. 11A). En la condición de oscuridad constante probada, observamos que la disminución del desarrollo inicia en 325 ppm y más notorio en 475 ppm (Fig. 11A). Existe una pequeña diferencia más no tan clara, en la condición de luz donde se observa el desarrollo del pellet en menor cantidad, sugiriendo una fotoactivación de la juglona en medio sólido.

La cepa 102 tampoco demuestra una CMID en ninguna de las condiciones, sin embargo la baja en el crecimiento del micelio se observa a partir de 400 ppm, siendo un poco más claro en 500 ppm en luz constante, así como en la condición de oscuridad constante la inhibición no es significativa ya que aquí se observa a partir de 475 ppm y más evidente en 500 ppm (Fig. 11A). Posiblemente a mayores concentraciones exista una CMID, sin embargo, no es necesario saberla, ya que estas concentraciones mencionadas son imposibles utilizarlas en campo.

Siguiendo los resultados de la posible CMID encontramos que la cepa NCHR2K mostró disminución del desarrollo en 175 ppm, sin embargo en las siguientes concentraciones el micelio mantiene el desarrollo y no se observa una inhibición clara. Por lo que no se puede establecer una concentración mínima inhibitoria del desarrollo tampoco para esta cepa. No se observan diferencias significativas en cuanto a la condición de luz y oscuridad (Fig. 11A). Si comparamos el crecimiento del micelio en las tres cepas expuesta a la toxina juglona es muy evidente que el de la cepa Mf1 es menor, seguida de la 102 y por último la cepa NCHR2K. El único caso donde se observó una diferencia mínima entre luz y oscuridad para este ensayo fue la cepa Mf1, así mismo podemos decir que no existe una diferencia significativa entre las condiciones de luz y oscuridad constante en medio sólido.

Al no encontrar una CMID se decidió evaluar la toxicidad de la juglona en medio líquido Papa Dextrosa también. Las condiciones utilizadas fueron las mismas (Luz y oscuridad constante y mismas concentraciones). Al transcurrir 7 días del hongo expuesto a la tóxina se colectó el micelio para obtener los datos de peso seco y posteriormente obtener el porcentaje de inhibición que ayudó a

determinar la CE_{50} y CE_{90} . En la figura 11B tenemos la CE_{50} de las tres cepas probadas. En este caso a diferencia del ensayo en medio sólido se obtuvieron porcentajes de inhibición, teniendo como primer resultado el de la cepa pigmentada (Mf1) que durante el periodo de exposición a la toxina se fue observando el incremento de pigmentación amarillenta, sin embargo, cabe mencionar que la juglona disuelta naturalmente tiene una coloración amarilla. La CE_{50} determinada para esta cepa fue de 175 ppm y CE_{90} de 425 ppm (Fig. 11B), otro dato importante observado además de la coloración del medio fue el incremento de coloración del micelio, es decir los pellets se tornaron más oscuros.

Para el caso de las cepas albinas obtuvimos la CE_{50} de 250 ppm y CE_{90} de 300 ppm para la cepa 102 y la cepa NCHR2K 150 ppm para la CE_{50} y 475 ppm en cuanto a CE_{90} (Fig. 11B). La coloración del medio para las dos cepas albinas fue incrementando pero no tan notorio como para la cepa pigmentada. En ninguna cepa encontramos una inhibición total o por lo menos un porcentaje de inhibición mayor al 90% como se había observado en el ensayo con los productos solubles de la inhibición de la DHN melanina. Para ninguna cepa existe diferencia significativa en las condiciones de luz y/o oscuridad, patrón repetido del ensayo en medio sólido.

Esto aborda el tema de la alta tolerancia a agentes tóxicos por parte de *M. fijiensis*, ya que en un principio se pensó en probar esta toxina al ser altamente tóxica para la planta, por lo que surgió la idea, de la posibilidad de que fuera tóxica también para el mismo hongo. No obstante, con los datos obtenidos solo de *M. fijiensis* existía la posibilidad de que la juglona no fuera tan tóxica en general, al

ser una toxina no específica del hospedante, así, se decidió probarla en otros microorganismos tales como: *Fusarium spp.* y *E. coli*.

Fusarium spp.

Fusarium es un género fúngico también patógeno de banano, es por esto que se decidió utilizarlo como control para determinar si la juglona como agente tóxico desarrolla resistencia únicamente en *M. fijiensis* o es un patrón y es posible que su toxicidad sea baja. Las concentraciones manejadas en este ensayo fueron determinadas a partir de los ensayos previos con las cepas de *M. fijiensis*, al no existir inhibición evidente se decidió realizar el experimento con las concentraciones más altas, es decir, a partir de 300 ppm hasta 500 ppm (300, 350, 375, 400, 450, 475 y 500 ppm). La cepa de *Fusarium spp.* utilizada fue la E2-3. El experimento se desarrolló en medio líquido con condiciones de luz y oscuridad constante también. Los resultados obtenidos fueron muy similares a las cepas de *M. fijiensis* no se observó una inhibición clara. El porcentaje de inhibición mayor se dio en 400 ppm tanto para luz como para oscuridad la cual representa la CE₅₀ (Fig. 11B), al ser el mayor porcentaje inhibición detectado no se obtiene dato de CE₉₀ a diferencia de las cepas de *M. fijiensis* (Fig. 11C). Las condiciones de luz y oscuridad no tuvieron diferencia significativa en este ensayo. Nuevamente se comprobó la tolerancia a esta toxina en hongos, sin embargo, para determinar si la tolerancia era general, se decidió probar con un microorganismo bacteriano.

E. coli

E. coli es un tipo celular distinto a los hongos, de esta forma se eligió para comprobar la falta de toxicidad de la juglona o dicho de otra manera la alta tolerancia a la misma. El ensayo se realizó solo con dos concentraciones (300 y 500 ppm). Encontramos que las dos concentraciones son suficientes para la inhibición del desarrollo en *E. coli* por el número de UFC/ml con respecto al tiempo cero, sin embargo, no podemos concluir una CE_{50} pero sí una CE_{90} a los 30 minutos con 300 ppm en la condición de luz constante (Fig. 11C). Con este dato podemos sugerir que la juglona es una molécula tóxica, sin embargo para organismos fúngicos probados es poco tóxica, o al estar expuestos diariamente a condiciones altas de estrés biótico y abiótico su mecanismo antioxidante es activado fuertemente y no logramos observar una condición de inhibición total niquiera en condiciones de luz donde la juglona es más activa.

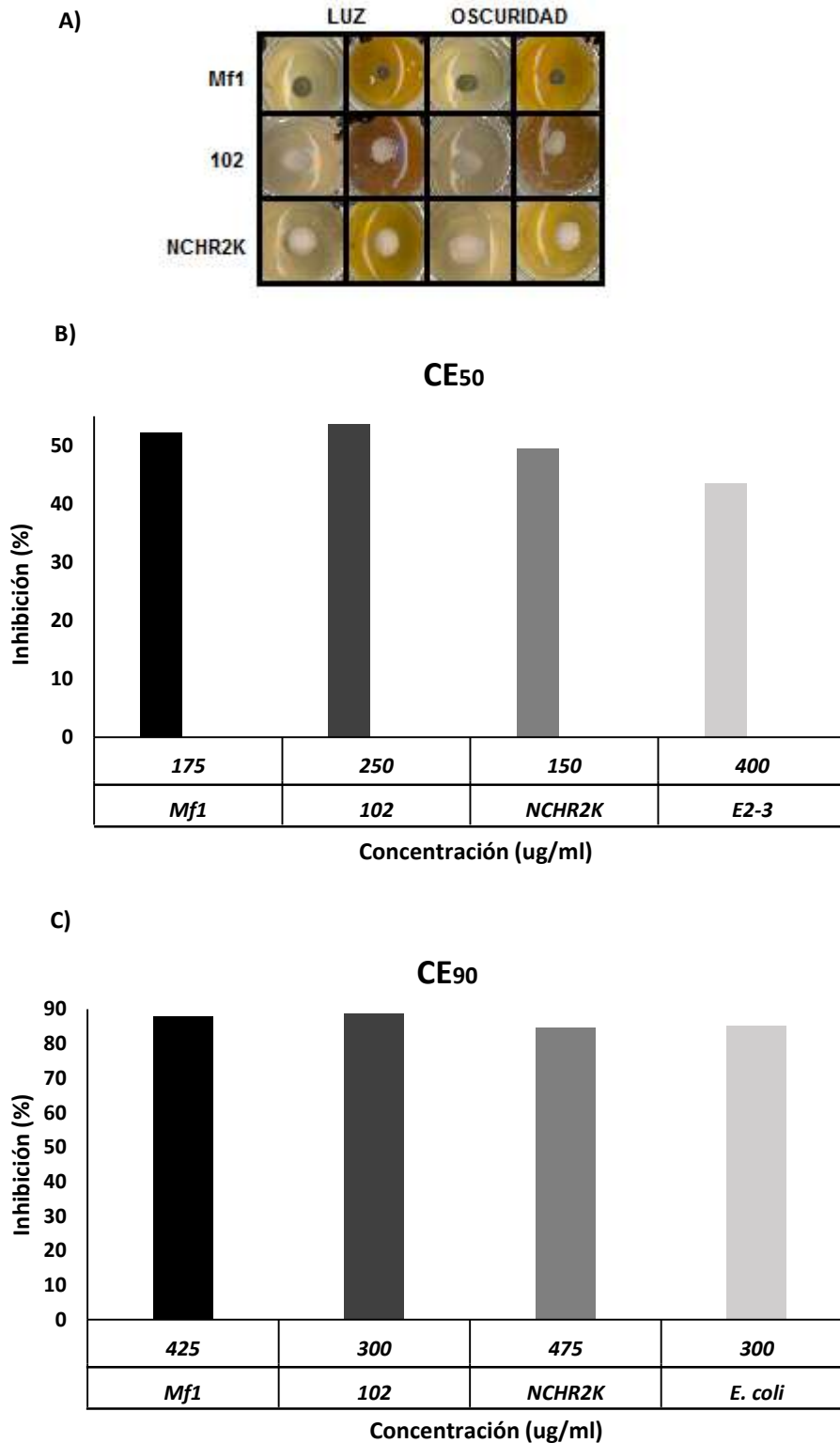


Figura 11. Evaluación del desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium spp.* y *Escherichia coli* en presencia de varias concentraciones de la toxina juglona. Se determinó la CE50 y CE90 a partir de peso seco. A) Ensayo de CMID para las tres cepas (Mf1, 102 y NCHR2K), no se obtuvo la CMID. B) CE50 dada en ug/ml para cepas de *M. fijiensis* y *Fusarium spp.* C) CE90 dada en ug/ml para cepas de *M. fijiensis* y una de *E. coli*.

M. acuminata

Se ha reportado que la juglona genera estrés oxidativo en la hoja de banano, así, se decidió realizar la inyección de la misma a 500 ppm disuelta en metanol como lo reportó El-Hadrami et al., 2005. Para determinar lo mencionado anteriormente se realizaron cortes histológicos para su posterior tinción por la técnica de DAB para observar presencia de EOR's. Los resultados de los cortes histológicos teñidos con DAB muestran una coloración café en presencia de especies de oxígeno reactivas, en este caso H_2O_2 . En la figura 1.12A (panel derecho) podemos observar la hoja de banano inmediatamente después de ser inyectada, al paso de 6 horas expuesta a luz UV se pueden observar pequeñas lesiones con tendencia necrótica en el punto de inyección (1.12B panel izquierdo), sin embargo, macroscópicamente no son tan claras, es por esto que se realizaron controles como de daño mecánico para evaluar si el deterioro es provocado por la inserción de la aguja o por la juglona, ya que se producen compuestos fenólicos al realizar el daño mecánico, así mismo la juglona se encuentra disuelta en metanol el cual puede ser un agente tóxico para la hoja por lo que utilizó como control también. No obstante, es claro que la inyección de juglona produjo mayor daño al tejido, sin embargo se aprecia que también hay daño y por lo tanto producción de EORs con el control de metanol y daño mecánico al presentar lesiones muy parecidas (Fig. 12C-D). Los datos macroscópicos fueron correlacionados con los datos microscópicos donde se observa claramente la presencia de fragmentos cafés en los cortes teñidos con DAB a comparación del control (Fig. 12) donde no se observa dicha coloración. Es evidente que en el corte histológico de la zona de inyección de la juglona (Fig. 12E) se observa con mayor intensidad, y en orden

descendente el corte del control de metanol (Fig. 12C) en menor intensidad que el control de metanol pero también en el control de daño mecánico se observan pequeños puntos cafés (Fig. 12D) es importante resaltar que en el corte sin daño mecánico pero con tinción, se observan ligeros puntos cafés en muy baja intensidad (Fig. 12B) sugiriendo la generación de EORs por la exposición a los rayos UV del sol.

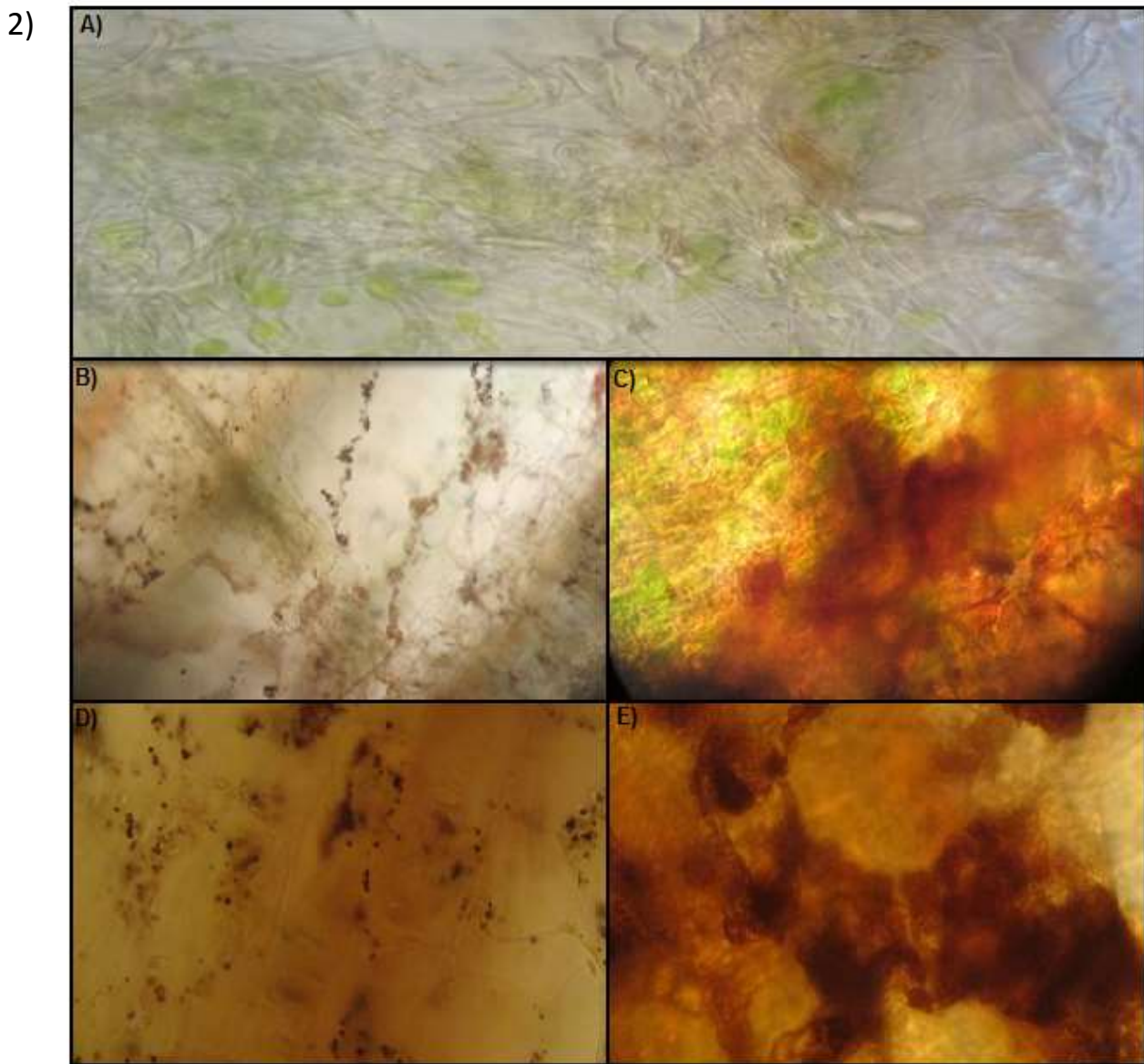
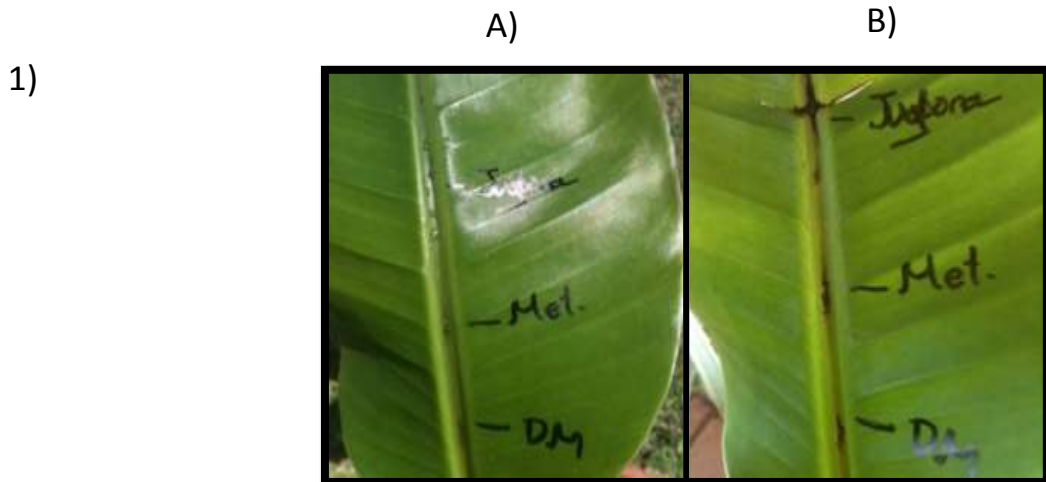


Figura 12. Visualización microscópica de cortes histológicos de hoja de banano inyectada con juglona y teñidos con la tinción de DAB. A) Control sin tinción, B) Control con tinción, C) Control de metanol, D) Control de daño mecánico y E) Juglona. 100X. Microscopio de contraste de fases.

10. Análisis de la expresión de genes relacionados en la síntesis de melanina y estrés oxidativo.

El incremento del ARNm del gen *pks1* para la cepa Mf1 se observó desde el tiempo cero de la inducción mostrando un incremento progresivo hasta los 360 minutos donde también se observó el nivel más alto de expresión tanto para la cepa Mf1 es evidente que los valores (Fig.13B) sugiriendo que la inducción de estrés oxidativo promueve el inicio de la síntesis de la DHN melanina y su posible dependencia a condiciones de luz, ya que en oscuridad la expresión es menor. La expresión del gen *pks2* no es significativa con respecto al *pks1* indicando que su actividad puede no estar involucrada a estrés oxidativo (Fig. 13C). Por otro lado observamos que la expresión del gen *Scytd* es mínima en condiciones de luz encontrando que su mayor expresión es de 25 veces más con respecto a la tubulina teniendo su mayor pico de expresión a los 120 minutos, sin embargo en oscuridad constante observamos que su expresión fue mayor que en luz con datos oscilatorios (9,31, 9, 44 y 24 veces más con respecto a la tubulina) (Fig. 13A). La juglona es una toxina que ha sido reportada como un agente generador de 1O_2 por lo que se decidió evaluar el gen *pdx* el cual está relacionado con la formación de dicho radical libre, pero los resultados obtenidos de la expresión del gen fueron muy bajos (Fig. 13D). Así mismo se analizaron otros genes antioxidantes como catalasa y superóxido dismutasa, para ambos casos la expresión fue prematura ya que desde el tiempo cero se observó expresión, no obstante la expresión de *sodcuzn* fue mayoritaria para casi todos los tiempos probados, incrementándose con el tiempo hasta alcanzar su niveles más altos a los 120 y 360 minutos (126 y

239 veces más con respecto a la tubulina) (Fig. 13E-F). El gen de catalasa, su expresión fue menor en comparación de *sodcuzn* pero se mantuvo constante (32, 25, 31, 16 y 3 con respecto al tiempo).

Con el análisis de valores relativos podemos predecir en relación a la cepa pigmentada Mf1 (para nuestro laboratorio es considerada como una cepa silvestre por su baja tolerancia a fungicidas que en su mayoría están relacionados con mutaciones puntuales, además de pigmentación) nuestra cepa control, la expresión de las cepas albinas (102 y NCHR2K), así mismo si existe diferencia entre luz y oscuridad. De esta manera podemos saber en función de Mf1 cuantas veces más o menos se está expresando un gen. Por ejemplo los genes analizados que están directamente relacionados con la formación de la DHN melanina por su participación como precursores en la ruta de síntesis al ser expuestos con juglona tenemos la creencia que estos serán activados en mayor cantidad en la Mf1 por su alta pigmentación, pero extrañamente el gen *Scytd* para la cepa NCHR2K tiene mayor expresión en casi todos los tiempos probados en luz constante (26.6, 30.5, 24.5, 1 y 10 veces más con respecto a Mf1), siguiendo el mismo patrón en oscuridad, pero con datos menos representativos que en luz (Fig. 14A), porque en el ensayo de acumulación de melanina fue la cepa que tuvo las concentraciones más bajas. Sin embargo, el gen *pks1* que ha sido demostrado que tiene actividad directa en la síntesis de melanina, tiene mayor expresión en los primeros 30 minutos para las cepas albinas en condición de luz, pero a partir de los 60 minutos la expresión en función de Mf1 es muy poca (102: 0.14, 0.05, 0.01; Mf1: 0.24, 0.21, 0.73), el mismo caso se observa en oscuridad, lo cual nos indica que no existe diferencia significativa entre luz y oscuridad para dicho gen. Siguiendo

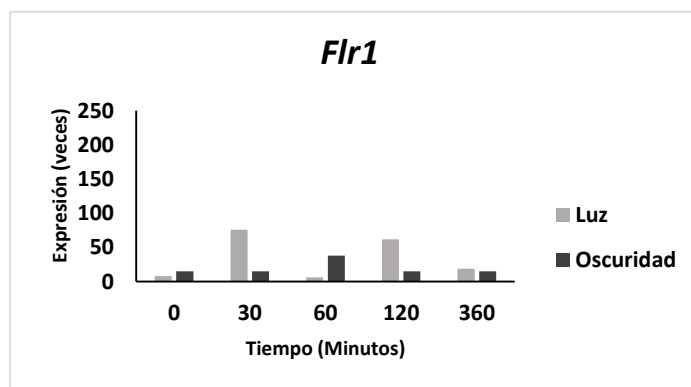
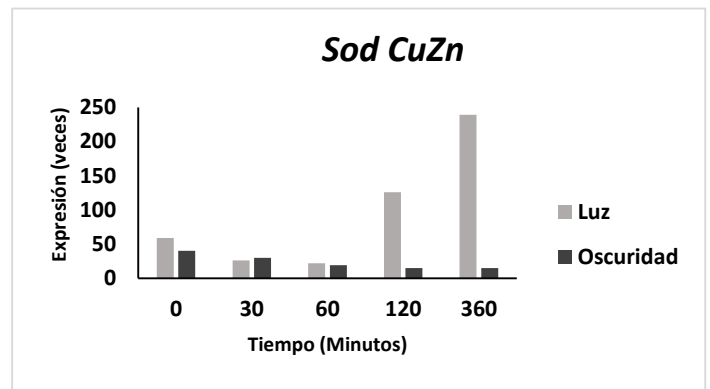
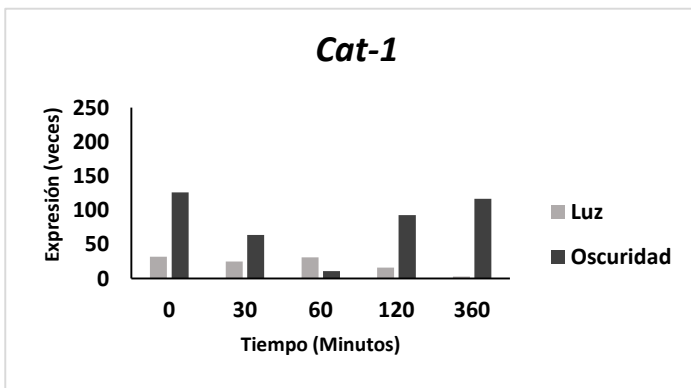
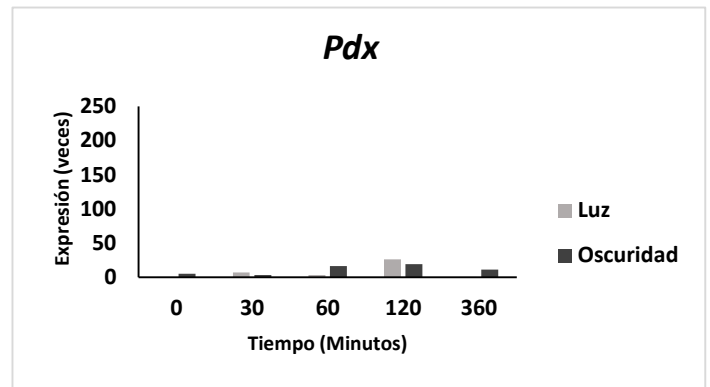
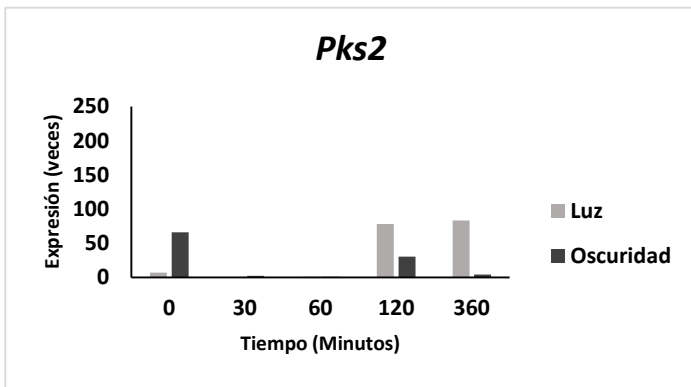
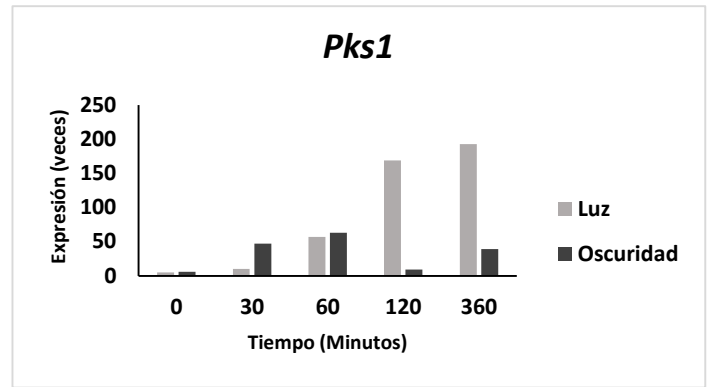
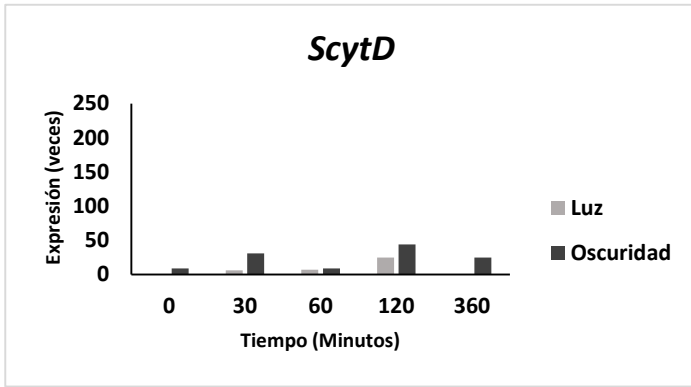
con los genes que están involucrados en la síntesis de melanina encontramos a un gen con las mismas características aparentes que *Pks1*, *Pks2*, pero no obstante la expresión en Mf1 es muy baja en luz constante, y en la cepa albina 102 parece tener influencia ya que sus niveles de expresión son más altos en toda la cinética con respecto a Mf1 (2.8, 3.25, 147.5, 1.7, 1.95), en oscuridad observamos valores más altos únicamente entre los 30 y 60 minutos (Fig. 14C), con respecto a la NCHR2K no se observa dicho patrón. Posiblemente para la cepa 102 este gen esté ligado directamente con la síntesis de melanina.

Como se ha estado mencionando la juglona es una molécula generadora de estrés oxidativo al ser fotosensible y generar 1O_2 , y el fitopatógeno al ser en presencia de estas toxinas que el mismo secreta al medio debe de tener un arsenal de genes antioxidantes que lo prevengan y le ayuden a atrapar y expulsar estas moléculas tóxicas. De tal manera que se decidió evaluar la participación de genes antioxidantes en respuesta a la juglona. Uno de los genes analizados en este rubro fue *cat-1* ya que en estudios previos en respuesta a agentes de tensión se observó que tiene la mayor expresión en comparación con los otros dos genes de catalasa analizados en ese estudio. Resultó que la cepa Mf1 tiene niveles más altos de catalasa con respecto a las cepas albinas en las dos condiciones y en la mayoría de los tiempos a excepción del tiempo cero de NCHR2K donde tiene 1.84 veces más de expresión con respecto a Mf1 en luz constante, aunque a los 60 minutos la expresión tanto de NCHR2K y 102 es mayor que Mf1 en oscuridad (Fig. 14-E). Si existe expresión de catalasas significa que existe acumulación de peróxido de hidrógeno en el medio, por lo que la presencia de superóxido es factible pudiendo estar en grandes concentraciones, de esta manera, se pensó en

analizar la expresión del gen *SodCuZn* y para la cepa 102 en condición de luz encontramos que salvo en 60 minutos (1.18 veces más con respecto a Mf1) hay muy poca expresión en relación a Mf1, la cepa NCHR2K sigue casi el mismo patrón solo que en de los 30 a los 60 minutos la expresión es mayor (5.7 y 5.54 veces más) (Fig. 14F). La activación de este gen en condición de oscuridad para las cepas albinas es casi nula en comparación con Mf1, pero nuevamente observamos mayor expresión que Mf1 a los 60 minutos para las dos cepas (102: 2.36; NCHR2K: 1.4) siguiendo una misma conducta a los 60 minutos para estos dos genes antioxidantes (Fig. 14E-F). Además medimos la expresión del gen *Pdx*, y fue sorprendente que la cepa Mf1 tuviera niveles muy bajos de expresión, y que los de la cepa NCHR2K fueran muy altos, esto en condiciones de luz, ya que en condiciones de oscuridad no se observa dicho dato, esto posiblemente se deba a un error experimental, o será necesario evaluar más a fondo la función del gen *pdx* en ambas condiciones y para ambas cepas, ya que la cepa 102 no mostró mayor expresión (Fig. 14D).

Por otro lado observamos la relación que existe entre tolerancia y virulencia, el cual es un tema a debatir, ya que no por ser una cepa con mayor capacidad de virulencia es más tolerante a compuestos tóxicos, sin embargo, en este trabajo encontramos que el gen *Flr1* es también activado por la toxina juglona, sugiriendo su gran capacidad de resistencia a agentes tóxicos no solo a fungicidas que son utilizados en el combate de la enfermedad como se ha reportado para mancozeb, si no, también a moléculas que son sintetizadas y secretadas por *Mycosphaerella fijiensis* en el proceso de patogénesis en contra de su hospedero, indicando que a su vez es tóxico para el mismo. Los valores relativos que obtuvimos para este gen

en condición de luz constante fueron distintos para las cepas albinas ya que se observa mayor expresión que Mf1 en el tiempo 0 y a los 360 minutos para 102 (2.87 y 1.89 veces más), y para la cepa NCHR2K de los 30 a los 120 minutos (1.81, 4.5, 1.41 veces más respectivamente), pero es importante resaltar que la cepa 102 en oscuridad constante tiene su expresión más alta con respecto a Mf1 en el tiempo 0, en su caso, al ser una cepa considerada de alta a medianamente tolerante a los fungicidas la expresión prematura de *flr1* es esencial (Fig. 14G). Por otro lado, la cepa NCHR2K en oscuridad no presenta mayor expresión que Mf1, a lo que podemos sugerir una posible dependencia de luz, o más aún que la toxina juglona al ser fotosensible demuestra mayor toxicidad y es por esto que se refleja en la activación del gen. Posiblemente el no encontrar una inhibición total del desarrollo en los ensayos de toxicidad donde éstas cepas fueron probadas a diferentes concentraciones de juglona, o los periodos de recuperación que ese observaron, puede deberse a la activación del gen *Flr1* y posiblemente su regulación río arriba o río abajo están involucrados en la depuración de compuestos tóxicos.



13. Niveles de expresión de ARNm de Mf1 con respecto a la B-tubulina en presencia de la toxina juglona. Condiciones: 500 ppm juglona, luz y oscuridad constante. Genes analizados: A) *ScytD*, B) *pks1*, C) *pks2*, D) *pdx*, E) *cat-1*, F) *sodcuZn* y G) *flr1*. Método de análisis de expresión relativa propuesto por Ptaff, 2001.

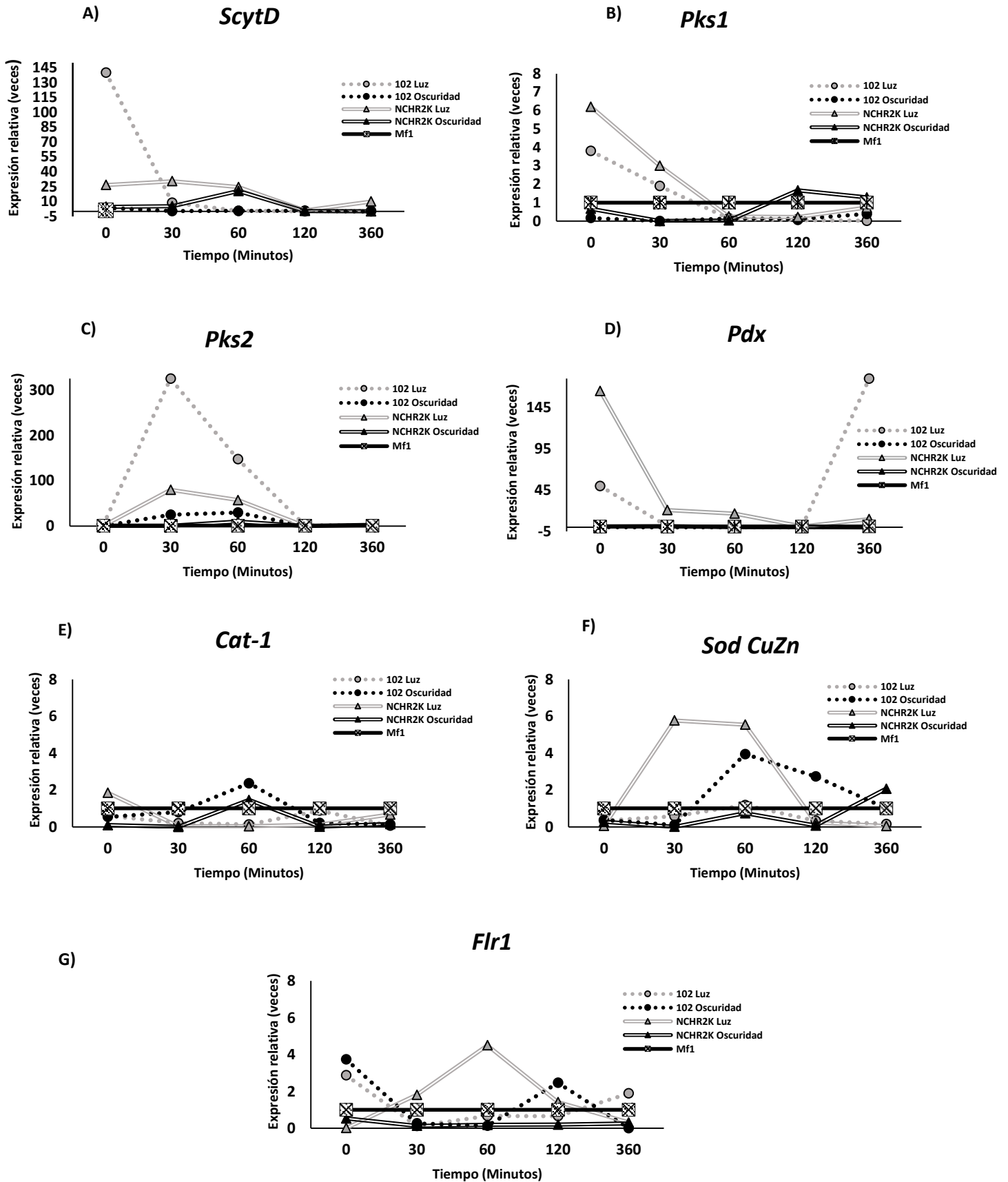


Figura 14. Valores relativos de expresión de las cepas albinas en función de la cepa pigmentada. Condiciones: 500 ppm β -glucosa, luz y oscuridad constante. Genes analizados: A) *ScytD*, B) *pks1*, C) *pks2*, D) *pdx*, E) *cat-1*, F) *sodcuzn* y G) *flr1*.

VIII. DISCUSIÓN

El desarrollo de los hongos hemibiotróficos radica en la necesidad de cursar dos fases para su establecimiento: Biotrofia y necrotrofia. Como primer etapa es necesaria la formación de estructuras especializadas que permitan la colonización del tejido, ocurriendo inicialmente en la fase biotrófica, sin embargo las estructuras que se observan en la fase necrotrofica no son tan distintas visiblemente, pero funcionalmente tienden a reconocer superficies específicas del hospedero de tal manera que pueden alimentarse de los exudados de las células vegetales vivas sin desarrollar muerte celular, así mismo es posible sugerir la limitada capacidad de producir enzimas que degraden pared celular. Por otro lado en la fase necrotrofica el hongo es capaz de secretar toxinas y enzimas que provocan la muerte celular para la obtención de nutrientes que son liberados a partir del tejido vegetal muerto (Horbach *et al.*, 2011), inhibiendo la capacidad de la planta para establecer una respuesta de defensa. Esta interacción planta-patógeno induce una rápida acumulación de EORs en el tejido vegetal estando involucrado no solo como defensa por parte de la planta en la primer fase, si no como inductor de muerte celular y transducción de señales en diferentes procesos de defensa para el patógeno en la segunda fase. Se han considerado a diferentes moléculas como factores de virulencia de hongos hemibiotróficos en la fase de necrotrofia, uno de ellos es la melanina (Kubo *et al.*, 1982; Rasmussen y Hanau, 1989; Wolkow *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 2004a), este pigmento promueve la supervivencia y el desarrollo en diferentes ambientes que suelen ser de condiciones extremas al proveer protección contra luz UV, enzimas de lisis celular, metales tóxicos, competencia

por otros microorganismos, así como el fortalecimiento de las hifas para permitir con mayor facilidad la penetración a la célula vegetal (Butler et al., 2009). La idea de que el aumento de producción de melanina incrementa la patogenicidad de los hongos se estudio en primera instancia en hongos patógenos de humanos, sin embargo, el estudio en hongos fitopatógenos continua y es un tema de interés actual para determinar las estrategias de patogenia de los hongos hemibiotróficos y necrotróficos. *Mycosphaerella fijiensis* es un hongo hemibiotrófico que produce melanina como parte de su desarrollo, pero se tiene la teoría que la mayor cantidad de melanina es secretada en la fase de necrotrofia y esta melanina al ser inhibida produce moléculas que son altamente tóxicas por su capacidad de generar especies de oxígeno reactivas, siendo dichas especies, las que culminant la fase necrotrófica (Beltrán-García et al., 2014). Por este antecedente se decidió evaluar la dinámica de secreción de melanina (DHN) en este hongo, así como la formación de moleculas tóxicas a través de su inhbición, para determinar la participación de las especies de oxígeno reactivas en la activación de genes relacionados en la virulencia del hongo *M. fijiensis*.

En la dinámica de secreción de melanina encontramos un dato importante a resaltar es la existencia de cepas que visualmente no contienen este pigmento en sus hifas, ya que al cultivarlas en medio sólido (PDA) son blancas con tendencia a rosa, sin embargo, en medio líquido el desarrollo del pigmento oscuro es visible con el paso de los días. Se cree que la falta de melanina provoca que la cepa sea menos virulenta, sin embargo logra la colonización del tejido vegetal posiblemente en mayor tiempo. Por lo anterior, se decidió utilizar dos cepas albinas (102 y NCHR2K) y una cepa pigmentada (Mf1) para determinar la diferencia de secreción

de dicho pigmento. Previamente se realizó una tinción de melanina de dos cepas, una albina (102) y otra pigmentada (Mf1) como referencia para observar la diferencia estructural y de pigmentación, fue muy interesante comprobar la diferencia relativa en cantidad de melanina de una cepa y otra, la cepa albina muestra una menor intensidad de pigmento con la tinción de plata-sulfato de cobre, y a su vez una estructura de hifa distinta en tamaño y grosor que la cepa Mf1, la primer cepa mencionada tiene hifas delgadas y de color café claro y la segunda cepa tiene hifas más definidas con mayor grosor y la coloración café más intensa en la pared celular de la hifa apoyando el posible supuesto de las estructuras rígidas que ayudan a la penetración a la célula vegetal, por lo que se puede fundamentar la idea de que las cepas pigmentadas tienden a mayor capacidad de virulencia. La cepa Mf1 es el modelo más claro de relación de incremento de biomasa con la acumulación de melanina, ya que la fase logarítmica la alcanza a los 8 días y el incremento de melanina se observa a los 10 días. Las cepas albinas mostraron comportamiento similar, sin embargo, es necesario resaltar que la cepa NCHR2K siguió el mismo patrón de incremento de biomasa y acumulación de melanina, pero en mucho menor cantidad que la cepa Mf1, la cantidad de biomasa es aproximadamente la mitad con respecto a Mf1 y por consiguiente la cantidad de melanina secretada al medio es menor, no existe diferencia significativa entre luz y oscuridad para las dos cepas. Si la melanina en *M. fijiensis* es un factor de virulencia esencial para el establecimiento del hongo e iniciar y mantener la patogenicidad en la planta, este dato justifica la creencia que a menor síntesis de melanina menor virulencia por parte del patógeno. Lo anterior se puede respaldar con el ensayo realizado en hojas de banano, donde fue

posible dar seguimiento al incremento de la acumulación de melanina en las células vegetales en el transcurso de la infección, y fue muy claro que la secreción de melanina fue incrementando conforme la etapa de la enfermedad, es decir, a mayor cantidad de melanina mayor lesión en las hojas, proponiendo que el hongo está en la fase de necrotrofia. (Beltrán-García et al., 2014). Por otro lado, los resultados que obtuvimos con la cepa 102 fueron distintos a la cepa NCHR2K en cuanto a la cantidad de biomasa, ya que fue muy similar a la cepa pigmentada, no obstante en la cuestión de acumulación de melanina las concentraciones obtenidas a lo largo de la cinética fueron oscilatorias, teniendo concentraciones de melanina más altas, por ejemplo el día 8 fue mucho mayor que para Mf1 en este caso si observamos diferencia significativa entre oscuridad constante y luz-oscuridad; esta cepa tiene la característica de ser una cepa con gran resistencia a fungicidas a diferencia de las dos anteriores que tienen tendencia a poca tolerancia en general. Datos reportados en el laboratorio (Preciado 2010 y Estarrón) muestran que las cepas expuestas a diferentes concentraciones de agentes fotosensibilizadores tales como rosa de bengala, azul de metileno, perinafteno entre otros, desarrollan poca tolerancia en algunas cepas albinas tal es el caso de la 102, sin embargo mayor tolerancia por Mf1, argumentando la capacidad protectora de la melanina en contra de luz UV (Hajime et al., 2010; Singaravelan et al., 2008) y al atrapar las EORs; más aún en este experimento se corrobora la cantidad de melanina secretada es importante en el desarrollo del micelio en condiciones de estrés. Es necesario realizar el experimento in vivo para fundamentar dichos datos. Es importante dar seguimiento a los genes que participan en la síntesis de melanina con respecto a los días para correlacionar los

datos obtenidos en este trabajo, ya que podremos determinar si la cantidad de melanina esta influenciada por la expresion de los genes involucrados en la síntesis tales como *pks1*, *vermelona sintetasa*, *sytalona dehidratasa* y *lacasa*, existe evidencia que las cepas albinas en otros hongos se debe a una mutación en el gen *pks* (Butler y Day, 1998, Engh et al., 2007; Kimura y Tsuge, 1993, Moriwaki et al., 2004, Yang et al., 2010).

Otro de los factores de virulencia sugeridos en el cambio a la fase de necrotrofia son los metabolitos secundarios que son tóxicos para las plantas tales como: juglona, fijiensina, 2,4,8 trihidroxi-tetralona, 4 hidroxiscitalona, y algunas otras toxinas hidrofílicas (Molina y Krausz, 1988; Stierle et al., 1991; Harelimana et al., 1997; Lepoivre, 2000; Hoss et al., 2000; Cruz-Cruz et al., 2009 y 2011). Algunos de estos metabolitos derivan de la síntesis de la melanina al ser alterada, provocando la muerte celular para tener acceso a los nutrientes ya que macroscópicamente se observan lesiones con rayas negras entre zonas cloróticas, secando la hoja (fase 5 y 6 de Meredith y Lawrence, 1969; Upadhyay et al. 1990). Estos metabolitos derivados de la inhibición de la síntesis de melanina se ha demostrado que son tóxicos y aumentan el grado de la enfermedad al tener lesiones con mayor severidad (Hoss et al. 2000), apoyando la hipótesis que los metabolitos derivados de la síntesis de la melanina contribuyen con el desarrollo de los síntomas. Para obtener *in vitro* estos metabolitos se utilizan inhibidores comerciales de la síntesis de melanina tales como pyroquilon o triciclazol que tienen como blanco específicamente la 3-hidroxinaftaleno reductasa la cual cataliza la reacción de reducción de 1,3,8-trihidroxinaftaleno a vermelona. La pigmentación roja-café que se produce se debe a la acumulación de metabolitos

tales como: 2-hidroxi-juglona, flaviolina (Beltrán-García et al., 2014; Saparrat et al., 2009) los cuales son productos de la autoxidación de la tetrahidroxinaftaleno y la trihidroxinaftaleno al inhibir sus reductasas. En el presente trabajo se decidió utilizar pyroquilon ya que en estudios previos en el laboratorio se obtuvieron los mismos resultados en cuanto a la pigmentación, sin embargo en cuanto a inhibición del desarrollo el pyroquilon resultó ser más efectivo (Gómez, 2011). El pyroquilon alcanza hasta 300 ppm antes de inhibir el desarrollo del micelio, concentración que es imposible utilizar en campo. Un dato interesante, es que *Pseudocercospora griseola*, género cercano a *M. fijiensis* alcanza 100 ppm, menos de la mitad, una vez más comprobando la tolerancia de *M. fijiensis*, cabe mencionar que la pigmentación del hongo no cambia con la adición de este químico, sugiriendo que su inhibición no es a nivel de melanina de pared celular, si no, que de la melanina secretada por el patógeno. En general el objetivo de probar estos metabolitos en contra del mismo patógeno fue para evaluar la tolerancia es a dichas moléculas, ya que al ser tóxicas para la planta, posiblemente serían tóxicas para el mismo patógeno, sin embargo, encontramos que estos productos solubles no inhiben el desarrollo del micelio en su totalidad, existe una clara inhibición para las dos cepas probadas, pero no obstante nunca se observa una inhibición del 100% porque el desarrollo del micelio se tornó reversible. Es necesario desarrollar experimentos *in vitro* donde podamos dar seguimiento a la fitotoxicidad de estas moléculas para determinar qué tan importantes son en la virulencia y demostrar si en *M. fijiensis* el grado de la enfermedad aumenta.

La juglona (1,4 naftoquinona) es un metabolito secundario también en parte obtenido a partir de la inhibición de la DHN melanina, esta molécula tiene

propiedades citotóxicas al tener como blanco el cloroplasto (Busogoro et al., 2004a), induce alteraciones en el gradiente electroquímico del protón a través de la membrana plasmática y además la fuga de electrones se incrementa provocando una disminución en la cantidad de ATP celular (Lepoivre et al., 2002). Algunos estudios conllevan a la hipótesis de que la fitotoxicidad de la juglona depende de su activación por luz (Busogoro et al., 2004a). Durante años ha sido observado que los síntomas de la Sigatoka disminuyen cuando las plantas son cultivadas en la sombra lo que sugiere nuevamente la participación de una toxina activada por la luz. Anteriormente se pensaba que la toxina fotosensible que el hongo producía era del tipo de las cercosporinas, por su relativa proximidad genética con el hongo fitopatógeno del tabaco y el maíz, *Cercospora*, más aún, esta toxina no ha sido reportada en *M. fijiensis*. Tanto la activación de la melanina como la activación de la cercosporina, implica la formación de especies de oxígeno reactivas (EOR's) tales como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dioxígeno en singulete (1O_2) y el radical hidroxilo (OH). Así mismo se ha demostrado que la toxina juglona al ser irradiada con luz UV produce 1O_2 (Beltrán-García et al., 2014 datos no publicados) así como la misma melanina, y se sabe que la sobreproducción de 1O_2 provoca la pérdida de la integridad de los cloroplastos lo que precede a la ruptura de la vacuola central, para generar la muerte celular. Este proceso de muerte favorece la nutrición del hongo patógeno para completar su ciclo de vida en la hoja en la fase necrotrófica. Al ser considerada una de las toxinas más agresivas se decidió evaluar su toxicidad en plantas de banano para observar presencia o ausencia de necrosis en la hoja, así como la tolerancia del propio fitopatógeno y como control de toxicidad utilizamos

una especie del género *Fusarium* y *E. coli* en presencia de luz y oscuridad constante. De esta forma pudimos demostrar la gran tolerancia de *M. fijiensis* a las EORs, la inhibición observada fue mínima y a altas concentraciones. En este sentido se analizaron la expresión de genes involucrados en la síntesis de melanina con la finalidad de observar si el contenido de melanina se podría ver afectado o inducido en presencia de esta toxina fotosensible. Los genes analizados fueron: *pks1*, *pks2*, *scytd*, los primeros dos aparentemente tienen la misma función sin embargo, encontramos que la activación de *pks2* es mucho menor en las dos condiciones, sugiriendo su posible participación en otros procesos que aún desconocemos. En estudios previos han reportado que la inactivación de genes del tipo de *pks* fomenta el desarrollo celular con deficiencia de melanina en hongos hemibiotróficos y necrotrofos (Churchill, 2010; Hajime et al., 2010; Cho et al., 2013; Yang et al., 2012) sin embargo, ellos mencionan que las cepas mutadas siguen siendo virulentas incluso hasta con mayor capacidad de patogenicidad, esto nos lleva a lo propuesto por Hoss et al., 2000 donde observan que al utilizar los fungicidas que inhiben la síntesis de la DHN melanina la enfermedad se torna más agresiva, por lo que *pks* está involucrado en la síntesis de melanina, pero algunos autores con estos datos sugieren que la melanina no es un factor de virulencia, más no podemos descartar que lo sea en *M. fijiensis* debido a que la melanina está asociado a una activación por luz, generando la muerte celular vía la generación de $^1\text{O}_2$ (Beltrán-García et al, 2014). Es evidente que la expresión del gen *pks1* en la cepa pigmentada es mayor a diferencia de las cepas albinas, el hecho de que exista una mayor activación de este gen apoya la idea de Churchill, 2011, que *pks1*, está directamente relacionado con la síntesis de

melanina, además que la inducción de este hongo con un agente generador de estrés, en este caso la juglona, aumenta la acumulación de melanina. En el caso de *Scytd* es distinto, para la cepa pigmentada no se observa gran expresión, sin embargo para las cepas albinas si, y mayor en NCHR2K, en este sentido podemos apoyar la idea de que la melanina en las cepas albinas es tardía y su mayor acumulación es a partir de la sitalona. Como perspectiva de este trabajo se manejará la evaluación de la ruta completa de la síntesis de melanina hasta la culminación de la misma que es la lacasa, para obtener mayor información y establecer mejor el panorama de la virulencia que provee la melanina y así mismo tener datos más resaltantes entre las cepas pigmentadas y las cepas albinas.

Por otro lado se midieron genes involucrados en la respuesta a estrés oxidativo esto, para evaluar la toxicidad de la juglona al ser una molécula generadora de 1O_2 tales como *cat-1*, *sodcuZn*, *pdx* y *flr1*. Es de nuestro conocimiento que las catalasas y las superóxido dismutasas que presenta *Mycosphaerella fijiensis* siempre están activas y su expresión es prematura desde 0 a los 30 minutos principalmente la cepa Mf1 (Beltrán-García et al., 2009), ya que se sabe que su actividad aumenta en respuesta a diferentes condiciones de tensión principalmente al aumento de H_2O_2 en el citosol (Michan, 2002). En el resultado de nuestro ensayo fue muy evidente que la cepa pigmentada tiene mayor expresión de *cat-1* en comparación de las cepas albinas probadas. Si existe expresión de catalasas significa que existe acumulación de peróxido de hidrógeno en el medio, por lo que la presencia de superóxido es factible pudiendo estar en grandes concentraciones, de esta manera, se pensó en analizar la expresión del gen *SodCuZn*, en este sentido obtuvimos en general, resultados semejantes a la

expresión de catalasa, donde fue mayor para la cepa pigmentada. Los resultados sugieren una correlación con la generación de $^1\text{O}_2$ donde se había observado en mayor cantidad en la misma cepa (Beltrán-García et al.,), lo que nos lleva a pensar que a mayor cantidad de melanina mayor generación de EOR's provocando mayor perturbación en el estado redox de la célula llevando a estrés oxidativo y a consecuencia de esto, la activación del arsenal de genes antioxidantes.

Existe una gran relación entre la respuesta a estrés oxidativo y la resistencia a multidrogas drogas, ya que muchas de los químicos utilizados en el combate contra los organismos patógenos están involucrados en activar la respuesta oxidativa, de tal manera que muchas de estas moléculas y genes están involucradas a su vez en la resistencia a multidrogas. Es por esto que, *Flr1* ha llamado nuestra atención al estar relacionado con la resistencia a fungicidas que de alguna manera logran su efecto a través de citotoxicidad. *Flr1* pertenece a la superfamilia facilitadora mayor y es un gen que se ha atribuido su expresión al factor de transcripción *Ap-1* (Nguyen et al., 2001; Lev et al., 2005), y su activación se ha relacionado principalmente bajo el estrés oxidativo que provoca el fungicida mancozeb, proporcionando resistencia a la célula, en *Saccharomyces cerevisiae* (Teixeira et al., 2008 and 2010). Al ser un agente que provee resistencia a multidrogas quisimos evaluar su participación en la resistencia de *M. fijiensis* a la toxina juglona, de esta manera podremos observar la relación existente entre tolerancia y virulencia. Encontramos que *Flr1* también es activado por la juglona, lo que nos lleva a un panorama de resistencia no solo a fungicidas si no, a agentes que provocan estrés oxidativo en la célula, llevandonos a pensar que la juglona es

un agente tóxico para el mismo, sin embargo, este y posiblemente otros genes le brindan resistencia. Estos datos los podemos correlacionar no con publicaciones sobre este tema, ya que es el primer dato que se presenta de la relación de la resistencia a juglona mediada por *Flr1*; si no, con datos que se han realizado en nuestro laboratorio anteriormente, donde la expresión del gen *Flr1* se observa con la exposición de *M. fijiensis* al fungicida mancozeb y agentes de tensión tales como el peróxido de hidrógeno y el paraquat. En este sentido observamos la activación del gen desde los primeros 15 minutos, así como las catalasas y la superóxido dismutasa en función del mancozeb, sin embargo, su expresión fue menor a *flr1* sugiriendo que la expresión de *flr1* es necesaria para la supervivencia de la célula en presencia de mancozeb. En el caso de la juglona los niveles de catalasa y superóxido dismutasa también fueron elevados por lo que la resistencia es dependiente en su totalidad de un arsenal de genes antioxidantes y nosotros bajo el esquema que planteamos sugerimos la participación de *cat-1*, *sodcu2n* y *flr1* en la resistencia a agentes tóxicos, principalmente aquellos que generan especies de oxígeno reactivas.

IX. CONCLUSIÓN

Al inicio del trabajo nosotros tratábamos de comprender el fenómeno de agresividad del fitopatógeno en la planta de banano, el por que de la susceptibilidad de la planta y un acercamiento al entendimiento del cambio de la fase biotrófica a necrotrófica por estrés oxidativo, haciéndonos la pregunta: ¿Cómo manipula el patógeno al hospedante?. En este momento no podemos asegurar que la DHN melanina sea la única molécula que intervenga, pero sí podemos decir que es parte esencial de la patogénesis del patógeno en dos cuestiones: 1) provee dureza y rigidez a las hifas del hongo con las que logra colonizar por completo el interior así como protección para el mismo, 2) Es esencial dentro del arsenal de toxicidad que el fitopatógeno utiliza durante la patogénesis ya que en estudios previos se demostró que es una molécula generadora de dióxigeno en singulete y de esta manera funciona como una molécula dañina para el tejido vegetal (Beltrán-García et al., 2014). Por otro lado fue interesante encontrar la relación que existe entre tolerancia y virulencia, ya que encontramos un gen en común *Flr1*, el cual su activación se había sugerido únicamente a fungicidas así como el mancozeb, en el laboratorio hemos realizado estudios donde encontramos expresión de este gen expuesto a agentes de tención (manuscrito en preparación), sin embargo, podemos sugerir su gran capacidad de resistencia a agentes tóxicos y principalmente aquellos que generen estrés oxidativo. A su vez es indicativo que la juglona es un agente tóxico para el mismo hongo, no obstante con la ayuda de los genes antioxidantes incluyendo a

flr1 logra combatir dicho daño y revertirlo donde nosotros no logramos observar fisiológicamente ninguno.

X. REFERENCIAS

1. Able A.J. (2003). Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma* 221: 137–143.
2. Apel K., Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373–399.
3. Beltrán-García MJ, Manzo-Sanchez G, Guzmán-Gonzalez S, Arias-Castro C, Gomez-Mendiola M & Ogura T. (2009) Oxidative stress response of *Mycosphaerella fijiensis*, the black sigatoka pathogen of banana to hydrogen peroxide and paraquat stress conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 55: 887-894.
4. Beltrán-García MJ, Ogura T, Manzo-Sanchez G, Arias- Castro C. 2006. Catalasas de hongos fitopatógenos. ¿Factor de virulencia y resistencia a fungicidas?. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34:50-58.
5. Bergstrom GC, Nicholson RL (1999) The biology of corn anthracnose. *Plant Dis* 83:596-608.
6. Cavalcante, M.J. et al. (2011) Reactive Oxygen Species and Cellular Interactions between *Mycosphaerella fijiensis* and Banana. *Tropical Plant Pathology* 4:134-143.
7. Choquer M, Fournier E, Kunz C, Levis C, Pradier JM, Simon A, Viaud M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* 277:1-10.
8. Churchill AC. (2011) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Mol Plant Pathol.* 12:307-28.
9. Cruz- Cruz CA, García-Sosa K, Escalante-Erosa F, Peña-Rodríguez LM. (2011). Physiological effects of the hydrophilic phytotoxins produced by *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black sigatoka in banana plants. *J Gen Plant Pathol* 77:93–100.
10. Cruz-Cruz CA, García-Sosa K, Escalante-Erosa F, Peña-Rodríguez LM. (2009). Production of hydrophilic phytotoxins by *Mycosphaerella fijiensis*. *J Gen Plant Pathol.* 75:191–195.
11. El-Hadrami A, Kone D, Lepoivre (2005) Effect of juglone on active oxygen species and antioxidant enzymes in susceptible and partially resistant banana cultivars to Black Leaf Streak Disease. *European Journal of Plant Pathology.* 113: 241-254.

12. Gechev TS, Hille J. 2005. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *Journal of Cell Biology* 168: 17–20.
13. Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 43:205-227.
14. Gonzalez Esquer C.R. (2006). Caracterización de las actividades de catalasa, peroxidasa de ascorbato y peroxidasa de guaiacol en hojas de plátano en condiciones de estrés por daño mecánico. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Guadalajara.
15. Govrin EM & Levine A (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol* 10: 751–757.
16. Harelimana, G., Lepoivre, P., Jijakli, H. and Mourichon, X. (1997) Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to black leaf streak. *Euphytica*, 96, 125–128.
17. Hayden HL, Carlier J, Aitken EAB (2003) The genetic structure of *Mycosphaerella fijiensis* from Australia, Papua New Guinea and the Pacific Islands. *Plant Pathol* 52:703–712.
18. Howlett BJ (2006) Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. *Curr Opin Plant Biol* 9:371–375.
19. Kamoun, S. et al. (1999) Initial assessment of gene diversity for the Oomycete pathogen *Phytophthora infestans* based on expressed sequences. *Fungal Genet. Biol.* 28, 94–106.
20. Lamb C, Dixon RA. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. 48: 251–275.
21. Lamb C., Dixon R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. 48: 251–275.
22. Medina Herrera J.A. Degradación de H₂O₂ y resistencia al superóxido en cepas del hongo *Mycosphaerella fijiensis* tolerantes a fungicidas. Análisis de tolerancia al estrés oxidativo. Tesis de Maestría UABC (en proceso).
23. Mellersh DG, et al. 2002. H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant–fungal interactions. *Plant Journal* 29: 257–268.
24. Meredith, D.S. and Lawrence, J.S. (1969) Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 52, 459–476.
25. Mims C.W., Villancourt L.J. (2002). Ultrastructural characterization of infection and colonization of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*, and by a *C. graminicola* pathogenicity mutant. *Phytopathology* 92: 803-812.
26. Molina, G.C. and Krausz, J.P. (1989) A phytotoxic activity in extracts of broth cultures of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* and its use to evaluate host resistance to black sigatoka. *Plant Dis.* 73, 142–143.

27. Molina, G.C. and Krausz, J.P.(1989). A phytotoxic activity in extracts of broth cultures of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* and its use to evaluate host resistance to black sigatoka. *Plant Dis.* 73, 142–143.
28. O'Connell RJ, Bailey JA, Richmond DV (1985) Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol Plant Pathol* 27:75-98.
29. Politis D.J., Wheeler H. (1972). The perfect stage of *Colletotrichum graminicola*. *Plant disease Rep.* 56:1026-1027.
30. Shetty NP, Kristensen BK, Newman M-A, Møller K, Gregersen PL, Jørgensen HJL. (2003). Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 333–346.
31. Shetty NP, Mehrabi R, Lütken H, Haldrup A, Kema GH, Collinge DB, Jørgensen HJ. (2007). Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytol.* 2007;174:637-47.
32. Stierle AA, Upadhyay R, Hershenhorn J, Strobel GA, Molina G (1991) The phytotoxins of *M. fijiensis*, the causative agent of black sigatoka disease of bananas and plantains. *Experientia* 47:853–859
33. Strange RN (2007) Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. *Nat Prod Rep* 24:127–144.
34. Strobel, G.A., Stierle, A.A., Upadhyay, R., Hershenhorn, J. and Molina, G.C. (1993) The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of black Sigatoka disease, and their potential use in screening for disease resistance. In: *Biotechnology Applications for Banana and Plantain Improvement* (Wills, B. and Huggan, R.D., eds), pp. 93–103. Montpellier, France: International Network for the Improvement of Banana and Plantain.
35. Tanabe S, Ishii-Minami N, Saitoh K, Otake Y, Kaku H, Shibuya N, Nishizawa Y, Minami E. (2011). The role of catalase-peroxidase secreted by *Magnaporthe oryzae* during early infection of rice cells. *Mol Plant Microbe Interact.* 24:163-71.
36. Thomazella P. T., Teixeira P. L, Oliveira C., Saviani E., Rincones J., I.M. Toni, Reis O., García O., Meinhardt L.W., Salgado I., Pereira A.G. (2012). The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *New phytologist.* 194:1025-1034.
37. Upadhyay R.K., Strobel G.A., Coval S.J., Clardy J. (1990). Fijiensin, the first phytotoxin from *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of Black Sigatoka disease. *Experientia* 46:982–984
38. Walz A, Zingen-Sell I, Theisen S, Kortekamp A (2008) Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur J Plant Pathol* 120:317–330.
39. Wharton PS, Julian AM, O'Connell RJ (2001) Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* 91:149-158.