

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias en Ciencias de la Vida,
Orientación en Microbiología**

**Análisis metabólico del hongo de la madera de vid
*Lasiodiplodia theobromae***

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Carla Cristina Uranga Solís

Ensenada, Baja California, México

2017

Tesis defendida por
Carla Cristina Uranga Solís

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Tesis

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Dr. Iván Córdova Guerrero

Dra. Irma Soria Mercado

Dr. Thomas Kretzschmar



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinadora de Estudios de Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinadora de Estudios de Posgrado en Ciencias de la Vida

Resumen de la tesis que presenta **Carla Cristina Uranga Solís** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en microbiología.

Análisis metabolómico del hongo de la madera de vid *Lasiodiplodia theobromae*

Resumen aprobado por:

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Tesis

Los hongos patógenos de la familia Botryosphaeriaceae afectan a una gran variedad de plantas económicamente importantes, tales como *Vitis vinifera* (vid) y *Olea europea* (olivo). Un miembro particularmente virulento de esta familia es *Lasiodiplodia theobromae*. Este hongo, en vid, causa la enfermedad conocida como muerte regresiva por botriosferia y se ha encontrado en más de 500 especies de plantas en todo el mundo. El objetivo de este trabajo fue identificar compuestos producidos por *L. theobromae* en substrato natural y proteínas asociadas a su producción. Usando cromatografía de gases vinculado a espectrometría de masas (CG-MS) se identificaron una variedad de ésteres de ácidos grasos. Varios de estos compuestos tuvieron efectos fisiológicos significativos en la germinación y crecimiento temprano de semillas de *Nicotiana tabacum*. El linoleato de etilo (LAEE), estereato de etilo (SAEE) y el palmitato de etilo (PAEE) a concentraciones altas (de 50-200 µg/mL) inhibieron el crecimiento de plantas de tabaco, mientras que a concentraciones bajas (entre 25 µg/ml-98 ng/mL) indujeron la germinación. Posteriormente, en experimentos usando hidroponía de *N. tabacum* y después de un mes de observación, LAEE y SAEE inhibieron el crecimiento y causaron clorosis; mientras que PAEE indujo el crecimiento, aumentando el tamaño de las hojas verdaderas de plantas de tabaco significativamente con 1 µg/mL de PAEE. El análisis de fragmentación del proteoma del hongo crecido en presencia de aceite de semilla de vid y glucosa identificó varias proteínas potencialmente involucradas en la interacción planta-patógeno; entre las cuales cabe destacar la aril-alcohol deshidrogenasa, (degradadora de lignina) y proteínas involucradas en la fermentación y en adherencia al hospedero. Secuenciación *de novo* reveló varias proteínas novedosas de *L. theobromae*, incluyendo metaloproteinasas de zinc homólogas a las mismas encontradas en veneno de víboras. Son necesarios estudios en el futuro para caracterizar la función de las proteínas identificadas en *L. theobromae* y comprender mejor la interacción planta: patógeno.

Palabras clave: Hongos de madera, CG-MS, LAEE, SAEE, ésteres de ácidos grasos, proteómica

Abstract of the thesis presented by **Carla Cristina Uranga Solís** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences with orientation in microbiology.

Metabolomic analysis of the grapevine trunk disease fungus *Lasiodiplodia theobromae*

Abstract approved by:

Dr. Rufina Hernández Martínez
Thesis Director

Pathogenic fungi from the family Botryosphaeriaceae affect a great variety of economically important plants, such as *Vitis vinifera* (vid) and *Olea europea* (olive). A particularly virulent member of this family is *Lasiodiplodia theobromae*, which is reported in more than 500 plant species throughout the world. In grapevine, this fungus causes the disease known as Botryosphaeriaceae dieback. The objective of this work was to identify small molecules produced by *L. theobromae* in natural substrates and the proteins associated with their production. Using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), a variety of esterified fatty acids were identified. Many of these compounds were found to have significant physiological effects in the germination and early growth of *Nicotiana tabacum*. Ethyl linoleate (LAEE), ethyl stearate (SAEE) and ethyl palmitate (PAEE) inhibited germination and early growth at high concentrations (50-200 µg/mL) but induced growth at low concentrations (between 25 µg/ml-98 ng/mL). In experiments using hydroponics of *N. tabacum*, 1 µg/mL of either LAEE or SAEE inhibited growth and caused chlorosis after one month of growth, whereas 1 µg/mL of PAEE induced growth and significantly increased the size of the first true leaves. Proteomics analysis of *L. theobromae* grown with grapeseed oil and glucose as carbon sources revealed various proteins potentially involved in the plant: pathogen interaction, such as aryl-alcohol dehydrogenase (degrades lignin) and proteins related to fermentation and host adherence processes. *De novo* peptide sequencing also yielded many novel proteins from *L. theobromae*, including zinc metalloproteinases homologous to the same from snake venom. Although additional functional characterization efforts remain to be undertaken for the proteins identified in *L. theobromae*, this work has identified potential new targets for further understanding the plant: host interaction.

Keywords: Trunk disease fungi, GC-MS, LAEE, SAEE, fatty acid esters, proteomics

Dedicatoria

Dedico alegremente esta tesis a mis hijos Samantha, Ansel y Camila, a mi esposo Claudio Espinosa de los Monteros, a mi mamá (QEPD) y a mi familia, mi padre Victor, y mis hermanos Victor Jr., Ana Paola Uranga y Carlos Uranga. También dedico esta tesis a mi familia en México, mis tías Solís, y mis tías Uranga, que siempre han estado allí con su apoyo moral. A mis primos y primas en Chihuahua, que tantos momentos divertidos pasamos en la niñez. A mi querida suegra Teresa Hernández Rodríguez, a Mamá Julia Rodríguez Gálvez y mis lindos cuñados Alejandro, Dolores, Mónica y Diego. Para todos mis sobrinos regados por todo el mundo, son una fuente de alegría para mi. Los amo a todos y gracias con todo mi corazón.

Agradecimientos

Se agradece al CICESE por apoyo económico y administrativo, y al CONACyT (No. de registro 252657) por el apoyo económico otorgado.

Agradezco a UCMEXUS, ya que por ellos se pudo realizar la parte medular de esta tesis en la Universidad de California, San Diego. Muchas gracias al Dr. Michael Burkart y a la Dra. Elizabeth Komives de UCSD por su apoyo incondicional para el programa de UCMEXUS. Estoy muy agradecida con mis co-autores. El Dr. Joris Beld y el Maestro Jeffrey Mindrebo tuvieron un papel muy importante en realizar el GC-MS de muestras, y el Dr. Anthony Mrse de manejar la resonancia magnética nuclear. Gracias al Dr. Iván Córdova Guerrero, que aparte de ser un excelente y atento sinodal, ayudó con materiales para la purificación del compuesto original y la caracterización preliminar de los metabolitos en la UABC-Tijuana. Muchas gracias a la Dra. Irma Soria Mercado por su curso tan informativo de resonancia y espectrometría en el análisis de compuestos desconocidos. Se agradece a la Dra. Meritxell Riquelme-Pérez y su curso divertido e informativo de taxonomía de hongos. Gracias al Dr. Thomas Kretschmar por su apoyo como sinodal y sus críticas. Mil gracias a la Dra. Katrin Quester de Manriquez de la UNAM por su apoyo constante e incondicional durante la elaboración de experimentos críticos y el uso del rotovapor del laboratorio de la UNAM. Gracias al apoyo de la Dra. Quester se logró publicar el primer artículo de esta tesis.

Para la parte proteómica, se le agradece al Dr. Majid Ghassemian, por aceptarme en su curso en UCSD como estudiante externa, aparte de procesar la muestra que le di y que se analizó para esta tesis. Se agradece a mi directora de tesis, la Dra. Rufina Hernández-Martínez por uso de su laboratorio, cepas de hongos, y su apoyo en edición de tesis y artículos. Admiro y respeto sus esfuerzos de diagnóstico de enfermedades de plantas de agricultores de la región de Baja California, México.

Agradezco a mis compañeros del Gimnasio Vital de Ensenada, el mejor gimnasio en el cual he participado en mi vida. Le debo mi salud física y mental al Maestro y coreógrafo Gilberto Aldaco, que con su gran talento y disciplina alegró mis días más difíciles con rutinas de baile Latino, y me dio la oportunidad de bailar en el desfile del Carnaval de Ensenada. Agradezco a mis compañeras de baile y ejercicio, Luz María Garibay, Guillermina Zamora Cebrera, Lina Guzmán, Margarita Islas, Gabriela Cuevas, que juntas hemos pasado muchos momentos divertidos durante el sufrimiento del ejercicio bien hecho.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, Francisco Morales Santos, Edelweiss Rangel Montoya, Marisela Garduño Rosales, Montana Torres Chavez, Candelario Serrano Gómez, y Guimel Muñoz.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes.....	1
1.1.2 Patogenia en hongos fitopatógenos.....	3
1.1.3 Metabolitos secundarios en la patogenia fúngica.....	7
1.1.4 Biología de sistemas y metabolómica.....	11
1.1.5 Proteómica moderna en Botryosphaeriaceae.....	11
1.2 Justificación.....	13
1.3 Hipótesis.....	14
1.4 Objetivos.....	14
1.4.1 Objetivo general	14
1.4.2 Objetivos específicos.....	14

Capítulo 2. Metodología

2.1 Aislados utilizados en este estudio.....	15
2.2 Inducción del metabolismo secundario en cepas de <i>L. theobromae</i>	15
2.3 Extracción de los metabolitos de hongo.....	16
2.4 Espectrometría de masas y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	17
2.5 Esterificación Fischer-Speier de aceite de avena y de semilla de uva.....	17
2.6 CG-MS de extractos crudos de <i>L. theobromae</i>	17
2.7 Secuenciación <i>de novo</i> de péptidos de <i>L. theobromae</i>	18

2.8 Efectos de ésteres de ácidos grasos en la germinación y crecimiento de plántulas de <i>Nicotiana tabacum</i>	20
2.9 Estudio del efecto de ésteres de ácidos grasos en plantas crecidas en hidroponía.....	21
Capítulo 3. Resultados	
3.1 Caracterización química.....	22
3.2 Evaluación de producción de ésteres de ácidos grasos en sustrato definido.....	33
3.3 Germinación de <i>Nicotiana tabacum</i> y crecimiento en ésteres de ácidos grasos.....	40
3.4 Proteómica.....	47
Capítulo 4. Discusión	
4.1 Producción de ésteres de ácidos grasos en <i>L. theobromae</i> y otros hongos.....	68
4.2 Efectos de ésteres de ácidos grasos en planta.....	69
4.3 Proteómica.....	72
Capítulo 5. Conclusiones	75
Literatura citada	77
Anexos	84

Lista de figuras

Figura	Página
1. Síntomas externos observadas en <i>Vitis vinifera</i> y <i>Mangifera indica</i> afectadas con varios miembros de las Botryosphaeriaceae.....	2
2. Estructuras reproductivas en <i>Botryosphaeriaceae</i>	3
3. Cancro típico de Botryosphaeriaceae e invasión del parénquima por hifas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	6
4. Esquema básica de la secuenciación <i>de novo</i> de péptidos con espectrometría de masas.....	12
5. Cromatografía en capa fina (TLC) de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> cepa UCD256Ma.....	22
6. Cromatograma de HPLC preparativo del compuesto de interés.....	23
7. TLC de extracto crudo y compuesto purificado por medio de HPLC y TLC preparativo utilizado para caracterización química.....	24
8. Espectrometría de masas de baja resolución del compuesto de interés purificado.....	25
9. Espectrometría de masas de alta resolución del compuesto de interés.....	26
10. Espectrometría de masas de fragmentación del compuesto purificado.....	27
11. Análisis del compuesto aislado de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H).....	28
12. Análisis del compuesto aislado de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> por resonancia magnética nuclear de carbono (^{13}C).....	29
13. Estructura química caracterizada por resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto de interés aislado de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	30
14. Estructura química revelada por CG-MS y búsqueda en la biblioteca NIST.....	30
15. CG-MS de dos cepas de <i>L. theobromae</i> incubadas en avena y sales de Vogel 60 días.	31
16. Identificación por medio de probabilidades arrojadas por biblioteca NIST, y comparación del patrón de fragmentación en CG-MS.....	32
17. Comparación de producción de ésteres de ácidos grasos producidos por varias especies de hongos	33
18. Efecto de ésteres de ácidos grasos a 0.2 mg/mL encontrados en <i>Lasiodiplodia theobromae</i> durante la germinación de <i>Nicotiana tabacum</i>	40
19. Efecto de ésteres de ácidos grasos en la germinación de tabaco a 0.2 mg/mL en sales Murashige y Skoog.....	41
20. Experimento de germinación de <i>Nicotiana tabacum</i> en ácidos grasos esterificados a 0.1 mg/mL, encontrados en <i>L. theobromae</i>	41

21.	Gradiente de concentración de <i>Nicotiana tabacum</i> germinado en linoleato de etilo (LAEE) y estearato de etilo (SAEE) a concentraciones entre 200 a 3.1 µg/mL.....	42
22.	Gradiente de concentración de de LAEE y SAEE de 3.13 µg/mL- 98 ng/mL para evaluar efecto en la germinación de <i>Nicotiana tabacum</i>	43
23.	Germinación de <i>Nicotiana tabacum</i> en 1 µg/mL AGE para comparar con ácido giberélico (GA), un regulador de crecimiento de plantas conocido.....	44
24.	Morfología de <i>Nicotiana tabacum</i> germinado con 0.2 mg/mL LAEE, SAEE, PAEE o extracto crudo aceitoso de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	45
25.	Plántulas de <i>Nicotiana tabacum</i> crecidas en hidroponía en 1 µg/mL de cada compuesto emulsificado en sales Murashige y Skoog.....	46
26.	Red Cytoscape BiNGO de funciones moleculares enriquecidos en <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	49
27.	Red Cytoscape BiNGO de componentes celulares enriquecidos en <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	50
28.	Representación taxonómica de las 74 proteínas identificadas y validadas con 100% de confianza estadística en <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	51
29.	Distribución taxonómica de péptidos secuenciados <i>de novo</i> de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> utilizando el programa DeNovoGUI.....	67

Lista de tablas

Tabla		Página
1.	Composición de aceite de semilla de uva de varios cultivares de <i>Vitis vinifera</i> de España.....	9
2.	Ésteres de ácidos grasos de cepas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Neofusicoccum parvum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Trichoderma asperellum</i>	35
3.	Promedios de las áreas bajo la curva presentados como porcentajes del total de los compuestos identificados en <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	36
4.	Producción de ésteres de ácidos grasos en <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (MXL28) y <i>Trichoderma asperellum</i> incubado en 5% lecitina y/o glucosa	38
5.	Producción de ésteres de ácidos grasos en <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (MXL28) y <i>Trichoderma asperellum</i> expresado en porcentajes.....	39
6.	Proteínas identificadas como “hipotéticas” por los algoritmos MSGF, X!Tandem, y OMSSA, buscadas manualmente con NCBI-BLAST.....	52
7.	Proteínas novedosas identificadas con una base de datos de Botryosphaeriaceae hasta ahora secuenciadas y depositadas en la base de datos NCBI.....	54
8.	Secuenciación <i>de novo</i> de péptidos de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> y sus homólogos más probables dentro de la base de datos Uniprot entero.....	63

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

En México, se producen 369,951 toneladas de uva al año. En el año 2016 la producción de uva supuso un valor nacional de 5,312,295 pesos (SIAP, 2016). Baja California es uno de los estados que produce mayor cantidad de uva de mesa y vino en México, con un valor anual de 273,568 pesos. En esta zona, existen varios esfuerzos para caracterizar a los hongos patógenos que afectan a la madera de vid, así como también su relación con otras plantas leñosas (Andolfi et al., 2011). Dentro de los hongos de la madera, los de la familia Botryosphaeriaceae son de los más importantes. Algunos miembros de esta familia reportados en viñedos en México son: *Neofusicoccum australe*, *Neofusicoccum vitifusiforme*, *Diplodia corticola*, *Diplodia seriata* y *Lasiodiplodia theobromae* (Candolfi-Arballo, 2009). Los síntomas principales observados en *Vitaceae* en México consisten en canchales necróticos de color café a negro en forma de cuña en los troncos, brazos y cordones, estatura reducida, decaimiento y muerte de la planta (Úrbez-Torres, 2011).

En la actualidad, *L. theobromae* (teleomorfo *Botryosphaeria rhodina*) se ha reportado como la especie más virulenta dentro de las Botryosphaeriaceae. Aparte de la vid, esta especie es capaz de colonizar un rango muy amplio de especies en todo el mundo, incluyendo plantas económicamente importantes como *Hevea brasiliensis* (árbol del hule) (Nghia et al., 2012), *Jatropha curcas* (Borges et al., 2014; Machado y Pereira, 2012) y *Theobromae cacao* (cacao) (Mbenoun et al., 2008), entre otros.

L. theobromae (Reino; Fungi, Phylum; Ascomycota, Clase; Dothideomycetes, Orden; Botryosphaeriales, Familia; Botryosphaeriaceae), es un patógeno latente, responsable de infecciones en una variedad de organismos, incluyendo humanos. En humanos causa una enfermedad conocida como Lasiodiplodiasis, además de keratitis, onicomicosis y úlceras de la córnea y la piel (Papacostas et al., 2015) aparte de neumonía (Woo et al., 2008). En plantas, *L. theobromae* prospera en climas tropicales, afectando principalmente árboles frutales, ocasionando síntomas que reflejan daño y son parte de la descripción patológica de las enfermedades que produce como: “brazo muerto”, “muerte regresiva” y/o “gomosis” (Figura 1). La “muerte regresiva” se considera generalmente como una descripción adecuada para la enfermedad en vid, ya que hasta ahora el síntoma de gomosis sólo se ha encontrado en mango (Khanzada et al., 2005). Sin embargo, se ha descrito momificación de uvas debida a infecciones por *L. theobromae* en algunos casos (Úrbez-Torres et al., 2008). En el árbol de hule (*H. brasiliensis*), *L. theobromae* causa “desangrado” en la corteza, donde la resina de hule se secreta en lesiones causadas por este hongo (Nghia et al., 2012). En el árbol *Jatropha curcas*, *L. theobromae* causa muerte regresiva y síntomas en el tronco

consistentes con los encontrados en *V. vinifera*; adicionalmente, en esta planta causa pudrición de raíz y cuello (Machado y Pereira, 2012).

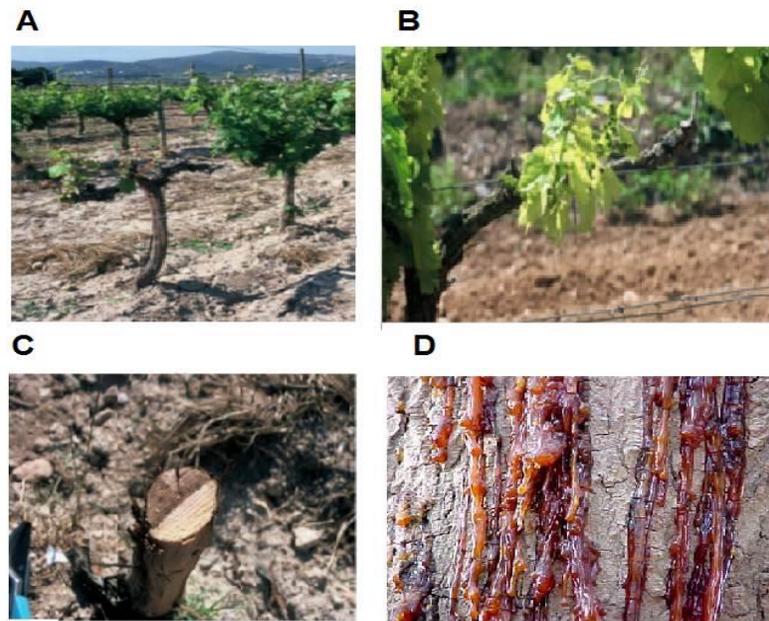


Figura 1. Síntomas externos observadas en *Vitis vinifera* y *Mangifera indica* afectadas por Botryosphaeriaceae. A: Estatura reducida en vid. B: clorosis foliar en vid. C: canchros en forma de cuña en el tronco en vid. D: gomosis en el tronco de un árbol de mango (*Mangifera indica*) infectado por *Lasiodiplodia theobromae*. (A, B, y C; Adaptado de Andolfi et al. (2011), D: adaptado de Kahnzada et al.(2004).

La infección por *L. theobromae* ocurre a través de lesiones en la planta, principalmente en las lesiones formadas como resultado de la poda o injertos. Sin embargo, también se ha reportado la propagación del hongo por medio de semillas en coníferas (Cilliers, 1993); así también en semillas del árbol *Jatropha curcas* (Machado y Pereira, 2012). Hasta ahora no se ha descrito la formación de un apesorio en este hongo. De acuerdo a estudios del flujo genético entre cepas obtenidas de diferentes continentes, *L. theobromae* se originó en México (Mohali et al., 2005). Estudios genéticos de cepas de *L. theobromae* aisladas en México, Sudáfrica y Venezuela con marcadores moleculares (microsatélites) han indicado que esta especie es clonal, es decir, se reproduce asexualmente (Mohali et al., 2005). Hasta ahora no se ha observado un estado teleomórfico (sexual). Los conidios asexuales maduros son pigmentados, con estrías, y emergen de picnidios (Figura 2). En Australia, se observó que ciertas cepas de *L. theobromae* son más virulentas que otras, pero no se sabe la razón (Úrbez-Torres, 2011). Adicionalmente, cabe mencionar que ciertas cepas de vid demuestran niveles diferentes de resistencia a *L. theobromae* (Úrbez-Torres, 2011).

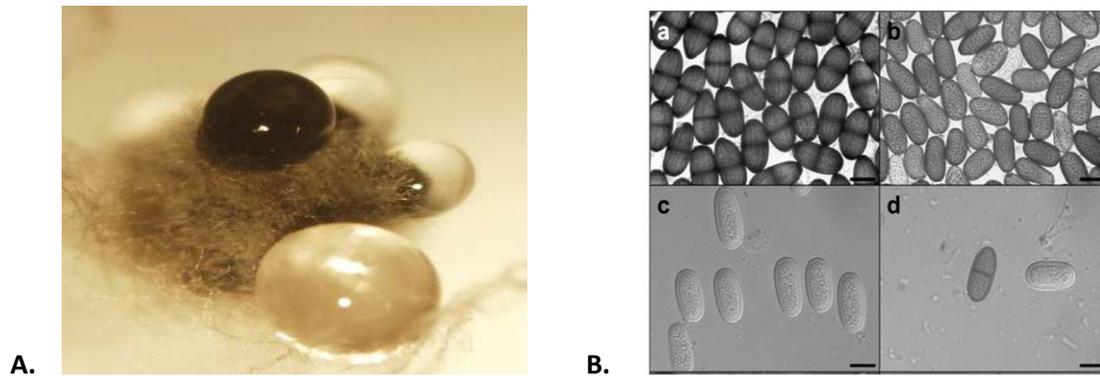


Figura 2. Estructuras reproductivas en *Botryosphaeriaceae*. A: Picnidios de *Lasiodiplodia theobromae* (teleomorfo *Botryosphaeria rhodina*) con gotación (este trabajo). B: Conidios típicos de *Lasiodiplodia theobromae* (Úrbez-Torres et al., 2006).

1.1.2 Patogenia en hongos fitopatógenos

Aunque se ha estudiado por muchos años, la patogenia es un concepto parcialmente comprendido en los hongos fitopatógenos; recientemente se está empezando a crear una idea más completa con estudios de biología molecular y bioquímicos. Se sabe que los hongos son organismos que dependen del medio ambiente para sobrevivir, y su metabolismo es absorptivo. Por ello, poseen una cantidad de proteínas, péptidos, y compuestos para modificar el hábitat, dentro de una planta o un animal. Las enzimas le sirven para degradar substratos del hospedero y así nutrirse. Un ejemplo de ellas son las proteínas modificadoras de polisacáridos como las β -glucanasas, reportadas como factores de patogenia en el patógeno de trigo *Pyrenophora tritici-repentis* (Fu et al., 2013). Por otro lado, hay hongos benéficos para las plantas, como son varias especies de *Trichoderma* spp. (de los Santos-Villalobos et al., 2013) que no matan a la planta, sino que al contrario, benefician su crecimiento. En el caso de *Trichoderma* spp., estos hongos protegen a la planta de otros hongos fitopatógenos (Benítez et al., 2004), y existen varios productos en el mercado que consisten en esporas de este género de hongos para aplicar a los jardines o sembradíos. En el caso de las micorrizas, colonizan las raíces de la planta y nutren a la planta con nitrógeno y minerales (Bonfante and Genre, 2010). La pregunta de ¿qué diferencia un hongo fitopatógeno de uno benéfico? es fundamental en la bioquímica de hongos.

L. theobromae entra en la vid (*V. vinifera*), y otras plantas por medio de heridas en las ramas producidas por prácticas agrícolas comunes, como la poda y los injertos (Úrbez-Torres et al., 2008). En heridas de

poda, quedan expuestos varios sustratos que le permiten al hongo colonizar efectivamente. Estos incluyen una variedad de compuestos, como el almidón de almacenamiento y los lípidos, tanto estructurales (de membranas plasmáticas) como de almacenamiento, los cuales se localizan en cuerpos lipídicos en la planta (Shimada et al., 2014; White et al., 2006). Las lipasas son enzimas degradadoras de ácidos grasos, y están establecidas como factores de virulencia en hongos (Gaillardin, 2010). Las lipasas participan en uno de los primeros pasos metabólicos en el metabolismo de los ácidos grasos exógenos. Las lipasas hidrolizan (rompen) los enlaces éster entre los ácidos grasos vinculados a los ácidos grasos estructurales (fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, o fosfatidiletanolamina, en el caso de las membranas plasmáticas, o, vinculados al glicerol (triglicéridos) en el caso de los ácidos grasos de almacenamiento.

Aunque el proceso de colonización del hongo *L. theobromae* es poco comprendido, algunos de los síntomas observados en plantas infectadas con Botryosphaeriaceae son clorosis foliar, necrosis, gomosis y reducción de estatura. La gomosis consiste en una combinación de exudado compuesto de gomas o resinas producidas por las plantas y exopolisacáridos producidos por el hongo (Mbenoun et al., 2008). Esto es evidente en los síntomas observados en el árbol de hule, donde se observa una secreción se observa en el tronco (Úrbez-Torres y Gubler, 2009; Nghia et al., 2012). También se ha observado una secreción gomosa en árboles de mango, pero no macroscópicamente en vid (Khanzada et al., 2005). Esta secreción de resinas resulta de árboles que producen moléculas de tipo terpenos, como es el caso del hule, los cuales son parte de los mecanismos bioquímicos de defensa de la planta.

El desarrollo de síntomas es un proceso poco comprendido en toda planta reportada como susceptible a *L. theobromae*. Los síntomas varían, dependiendo de las defensas que tenga la planta infectada para lidiar con el hongo, y la habilidad del hongo de evadir o descomponer bioquímicamente esas defensas. La habilidad de detectar la fase latente y/o endofítica en las Botryosphaeriaceae se ha considerado imperativa para agricultores que cultivan árboles frutales (Czemmel et al., 2015), para prevenir así que se propague el hongo por medio de la poda y el injertamiento. Czemmel y colaboradores (2015) han reportado que la fase latente de la Botryosphaeriaceae *Neofusicoccum parvum* es de 1.5 a 2 meses, determinado después de haber inoculado plantas de vid artificialmente y recuperado el patógeno a 2 cm de distancia del punto de inoculación. Czemmel et al. (2015) reportan inclusive a través de estudios de detección de transcritos de ARN (RNA-seq) de la planta, ciertos marcadores de la planta que pudieran servir como marcadores de infección en la fase latente. En cuanto a funciones moleculares (categoría importante dentro del análisis de ontología genética de datos de secuenciación masiva) de los transcritos

detectados de la planta activadas frente a la infección de *N. parvum* por Czermel et al. (2015), la adherencia fue la más representada en el estudio de Czermel et al. (2015).

A diferencia de otros árboles frutales, en vid las especies de Botryosphaeriaceae causan síntomas que incluyen muerte de cordones, yemas, formación de canchros necróticos, estatura reducida, y menor formación y momificación de uvas; sin embargo, es difícil deducir por estos síntomas a la enfermedad, ya que se ha demostrado que los hongos *Cylindrocarpon* spp. causan lesiones muy similares en vid en la enfermedad de “pie negro” (Halleen et al., 2006). Por otro lado, los síntomas internos consisten en lesiones cafés o negras, estriadas, y necrosis en forma de cuña (Figura 3). Estas lesiones necróticas en forma de cuña son características de las Botryosphaeriaceae (Andolfi et al., 2011), pero tampoco son determinantes, ya que varias especies de Diatrypaceae producen el mismo síntoma (*Eutypella*, *Eutypa*, *Diatrype*, etc.) (Mayorquin et al., 2016).

Durante un proceso infeccioso, las Botryosphaeriaceae extienden su micelio a través de las ramas, seguido por extensión al tronco, lo cual resulta en lesiones negras o café oscuro en el tejido y el bloqueo eventual del tejido vascular. Este bloqueo del sistema vascular de la planta resulta en la deshidratación del tronco y/o ramas, y contribuye a la muerte de la planta (Czermel et al., 2015). Las Botryosphaeriaceae producen amilasas y otras enzimas, para poder asimilar el almidón y otros biopolímeros en los rayos del xilema y el parénquima (Halleen et al., 2006). *L. theobromae* se observa en el xilema, extendiéndose radialmente, rompiendo paredes y membranas celulares entre rayos, las cuales son columnas de células parenquimales encargadas de mover agua radialmente desde la médula hacia el tronco, a 90 grados del movimiento de agua que se mueve verticalmente a través del xilema (Myburg et al., 2013), formando canchros en forma de cuña de color café a negro. Los rayos también se encargan de transportar resinas hacia la médula y el xilema, rellenando así el xilema muerto formando la madera (“Wood,” 2017). En árboles de nuez de la India de Brasil, utilizando microscopía, se demostró la presencia de *L. theobromae* adentro de los haces vasculares, como también se demostró que el hongo se extiende en el xilema secundario y el parénquima del xilema, acompañado por la desintegración de la pared celular y la membrana plasmática (Muñiz et al., 2011). Este patrón de infección ocurre porque el parénquima y el xilema, ambos localizados entre los rayos, contienen una gran cantidad de depósitos de almidón, un substrato muy importante para *L. theobromae*, y otros hongos fitopatógenos, ya que es una fuente principal de glucosa, y las membranas plasmáticas del parénquima fuente de fosfolípidos. Algo similar se confirmó que ocurre en vid como consecuencia de la infección de *N. parvum* (Czermel et al., 2015), donde se detectó al hongo

primariamente en el xilema de vid, acompañado por una reducción de gránulos de almidón en el xilema y en los rayos del xilema.

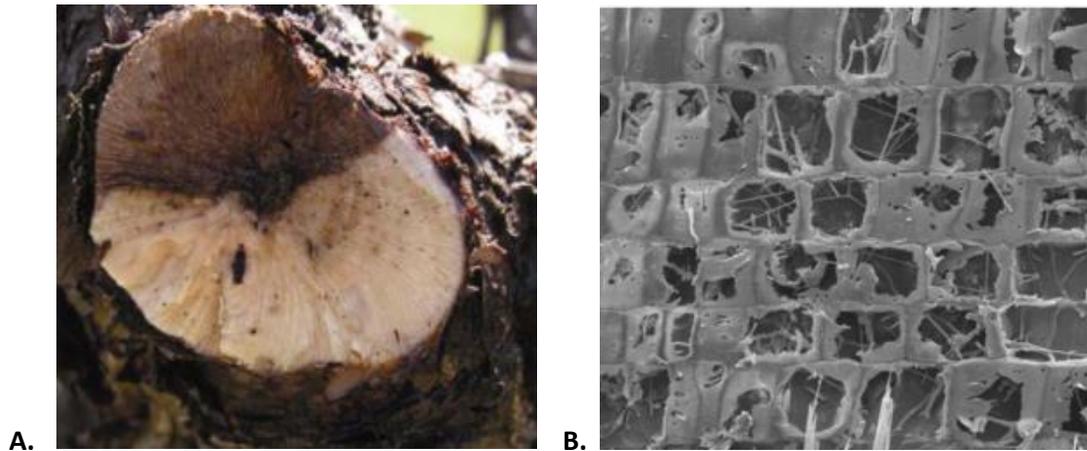


Figura 3. Cancro típico de Botryosphaeriaceae e invasión del parénquima por hifas de *Lasiodiplodia theobromae*. **A;** Imágen de sección de tronco de vid con síntoma emblemática (cancro necrótico) de enfermedad de madera causada por Botryosphaeriaceae (Úrbez-Torres et al., 2008). **B;** Imágen de microscopía electrónica de barrido de *Lasiodiplodia theobromae* invadiendo y degradando el parénquima del árbol nuez de la India (Muniz et al., 2011).

La necrosis, otro síntoma de infección por *L. theobromae*, se puede observar en una gran cantidad de plantas, y puede ser causada por estrés abiótico y biótico. La necrosis en plantas es una muerte desordenada, y se tipifica con disfunción mitocondrial y permeabilización de la membrana mitocondrial, lo cual resulta en mitocondrias hinchadas, diferenciando anatómicamente la necrosis de la muerte celular vacuolar (Minina et al., 2013). Esto resulta en pérdida de formación de ATP, el cual es catastrófico para la célula. Se sabe poco del mecanismo utilizado por *L. theobromae* para inducir necrosis en la planta, sin embargo, las membranas plasmáticas tienen un papel importante en este proceso, especialmente las membranas de la mitocondrias.

1.1.3 Metabolitos secundarios involucrados en la patogenia fúngica

Existen otros factores de patogenia de tipo “molécula pequeña”, o “metabolito secundario”, cuyo potencial merece estudios detallados. Estos pueden surgir a través de la producción de compuestos *de novo*, como también de la modificación de substratos exógenos. Dentro de éstos, en los hongos se incluyen los terpenos, alcaloides, péptidos no-ribosomales y oxilipinas. En cuanto a metabolitos secundarios conocidos en las Botryosphaeriaceae, las meleínas se han reportado como una de las toxinas principales de esta familia de hongos (Andolfi et al., 2011), y pertenecen al tipo policétidos. Algunos otros metabolitos secundarios de *L. theobromae* conocidos incluyen el Taxol (de tipo terpeno), el cual es una molécula que interviene con la polimerización y despolimerización de microtúbulos (Pandi et al., 2011). En *L. theobromae*, también se ha encontrado el ácido jasmónico (AJ), un compuesto aromático de tipo oxilipina, que es regulador de crecimiento y varios otros procesos metabólicos en las plantas (Dhandhukia y Thakkar, 2007; Jernerén et al., 2012).

La síntesis de metabolitos secundarios tiene lugar a través de varias rutas metabólicas. Entre éstas, la ruta mediada por las proteínas llamadas sintasas de policétidos (PKS, por sus siglas en inglés), es una de las más importantes, y aún no caracterizadas en *L. theobromae*. Aunque existen diferentes tipos de enzimas PKS, su función básica consiste en la condensación tipo Claisen de moléculas de acetil-CoA o malonil-CoA, derivados de la glucólisis y la modificación del piruvato en la mitocondria. Esta síntesis es muy parecida a la síntesis de ácidos grasos (Keller et al., 2005), porque se agregan unidades de acetil CoA a una molécula que se va modificando de varias maneras, ya sea ciclando, reduciendo, etc. Cabe mencionar que también se encuentran genes codificantes del mismo tipo de en el genoma de plantas (Flores-Sanchez y Verpoorte, 2009).

En contraste, los terpenos, como el Taxol (un diterpeno) se sintetizan a partir de unidades de pirofosfato de isopentenilo y pirofosfato de dimetilalilo (Lin et al., 2014). Los metabolitos de tipo terpeno tienen en común con los policétidos, que el acetil-CoA es el precursor de todos los pasos subsecuentes, involucrando el metabolismo de ácidos grasos en el metabolismo secundario (Schmidt-Dannert, 2015).

El otro tipo de metabolitos secundarios son los péptidos no-ribosomales (NRP, por sus siglas en inglés). Dentro de este tipo de moléculas se incluyen el inmunosupresor ciclosporina y antibióticos como la vancomicina (Felnagle et al., 2008). Estos compuestos se sintetizan a partir de ciertos aminoácidos, mediante la acción de las “sintasas de péptidos no-ribosomales”, o NRPS por sus siglas en inglés. Su síntesis no requiere de ARN mensajero, sino de módulos enzimáticos que se encargan de unir aminoácidos por medio de una condensación de tipo transamidación. Se pueden utilizar todos los aminoácidos, así

como también aminoácidos no-canónicos (no proteicos) incluyendo los aminoácidos “D”, y la ornitina (Walsh et al., 2013). Un grupo importante de NRP son los sideróforos. Estos compuestos son indispensables para los hongos filamentosos, ya que se encargan de unir hierro (Fe^{3+}) en el medioambiente y utilizarlo para funciones enzimáticas básicas, cruciales para el crecimiento, como la síntesis de ADN. Aunque las bacterias también los producen, y existen varios tipos, en hongos sólo han encontrado sideróforos de tipo hidroxamato (Holzberg y Artis, 1983). No se han reportado estudios sobre los sideróforos de *L. theobromae* u otra Botryosphaeriaceae.

El metabolismo secundario depende del substrato, como ha sido demostrado en otros hongos; por ejemplo, *Aspergillus terreus*, produce la droga anti-colesterol Lovastatin[®], de tipo policétido, usando como fuentes de carbono el glicerol, el almidón o la lactosa (Jia et al., 2009). Las plantas tienen varios substratos para los hongos, que pueden ser modificados o degradados, y utilizados como fuentes de energía. Pero, ¿cómo se utilizan para producir metabolitos secundarios? Para comprender mejor cómo modifican o degradan los compuestos los hongos fitopatógenos, existen esfuerzos para estudiar el fenotipo químico de cada planta, ya que éste puede variar según la especie. Siendo que algunos cultivares de vid demuestran susceptibilidad diferencial ante las Botryosphaeriaceae, (Úrbez-Torres, 2011), este esfuerzo es importante para comprender los aspectos bioquímicos detrás de la susceptibilidad. Existen compuestos encontrados en todas las plantas que se pueden estudiar para intentar comprender cómo los modifica cada hongo. Uno de los substratos más abundantes y mejor estudiados en las plantas son los ácidos grasos, como reportados por Pardo y colaboradores (2009) en cultivos de vid de España (Tabla 1) (Pardo et al., 2009). Estos estudios consisten en realizar reacciones de esterificación de Fischer (Fischer y Speier, 1895) a los lípidos extraídos de muestras de plantas, incubándolos con ácido sulfúrico a temperaturas altas (100°C), y con un alcohol, siendo el más común el metanol. En esta reacción se forman ésteres metílicos de ácidos grasos que se pueden detectar y cuantificar por medio de CG-MS.

Tabla 1. Composición de aceite de semilla de uva de varios cultivares de *Vitis vinifera* de España (Pardo et al., 2009).

Ácido graso [%]	Monastrell†	Monastrell‡	Garnacha Tintorera‡	Petit Verdot‡	Syrah‡
Mirístico, 14:0	0.05 ^{ab}	00.4 ^b	00.8 ^a	0.07 ^{ab}	0.06 ^{ab}
Palmítico, 16:0	8.03 ^b	7.86 ^b	8.47 ^b	9.19 ^a	7.95 ^b
Esteárico, 18:0	5.87 ^a	5.75 ^a	4.60 ^b	4.70 ^b	4.42 ^b
Araquídico, 20:0	0.21 ^a	0.21 ^a	0.15 ^b	0.18 ^{ab}	0.17 ^{ab}
Oléico, 18:1	18.40 ^c	18.43 ^c	24.88 ^a	16.07 ^d	21.84 ^b
Linoléico, 18:2	66.84 ^b	67.11 ^b	60.94 ^d	69.16 ^a	64.53 ^b
Linolénico, 18:3	0.32 ^c	0.36 ^c	8.46 ^b	0.45 ^b	0.64 ^a

†Secado con aire caliente (50 °C por 6 h).

‡Secado a tiempo ambiente (20 °C por 7 días).

a,b,c

Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencias significativas ($p < 0.05$) utilizando la prueba Duncan.

Como es evidente, en vid existen diferencias significativas entre los cultivares en cuanto a composición y cantidad de ácidos grasos (Tabla 1). Se puede detectar un patrón de porcentajes para cada tipo de ácido graso en cada cultivar. Es evidente que el ácido graso más abundante en la planta de vid es el ácido linoléico, seguido por los ácidos oléico, palmítico y esteárico. En cuanto a la composición en el tronco, Vivin y colaboradores (Vivin et al., 2003) determinaron que el 20 mg/g del peso total de tronco de vid consiste en lípidos, mientras que en las hojas varía entre 30-50 mg/g.

Los lípidos son moléculas de suma importancia en todos los organismos. Se encuentran en todos los grupos taxonómicos, inclusive en ciertos tipos de virus. En plantas, las membranas plasmáticas contienen fosfolípidos, mientras que los lípidos de almacenamiento encontrados en cuerpos lipídicos (van der Schoot et al., 2011) son triglicéridos. La membrana plasmática le da a la planta la habilidad de detectar estrés de todo tipo. Varias proteínas membranales se encargan de mediar rutas de señalización importantes (Geisler et al., 2013). Inclusive, el tráfico y biosíntesis de lípidos es un proceso de defensa que le ayuda a la planta a sobrevivir desbalances de agua en el medioambiente (Gigon et al., 2004). En *Arabidopsis thaliana*, la falta de agua causa un aumento de ácidos grasos insaturados en la membrana plasmática (Gigon et al., 2004). En cuanto al efecto del estrés debido a temperaturas altas, se observa una reducción de ácidos grasos insaturados, así como un aumento de triglicéridos (Higashi et al., 2015). Estas diferencias pueden

estar determinando la manera en que los hongos metabolizan estos ácidos grasos, y su modificación de rutas de señalización de las plantas.

Hasta ahora no se sabe si el almidón o los lípidos son el sustrato más importante para el hongo. Se ha descubierto que *L. theobromae* produce el compuesto lipídico ácido jasmónico (AJ) (anteriormente mencionado como un compuesto de tipo oxilipina), con función de regulador de crecimiento y de metabolismo secundario de la planta. Este compuesto es también producido por plantas. *L. theobromae* produce el AJ *de novo* por medio de una ruta de síntesis de ácidos grasos (Tsukada et al., 2010), muy similar a la ruta en plantas. Tanto en plantas como en hongos, la producción del AJ se inicia con el ácido α -linoléico. La respuesta al AJ en la planta es una de las más importantes y conocidas, debido a su habilidad de provocar varios efectos, incluyendo respuestas a las heridas, y al estrés “abiótico y biótico”, los cuales resultan en expresión de genes que sintetizan aún más ácido jasmónico en la planta (Keller et al., 2005). Se encontró que el AJ y el jasmonato de metilo estimulan la producción de estilbenos (por ejemplo el resveratrol) en *V. vinifera* (Curtin et al., 2003), los cuales poseen actividad antifúngica y presentan otras actividades biológicas importantes. El AJ también induce la producción de antocianinas con la convergencia de la ruta de fenilpropanoides (ácido shikímico) y la ruta del ácido acético, los que finalmente producen antocianinos por medio de la chalcona sintasa (CHS), una sintasa de policétidos de tipo III encontrada en la planta.

Se postula que la producción de AJ por *L. theobromae* resulta en falta de resistencia sistémica adquirida (SAR por sus siglas en inglés) en la planta, ya que ocasiona deficiencia en la producción del ácido salicílico (AS) (Dhandhukia y Thakkar, 2007). Como el AJ se considera una oxilipina, es importante considerar los ácidos grasos exógenos (del hospedero), tanto estructurales y aquellos de almacenamiento, como sustratos importantes para *L. theobromae* en la producción de metabolitos secundarios como el AJ u otros compuestos anteriormente mencionados. Los ácidos grasos se descomponen en general por la ruta de β -oxidación en peroxisomas y glioxisomas, los cuales son específicos a las plantas y a los hongos. El producto final es el acetil-CoA, (Hynes et al., 2006) que es el bloque principal de construcción de los metabolitos secundarios de tipo policétido y de tipo terpeno. El ácido linoléico es sustrato para varios hongos fitopatógenos, y considerando la abundancia de éste en *V. vinifera* (Tabla 1), es probable que también se utilice por ellos para producir una variedad de sustancias con actividad fisiológica en la planta. Por ejemplo, se sabe que *Aspergillus* spp. produce oxilipinas provenientes de los ácidos oléico, linoléico y linolénico (Tsitsigiannis y Keller, 2007). La pregunta principal de este trabajo es, siendo que los hongos

fitopatógenos son organismos que se nutren por absorción, ¿cómo metabolizan o modifican los substratos de las plantas, o en el caso de *L. theobromae*, los substratos de plantas y humanos?

1.1.4 Biología de sistemas y metabolómica

Para comprender el metabolismo de los organismos, existe un campo relativamente nuevo conocido como biología de sistemas y metabolómica. Los organismos vivos son bioquímicamente complejos, y la idea de este campo es obtener una perspectiva “holística” de los componentes expresados o producidos en algún estado metabólico, y establecer la relación entre el genotipo y el fenotipo (Yurkovich y Palsson, 2016), usando múltiples sistemas de análisis. Con la tecnología actual, se pueden obtener datos de varios procesos biológicos dentro de un contexto experimental, por ejemplo, información de los transcritos del ácido ribonucleico (ARN) y/o las proteínas producidas bajo condiciones de interés, como también los metabolitos producidos, para así correlacionar la producción de, por ejemplo, metabolitos, con las proteínas expresadas durante su producción, y determinar candidatos proteicos que participan en la síntesis de metabolitos de interés.

1.1.5 Proteómica moderna en Botryosphaeriaceae

Sólo se ha caracterizado el proteoma parcial de un miembro de las Botryosphaeriaceae, *Diplodia seriata* (Cobos et al., 2010) observándose que la producción de proteínas depende del substrato, dado que utilizando SDS-PAGE de dos dimensiones (2D), se encontraron diferencias significativas en los niveles y la naturaleza de las proteínas extraídas del secretoma del organismo cultivado en medio Czapek con o sin la adición de carboximetilcelulosa (Cobos et al., 2010). Inclusive, se identificaron factores necróticos proteicos. El proteoma de *L. theobromae* o de otra Botryosphaeriaceae aún no se ha caracterizado.

Actualmente, la tecnología de la proteómica disponible incluye técnicas de secuenciación *de novo* de todas las proteínas provenientes de una muestra biológica; esto se realiza por medio de digestión (usualmente con tripsina) seguido por separación en una columna cromatográfica de fase en reversa (normalmente por medio de ultra HPLC y una columna cromatográfica de C-18), seguido por ionización en electrospray, y detección de péptidos y fragmentación de éstos en un espectrómetro de masas, ayudado por disociación inducida por colisión, o CID (por sus siglas en inglés). Existen otros tipos de fragmentación, como la inducida por transferencia de electrones (ETD por sus siglas en inglés). En CID, los enlaces peptídicos se

rompen, generando fragmentos con masa y carga detectados y transformados a una serie de “picos” que corresponden a la masa sobre carga de iones de varios tipos; sin embargo, los iones “y” y los iones “b” (Figura 4) son los de interés, siendo éstos, productos de la ruptura de enlaces peptídicos, los mejores estudiados y caracterizados.

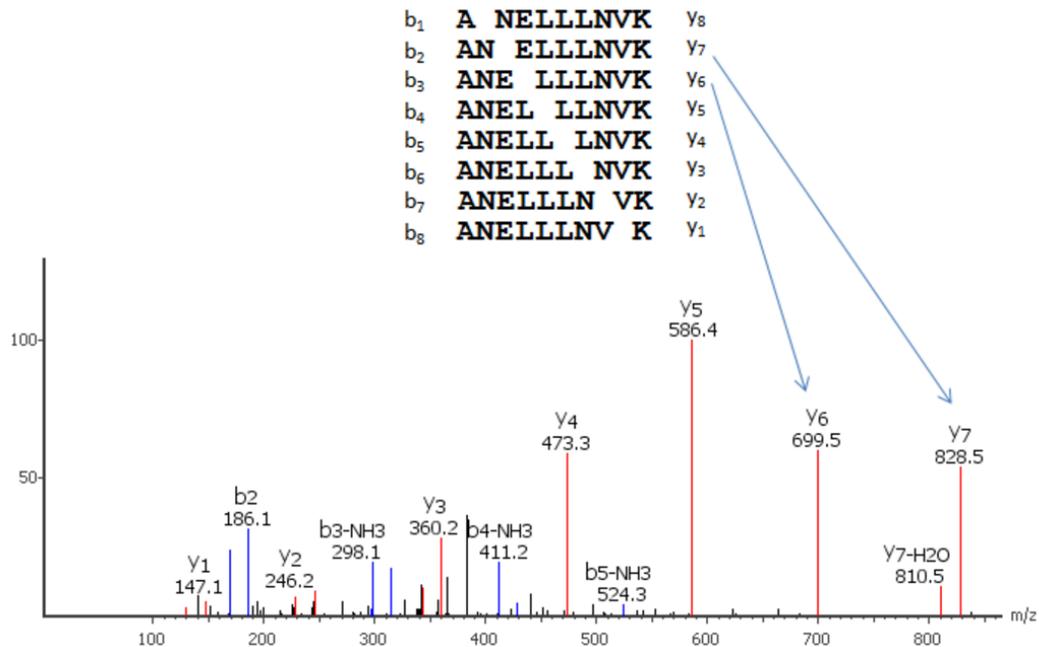


Figura 4. Esquema básico de la secuenciación *de novo* de péptidos. En MS/MS CID (disociación inducida por colisión), varias copias del mismo péptido se fragmentan, creando iones “b” y “y”. El espectro contiene picos correspondiendo a la proporción masa a carga (m/z) de los iones fragmentados (Zhang et al., 2012).

En cuanto algoritmos y métodos bioinformáticos, existen dos maneras de identificar proteínas dentro de una muestra. Uno de estos métodos es la identificación de proteínas por medio de digestión *in silico* de las proteínas en una base de datos, generando espectros teóricos “perfectos” para cada péptido de la proteína. Los espectros de la muestra desconocida se compara con cada espectro teórico de la base de datos y se obtiene una probabilidad que algún espectro de la muestra encaja con un espectro teórico de la base de datos. Existen varios algoritmos que realizan este tipo de “análisis de fragmentación dependiente de base de datos”, y los de libre acceso incluyen el X! Tandem, OMSSA, MSGF Plus, etc. Este método depende totalmente de la base de datos utilizada para predecir e identificar proteínas dentro de una muestra. Sin embargo, esta forma de identificar proteínas asume que el organismo en cuestión está

secuenciado. Siendo que la mayoría de los hongos no están secuenciados, e inclusive el genoma de *L. theobromae* aun no se secuencía ni se anota, existe otra estrategia de secuenciación de péptidos *de novo*, donde se toma en cuenta la masa y carga de cada ion detectado para producir la secuencia más probable a base de los fragmentos detectados. Estas secuencias luego se buscan por medio de BLAST y se identifican a base de homología con otras proteínas, arrojando un “E-valor” que habla de la probabilidad de que se encuentre un péptido con la misma secuencia en la base de datos de secuencias.

Hoy en día, con tecnología proteómica se pueden detectar péptidos de baja abundancia en muestras biológicas, para obtener un panorama del proteoma más completo (Liu et al., 2014). Las herramientas bioinformáticas permiten analizar el proteoma y las modificaciones postraduccionales de una muestra de proteínas, para mejor comprender cuestiones metabólicas básicas; por ejemplo, las proteínas producidas durante el metabolismo de la glucosa y/o lípidos por *L. theobromae*. La proteómica es útil por varias razones. Aparte de poder estudiar la expresión diferencial de genes, sirve para esfuerzos de anotación de genes nuevos. Por medio de la identificación y búsquedas de homología en bases de datos, se pueden obtener pistas del funcionamiento de una variedad de proteínas no anotadas o caracterizadas, esfuerzo importante para comprender el metabolismo de los hongos y para fortalecer las bases de datos bioinformáticas.

1.2 Justificación

Aunque se han identificado varios metabolitos en especies de Botryosphaeriaceae, aún falta trabajo para caracterizar la gama completa de metabolitos secundarios producidos por *L. theobromae* y conocer su inducción en diferentes substratos. Siendo compuestos con actividad fisiológica en plantas y en vertebrados, los metabolitos secundarios de hongos en general no se conocen en su totalidad, y menos su inducción, en *L. theobromae* no se han caracterizado en cuanto a sus efectos en plantas. El proteoma de *L. theobromae* es desconocido, sería de gran utilidad conocerlo para descubrir biomarcadores que se puedan utilizar para encontrar nuevos blancos para desarrollo de antifúngicos, diagnosticar infecciones de este hongo, y entender la conservación de secuencias proteicas entre grupos taxonómicos. Inclusive, la proteómica sirve para determinar rutas metabólicas activas dentro del contexto de producción de metabolitos secundarios.

1.3 Hipótesis

Los hongos de la familia Botryosphaeriaceae utilizan lípidos expuestos en las heridas de poda de las plantas como sustrato para producir metabolitos secundarios con actividad fisiológica.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Caracterizar metabolitos secundarios bioactivos producidos por *Lasiodiplodia theobromae* con actividad fisiológica, evaluar su efecto en plantas y caracterizar el proteoma expresado durante la producción de dichos metabolitos.

1.4.2 Objetivos específicos:

- 1) Aislar y caracterizar estructuralmente al menos un metabolito secundario producido por *L. theobromae*
- 2) Evaluar el efecto de algún metabolito secundario aislado de *L. theobromae* en plantas.
- 3) Relacionar el proteoma de *L. theobromae* con la producción de metabolitos secundarios.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Aislados utilizados en este estudio

Dos cepas fueron donadas por el Dr. Douglas Gubler de la Universidad de California, Davis (USA): *L. theobromae* UCD256Ma (aislado en Madera County, California, USA); (Úrbez-Torres et al., 2006) y una cepa de *N. parvum*, (UCD646So, aislado en Sonoma County). Otras cepas utilizadas que pertenecen al CICESE en México son: *L. theobromae* MXL28, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y *Trichoderma asperellum*, aislados de vid, tomate y clavel, de la región de Baja California, respectivamente.

2.2 Inducción del metabolismo secundario en cepas de *L. theobromae*

El medio usado para inducir el metabolismo secundario de los aislados de *L. theobromae* consistió en 25 g de avena molida (Quaker) en 50 mL solución de sales de Vogel (Vogel, 1956) (Anexo 7), esterilizado dos veces en autoclave para asegurar esterilidad del substrato y evitar contaminación por otros microorganismos. Cada cepa se inoculó con 1 disco micelial de 1 cm del hongo crecido en PDA.

Como control negativo, se utilizó avena sin hongo que se preparó junto con las muestras experimentales. Se hicieron tres réplicas biológicas tanto del control negativo, como de las muestras inoculadas. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente, en oscuridad, por un total de 60 días. Para estudiar la producción de compuestos de interés en diferentes fuentes de carbono, las cepas se inocularon en 50 mL de medio mínimo de Vogel suplementado con glucosa al 5%, aceite de semilla de uva al 5%, glucosa al 5% + aceite de semilla de uva al 5% y, fructosa al 5%. Todas las muestras se prepararon por triplicado y se incubaron 20 días a 25°C en la oscuridad.

Se incluyeron experimentos en donde se utilizó lecitina de soya (Fearn Lecithin Granules) al 5% y glucosa al 5% en medio mínimo MM9 (3.3 mM K₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8.6 mM NaCl, 12.5 mM NH₄NO₃, pH 5.9) para obtener datos sobre la producción de ésteres de ácidos grasos de lípidos estructurales. Para obtener datos de la composición de ácidos grasos en *L. theobromae* se incubó en medio mínimo suplementado con glucosa al 5% por 20 días, por triplicado, para después extraer y esterificar los lípidos (esterificación Fischer) con metanol. Otra condición incluida es la variación del tiempo, donde se realizó la incubación por 35 días. Se incluyó un control positivo de lecitina sola esterificada de la misma manera con metanol.

2.3 Extracción de los metabolitos fúngicos

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se congelaron completas, incluyendo el micelio entero y el medio de cultivo (secretoma) a -80°C y se liofilizaron en tubos de 50 mL, a -50°C por 48-72 horas. Para la extracción de metabolitos, se hizo una extracción Folch modificada (Folch et al., 1957). Para ello se agregó una mezcla de 75 mL diclorometano (DCM), 75 mL metanol e hidroxitolueno butilado al 0.01% (como antioxidante) a la muestra liofilizada y se extrajo por 12 h a 4°C . Posteriormente, para separar y recolectar cada fase líquida, las muestras se pasaron a un embudo de separación. Las fases orgánicas (DCM) se evaporaron con un rotovapor (Buchi R-114) a baja presión a 45°C y el extracto se alicuotó en tubos Eppendorf que se almacenaron a -20°C hasta su análisis. El material sólido remanente tras la extracción Folch de las tres réplicas biológicas de *L. theobromae* incubadas en la combinación de glucosa al 5% y aceite de semilla de uva al 5% se recolectó y usó para extraer proteínas y hacer secuenciación *de novo* como se describe abajo.

Para la pre-purificación y purificación de compuestos de los extractos crudos de cada incubación, se monitoreó la producción de los compuestos de interés usando cromatografía de capa fina (TLC por sus siglas en inglés) usando hojas de gel de sílice (Merck) con un indicador fluorescente. Los cromatogramas se desarrollaron con acetato de etilo (EtOAc) al 5% (v/v) en hexano, con dos corridas consecutivas. Los cromatogramas se tiñeron con solución de vainillina al 3% en H_2SO_4 (95 mL etanol, 3 g vainillina, 1.5 mL H_2SO_4 concentrado). El extracto se separó sobre gel de sílice en columna (Unisil) utilizando eluciones en pasos consistiendo en 0, 5, y 10% EtOAc en hexano. Las fracciones con los compuestos de interés eluyeron en hexano al 100%, y se evaporaron y re-fraccionaron en cromatografía preparativa de alta resolución utilizando una columna C-18 (Phenomenex) y usando como solvente A agua destilada con 0.1% ácido fórmico, y como solvente B acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico. El compuesto de interés eluyó con acetonitrilo al 0.1% y ácido fórmico al 100%, lo que se recolectó, evaporó, y re-purificó utilizando cromatografía en placa preparativa de fase normal (placa de sílice) en una mezcla de solventes de EtOAc al 1% en hexano. El compuesto puro, monitoreado con cromatografía de capa fina, se utilizó para análisis de espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN) y carbono (^{13}C RMN) y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-MS).

2.4 Espectrometría de masas y Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Para determinar el peso y la fórmula molecular del compuesto purificado, se utilizó la técnica de espectrometría de masas de alta resolución en un equipo Agilent 6230 ESI-TOF MS. La $^1\text{HMRN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ se realizaron en un equipo Varian de 500 MHz equipado con una sonda para frío Xsens de 2 canales, para la observación directa de ^{13}C . Los datos se analizaron con el programa ACD/NMR processor Academic Edition (ACD Labs, 2010). Para obtener más información sobre características del compuesto por fragmentación, se utilizó un espectrómetro de masas Thermo LCQ-Deca, con un cuadrupolo para atrapar iones, y así seleccionarlos para fragmentación.

2.5 Esterificación Fischer-Speier de aceite de avena y de semilla de uva

Una vez conocida la estructura molecular del compuesto se hizo una esterificación Fischer-Speier (Fischer y Speier, 1895) del aceite de avena extraído del control negativo por medio de extracción Folch, y de aceite de semilla de uva. Para esto, 2.5 mL de cada aceite se mezclaron con 1 mL de etanol o metanol, se les agregaron cinco gotas de H_2SO_4 como catalizador y las muestras se calentaron a 100°C por 30 minutos en frascos de vidrio sellados. Para neutralizar el ácido, se agregó una solución de bicarbonato de sodio saturado, y las fases se recolectaron y analizaron por medio de CG-MS. Para obtener datos de la composición natural de ácidos grasos producidos por *L. theobromae*, se realizó la extracción Folch de cada las tres muestras incubadas en medio mínimo suplementado con glucosa al 5% por 20 días. Los lípidos extraídos se esterificaron con metanol para análisis subsecuente de CG-MS.

2.6 Cromatografía de gases-espectrometría de masas de extractos crudos

Todas las muestras, incluyendo los controles positivos, se analizaron por ésteres de ácidos grasos producidos naturalmente por medio de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS). Utilizando éster etílico de 9, 12-octadecadienoato (Z, Z) (LAEE por sus siglas en inglés) (Cayman Chemical), se preparó una curva estándar de LAEE, de donde se obtuvo las concentraciones de las muestras. El estándar se diluyó de 625 mg/L a 40 mg/L en hexano. Se disolvieron 10 μL de las muestras (sin esterificar) en 1 mL hexano y se analizaron por medio de GC-MS en un equipo Agilent 7890A GC, conectado a un espectrómetro de masas con un cuadrupolo 5975C VL MSD (Impacto de electrones), utilizando helio como gas acarreador y una columna DB23 de 60 metros, con un gradiente de 110°C a 200°C a $15^\circ\text{C}/\text{min}$ seguido por 20 minutos a 200°C y 20 minutos a 240°C . Todos los compuestos se identificaron en la biblioteca NIST. En este análisis se utilizó una con co-inyección de un estándar de una mezcla de 37 ácidos grasos metilados "37 FAME mix" (Sigma-Aldrich). Los ésteres LAEE, (Z)-9-éster etílico de oleato (OAEE), éster

etílico de estearato (SAEE) y ésteretílico de palmitato (PAEE) se compraron como estándares purificados en la compañía Cayman Chemical (USA).

2.7 Secuenciación *de novo* de proteínas

Para determinar la aplicabilidad de una extracción Folch en la proteómica, se realizó una secuenciación *de novo*. Se recolectó el material sólido remanente de la extracción Folch de las tres réplicas biológicas de *L. theobromae* incubado en glucosa al 5% y aceite de semilla de uva al 5%. Se hizo un conjunto de porciones tomando 0.5 g del material sólido de cada réplica y se analizó por medio de espectrometría de masas en la Universidad de California, San Diego. El procesamiento se realizó como se describe a continuación. Los sólidos obtenidos después de la extracción Folch se secaron bajo nitrógeno y fueron re-suspendidos en amortiguador Tris (50 mM), pH 8.00. Se agregó acetonitrilo a una concentración final de 10%. Las muestras se hirvieron 5 min y se enfriaron a tiempo ambiente. TCEP (Tris (2-carboxetil fosfina) se agregó para obtener una concentración final de 1 mM. Las muestras se incubaron a 37°C por 30 min. Después, se carboximetilaron las muestras con 0.5 mg/ml of iodoacetamida por 30 min a 37°C en la obscuridad, seguido por neutralización con TCEP a 2 mM (concentración final). Las muestras se hirvieron de nuevo 10 min y se digirieron con la proteasa tripsina, agregando un ratio de 1:100 de tripsina:proteína (Pierce™ Trypsin Protease, MS Grade Catalog number: 90057 con especificidad K, R). Después de digerir 12 horas, las muestras se centrifugaron en una microcentrifugadora a velocidad máxima (15000 rpm) 10 minutos para remover la fracción insoluble. A la fracción soluble se le agregaron ácido fórmico para obtener una concentración final de 0.2% , y acetonitrilo a una concentración final de 5%. Los péptidos se purificaron utilizando una extracción de fase sólida con C-18 (Thermo Scientific, PI-87782) como descrito en las instrucciones del producto.

La ionización se realizó por medio de un espectrómetro de masas TripleTOF5600 (ABSCIEX) híbrido, acoplado a un UPLC de fase en reversa (Waters corporation nano ACQUITY) utilizando un capilar de vidrio, con grosor de 75 µM y longitud de 20 cm, con esferas CSH™ (Waters Corporation) de 2.5 µM de C-18. Los péptidos se eluyeron de la columna de C18 usando un gradiente lineal (5–80%) de acetonitrilo (ACN por sus siglas en inglés) con un flujo de 250 µL/min por 1h. Los amortiguadores utilizados para el gradiente fueron: Amortiguador A: 98% H₂O, 2% ACN, 0.1% ácido fórmico y 0.005% ácido trifluoroacético (TFA por sus siglas en inglés) y Amortiguador B: 100% ACN, 0.1% ácido fórmico y 0.005% TFA. Los datos de MS/MS se obtuvieron de una manera dependiente de datos, donde los espectros de MS1 se adquirieron por 250 milisegundos a m/z (masa entre carga de los iones) de 400-1,250 Da. Los datos de MS/MS se adquirieron

dentro de un rango m/z de 50-2,000 Da. Los parámetros para adquisición independiente de datos (IDA) fueron: Un tiempo de adquisición MS1-TOF de 250 milisegundos, seguido por 50 eventos de MS2 de 48 milisegundos de adquisición para cada evento. El umbral establecido para comenzar el evento MS2 se fijó en 150 conteos, cuando el ion tenía cargas de +2, +3 and +4. El tiempo de exclusión de iones se estableció en 4 segundos. La fragmentación utilizada fue HCD (fragmentación inducida por colisión con radiofrecuencias de frecuencia alta).

Las proteínas se identificaron primeramente por medio de análisis de fragmentación dependiente de la base de datos entera de Uniprot por medio de varios algoritmos diferentes, con el programa de libre acceso SearchGUI (Vaudel et al., 2011), el cual reúne varios algoritmos, aparte de validar los datos contundentemente con análisis estadísticos y filtros de datos. Los algoritmos utilizados en este trabajo fueron MSGF Plus (Kim y Pevzner, 2014), X!Tandem (Craig y Beavis, 2004), Comet (Eng et al., 2013) y/o OMSSA (Geer et al., 2004). Los datos crudos y procesados se depositaron en la base de datos Pride (Vizcaino et al., 2016), con el identificador PXD003253. Ya secuenciados los péptidos, se utilizó la base de datos Uniprot (The UniProt Consortium, 2015) para realizar una búsqueda de homólogos anotados. Como criterio para identificar proteínas, se escogió una tasa de menos de 1% (<0.01) de descubrimientos falsos (FDR por sus siglas en inglés para False Discovery Rate), aparte de otros medidores como el $-10\log P$, el cual es el p-valor arrojado por el algoritmo expresado de una manera mas entendible, es decir, el p-valor expresa los valores más pequeños como los de alta significancia. El valor $-10\log P$ es una transformación del p-valor, lo cual invierte la relación de significancia, entre más grande el valor $-10\log P$, más significativa la identificación. El criterio de identificar proteínas con ≥ 2 péptidos únicos se respetó para escoger y proponer proteínas para experimentos subsecuentes, por ejemplo para clonación y caracterización bioquímica; para el estudio de ontología genética se utilizaron los resultados del programa SearchGUI, y se utilizaron proteínas identificadas con ≥ 2 péptidos únicos a la proteína, aunque el criterio establecido para identificación de proteínas con contundencia (Zhang et al., 2015) está cambiando para incluir proteínas identificadas con ≥ 1 péptido único. Se escogió el criterio de ≥ 2 péptidos únicos porque aún no esta disponible la secuencia genómica de *L. theobromae*, y para tener la óptima confianza en las proteínas identificadas.

Una vez identificados homólogos de los péptidos en la muestra de *L. theobromae*, se realizó un análisis de ontología genética, enfocada en las categorías de enriquecimiento de funciones moleculares y localización celular de las proteínas. Se utilizó el programa Cytoscape BINGO (Maere et al., 2005), el cual utiliza una prueba hipergeométrica para identificar las funciones moleculares o localizaciones celulares más

representadas en una muestra. Las bases de datos de ontología genética se bajaron del Gene Ontology Consortium (Ashburner et al., 2000) para evaluar la ontología de las proteínas identificadas de *L. theobromae*. Se evaluó la base de datos de ontología de Uniprot (Swissprot) completa, para estudiar la conservación entre especies y taxa de proteínas identificadas, como también de una base de datos del hongo *Saccharomyces cerevisiae*, y de la levadura patógena de humanos *Candida albicans*.

Para secuenciación *de novo* de los péptidos, se utilizó el programa DeNovo GUI (versión 1.14.5), con los algoritmos Novor (Ma, 2015) y PepNovo (Frank and Pevzner, 2005). Los parametros de error de medición de masas se establecieron para el precursor, 10 ppm, y para los fragmentos, una tolerancia de 0.5 Da. Las modificaciones pos-traduccionales se establecieron en carbamidometilación de cisteínas como fijas, y oxidación de metionina como la variable. Todos los péptidos arrojados por los algoritmos se buscaron entre la base de datos completa e Uniprot utilizando el programa BLASTp (Camacho et al., 2009), y se reporta el homólogo con el E-valor o “E-value” más bajo, es decir, la secuencia más parecida a la secuencia de cada péptido secuenciado de *L. theobromae*. Estos datos también se analizaron para enriquecimiento ontológico como anteriormente mencionado, con el programa Cytoscape BiNGO.

2.8 Efectos de AGE en la germinación de semillas de tabaco y crecimiento de plántulas

Con el fin de probar el efecto de los compuestos identificados *in planta*, se escogió *Nicotiana tabacum*, un modelo de plantas ampliamente utilizado (Sierra et al., 2014). Primero, 200 µg/mL de LAEE, PA, PAEE, OAEE y SAEE se emulsificaron en 0.08% de kolliphor P-188 (Sigma-Aldrich). Los compuestos emulsificados se agregaron a sales Murashige y Skoog con vitaminas Gamborg (MS), agar al 0.8%, sacarosa al 3% y el compuesto antifúngico PPM (Plant Preservative Mix de Plant Cell Technology Inc.). Sobre este medio, se colocaron aproximadamente 100 µL de semillas de *N. tabacum* previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 50% por un minuto, seguido por 3 lavados con agua destilada estéril. Para cada compuesto se hicieron tres réplicas biológicas independientes.

La longitud de la plántula, medida desde la punta del cotiledón hasta la punta de la raíz se midió 7-10 días después. Para ello se tomaron fotos con un microscopio Olympus calibrado (SZX12) a magnificación 7x, utilizando el programa Image J (Rasband, 2015). Todos los experimentos se realizaron por triplicado, bajo

luz natural, midiendo por cada réplica 30 plántulas (N=30). La morfología se evaluó a los 45 días después de la germinación.

El efecto de la concentración se estudió en MS + sacarosa al 3%, utilizando un rango de concentración “alto” de 200 µg/mL a 3.1 µg/mL para LAEE y de 100 µg/mL a 3.1 µg/mL para SAEE, por triplicado. También, se probó un rango de concentración más bajo para estos compuestos de 3.1 µg/mL a 98 ng/mL para SAEE y LAEE, por triplicado. En todos los casos, se incluyeron controles negativos. Para evaluar el efecto de los compuestos mencionados anteriormente en la germinación de las semillas de tabaco, se usó MS sin sacarosa y 1 µg/mL de cada AGE; como control positivo se incluyó al regulador de plantas ácido giberélico, (GA “Supergrow” de Consolidated Chemical). Este experimento se repitió usando MS con sacarosa al 3%.

Un video de lapso de tiempo se grabó durante la germinación de *N. tabacum* expuesto a 98 ng/mL SAEE bajo luz continua con la aplicación Lapse It 2.5 pro, y se puede encontrar en la versión electrónica del artículo producto de esta tesis (C. C. C. Uranga et al., 2016).

2.9 Estudio del efecto de AGE en plantas crecidas por hidroponía

Plantas de *N. tabacum* se crecieron por hidroponía, sobre perlita. La solución nutrimental consistió en sales de Murashige y Skoog, y 0.08% kolliphor p-188 suplementado con 1 µg/mL de cada éster de ácido graso. Se incluyó un control negativo sin AGE como también un control positivo con ácido giberélico a 1 µg/mL. Se realizó un ANOVA de una vía seguido por una prueba *post-hoc* Tukey-HSD para los datos, con p-valores <0.05 considerados significativos, utilizando el programa estadístico XLSTAT y/o Graphpad Prism y/o “R”. Las gráficas se generaron con el programa Graphpad Prism.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización química

El análisis preliminar por cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés) de la extracción aceitosa de *L. theobromae* incubado en avena, mostró una mancha color verde azulado oscura, que reveló con el reactivo de vainillina/H₂SO₄. El compuesto identificado estuvo presente en las tres réplicas biológicas incubadas con *L. theobromae* y ausente en los controles negativos (Figura 5).

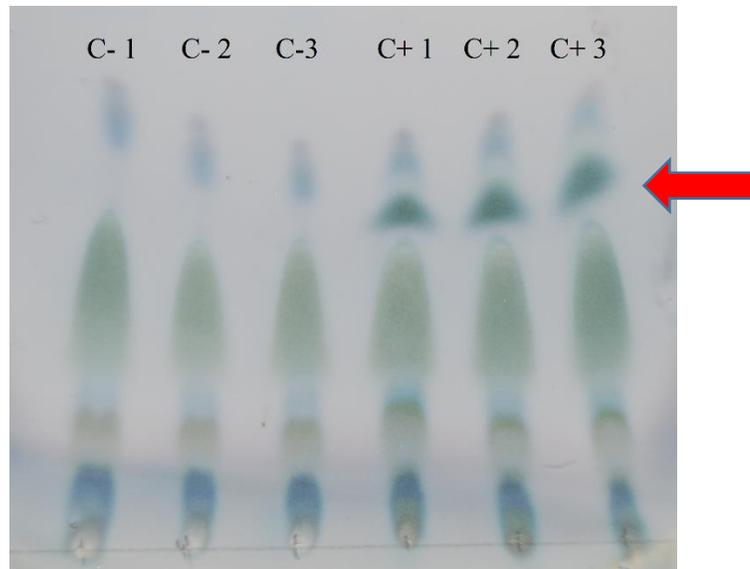


Figura 5. Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos de tres réplicas biológicas de controles negativos (avena sola) y de avena incubada con *L. theobromae* cepa UCD256Ma. El compuesto de interés se escogió con base en su producción en presencia de *L. theobromae*, y se señala con una flecha roja.

En la purificación del compuesto, el extracto crudo se pasó a través de una columna de gel de sílice, la fracción conteniendo el compuesto de interés se concentró por medio de un rotovapor a presión reducida. Su separación se logró utilizando HPLC preparativo, con una columna de C-18 (Figura 6). Este producto presentó una señal con la longitud de onda de 230 nm, indicando la ausencia de alta conjugación de dobles enlaces.

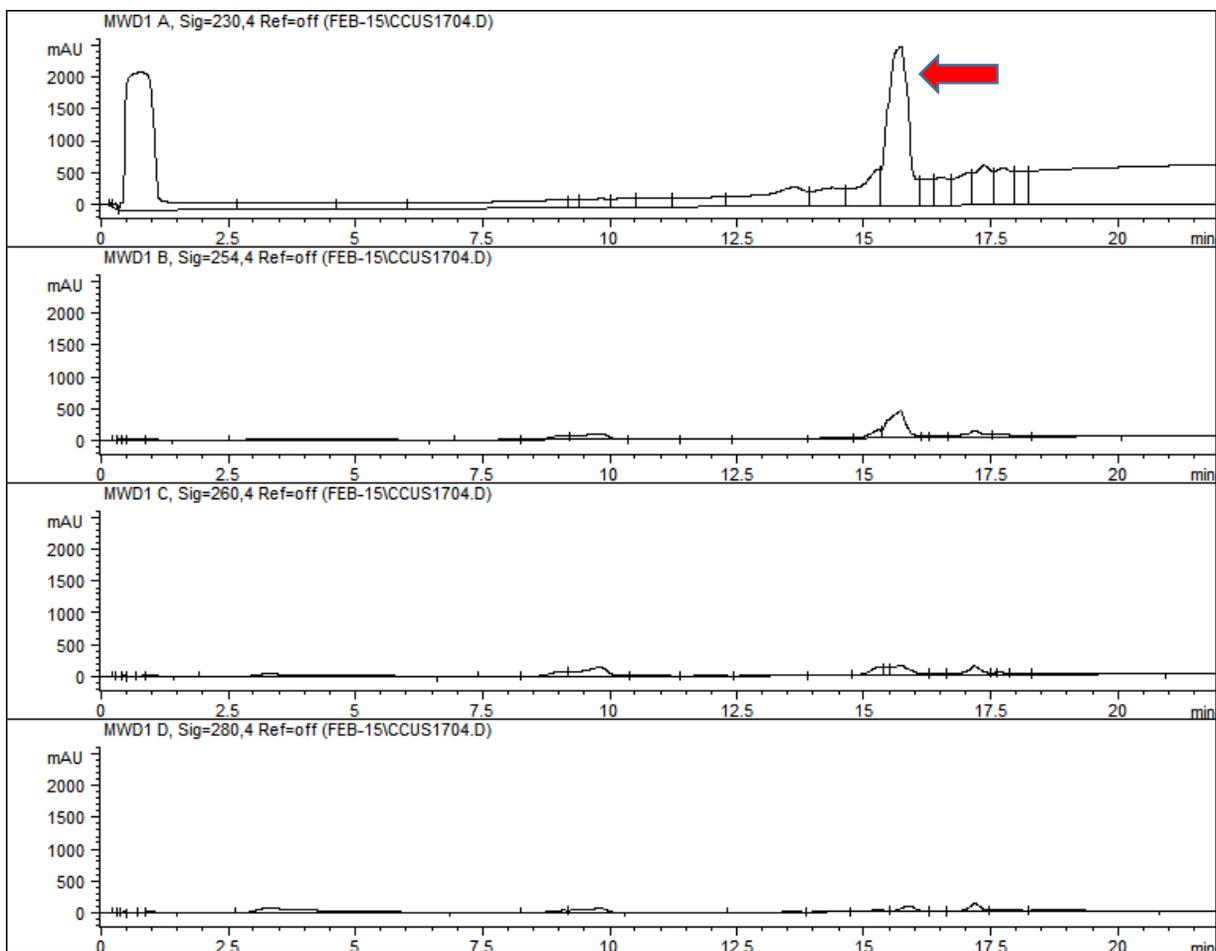


Figura 6. Cromatograma de HPLC preparativo del compuesto de interés. El compuesto de interés eluyó en 15.3-16 minutos, con el pico de interés señalado con una flecha roja.

La fracción de interés se recolectó y se purificó mediante una placa preparativa con gel de sílice como la fase estacionaria. Se utilizó el agente cromogénico (vainillina/ H_2SO_4), aplicándolo solamente a la orilla de la placa, para revelar el compuesto de interés sin descomponer todo el compuesto (Figura 7). Finalmente el producto puro obtenido se llevó a su respectiva caracterización estructural.

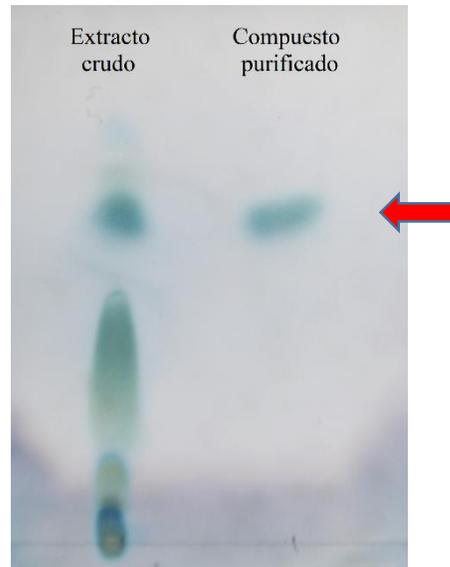


Figura 7. TLC del extracto crudo y compuesto puro señalado con flecha roja.

La espectrometría de masas de baja resolución mostró una relativa alta pureza, con dos picos visibles (Figura 8). Utilizando el programa mMass (Niedermeyer y Strohm, 2012), se estableció que el pico de mayor intensidad representa un aducto amoniacal del otro pico (m/z 309.278, M+H). Al determinar la diferencia numérica de la masa entre (16.95 Da), se pudo establecer que el peso molecular del compuesto de interés es de 308.21 Da.

11-P-30-a #76-83 RT: 1.66-1.81 AV: 8 SB: 4 0.06-0.12 NL: 7.84E6
T: + c Full ms [100.00-1500.00]

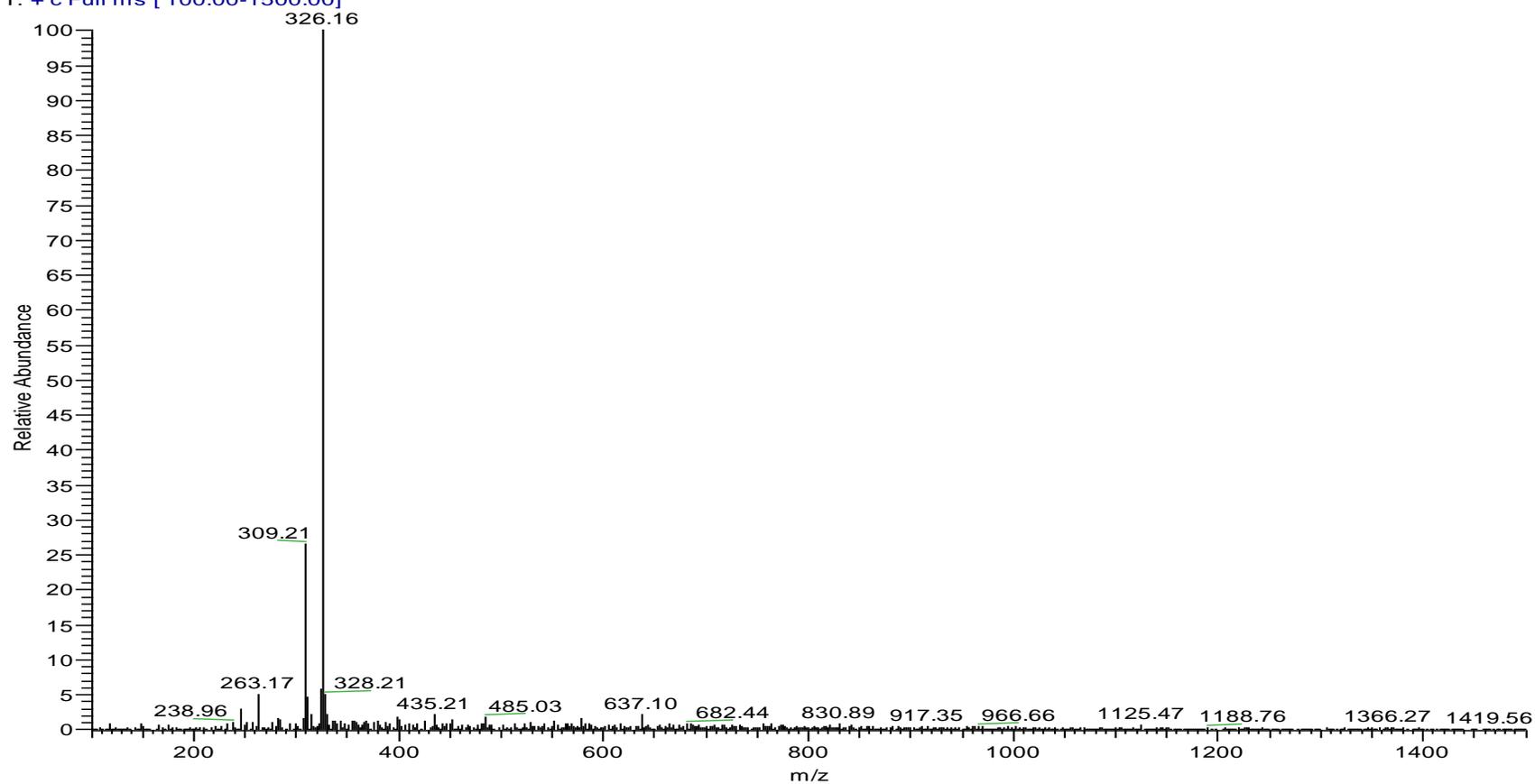
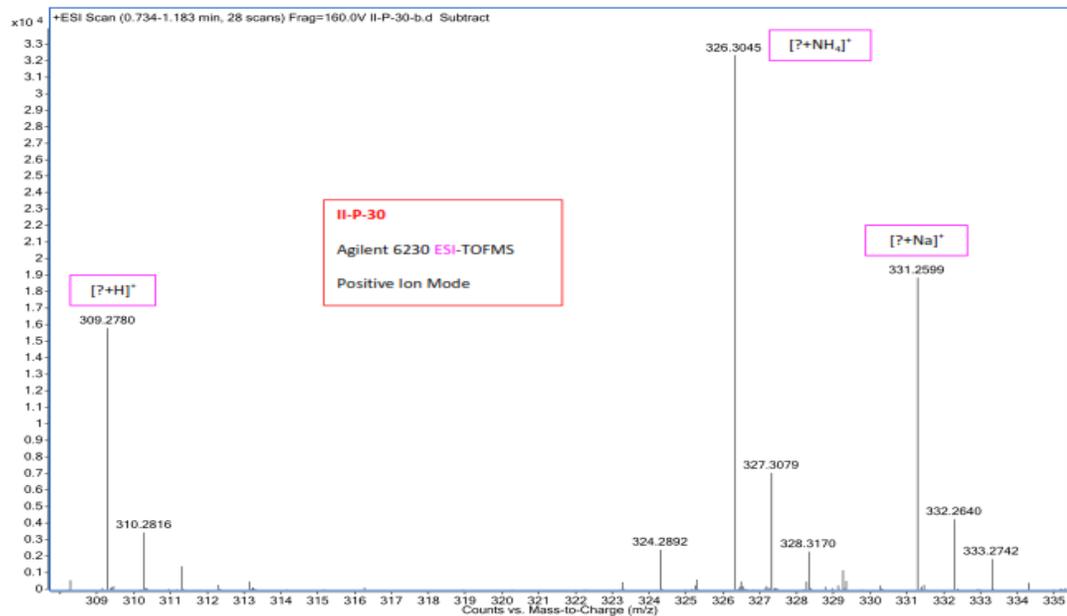


Figura 8. Espectro de masas de baja resolución del compuesto de interés puro. Se detectaron dos picos a: 309.21 m/z y 326.16 m/z. La diferencia en masa entre ellos (16.95 Da) indica un aducto NH_3 en el compuesto de interés.

Con el espectro de masas de alta resolución se detectaron tres picos diferentes, correspondientes al compuesto de interés con aductos iónicos que consisten en sodio (Na^+) o amonio (NH_4^+). El programa Mass Hunter (Agilent®) arrojó dos fórmulas moleculares para el ion $\text{M}+\text{H}$ a 331.2599 m/z . Esta masa corresponde al compuesto con un aducto de sodio, ya que la diferencia entre este pico y el peso del compuesto equivale a 23 Da, el peso del sodio. La fórmula más probable, según este programa, es $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}$, con un Δppm de 1.5. La otra fórmula molecular probable es $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$, con un Δppm de -2 (Figura 9 y 10).



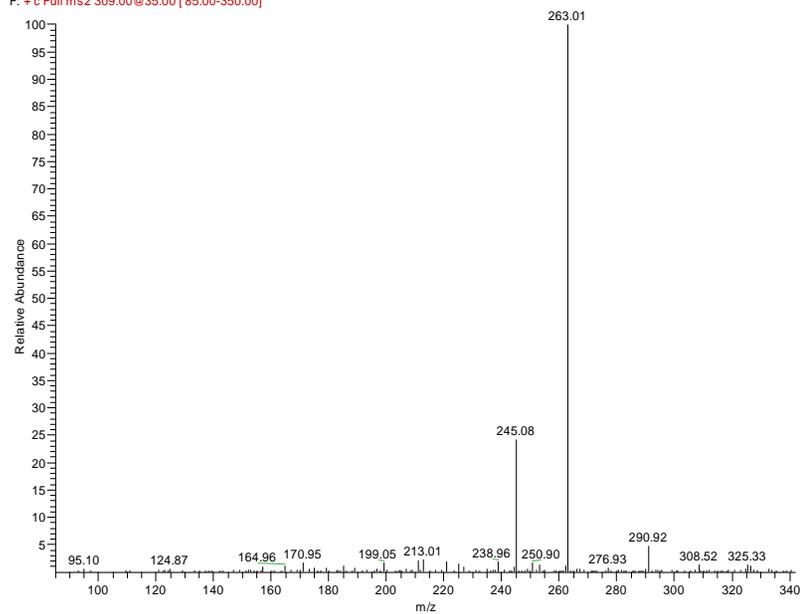
Search Results: Sample II-P-30

Mass Measured	Theo. Mass	Delta (ppm)	Composition
331.2599	331.2594	1.5	$[\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O Na}]^+$
331.2599	331.2608	-2.7	$[\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2 \text{Na}]^+$

Figura 9. Espectro de masas de alta resolución del compuesto de interés. Se detectaron tres picos en la muestra que representan el mismo compuesto con aductos diferentes, como el sodio (Na^+) y amonio (NH_4^+). El programa Mass Hunter de Agilent arrojó dos fórmulas moleculares diferentes posibles para el peso molecular del compuesto con un sodio como aducto.

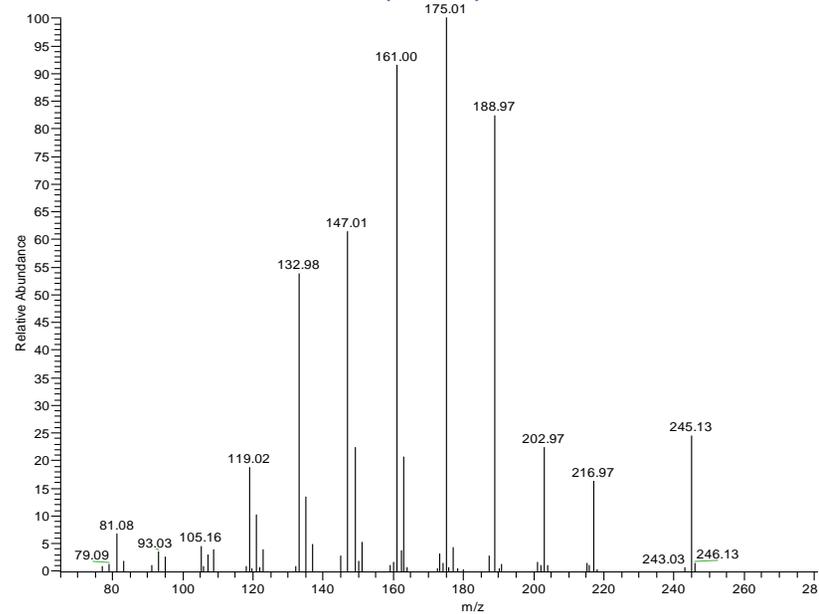
El patrón de fragmentación del pico de 309.278 m/z se encuentra en la Figura 10. La fragmentación MS/MS/MS/MS (Figura 10B) del fragmento 245 m/z demuestra una pérdida ordenada de grupos metilénicos ($-\text{CH}_2$), característico de un compuesto lipídico. La $^1\text{HRMN}$ indica que las señales con desplazamientos 0.5- 1.5 ppm con características de sistemas alifáticos, probablemente correspondan a un producto de tipo biopolímero (Figura 11).

11-P-30-a #167-171 RT: 2.15-2.25 AV: 5 NL: 2.61E5
 F: + c Full ms2 309.00@35.00 [85.00-350.00]



A.

11-P-30-a #223-248 RT: 3.90-4.49 AV: 26 NL: 1.00E4
 T: + c Full ms4 309.00@35.00 263.00@35.00 245.00@35.00 [65.00-300.00]



B.

Figura 10. Espectro de masas del compuesto purificado. A; Fragmentación MS/MS del pico de 309.278 m/z mostrando dos fragmentos de 245.08 m/z y 263.01 m/z. B; Fragmentación MS/MS/MS/MS del pico a 245 m/z de (A). Picos con m/z 216.97 a 119.02 difieren en ~14 Da, indicando pérdida ordenada de CH₂ potencialmente debido a un lípido.

¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.89 (t, J=1.00 Hz, 3 H), 1.27 (t, J=1.00 Hz, 3 H), 1.28 - 1.40 (m, 14 H), 1.62 (t, J=1.00 Hz, 2 H), 2.06 (q, J=6.85 Hz, 4 H), 2.29 (t, J=7 Hz, 2 H), 2.78 (t, J=6.72 Hz, 2 H), 4.13 (q, J=7.09 Hz, 2 H), 5.28 - 5.45 (m, 3 H)

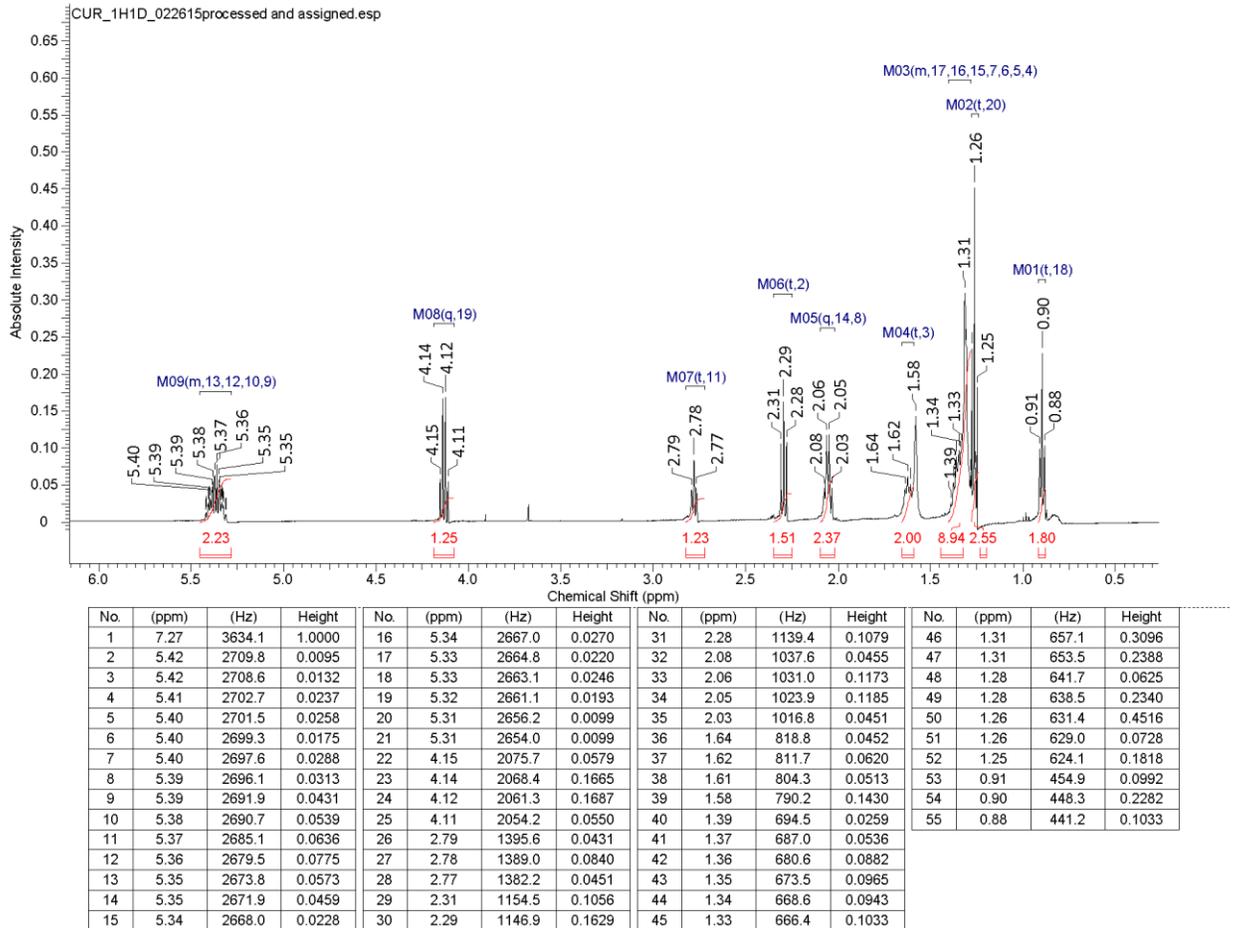


Figura 11. Análisis del compuesto aislado de *Lasiodiplodia theobromae* por espectrometría de resonancia magnética nuclear de protones (¹HRMN).

Las señales más representativas en la caracterización del compuesto LAEE, fueron un multiplete a 5.37 ppm y el cuarteto 4.13 ppm. Este último atribuible al carbono 19 (Figuras 11, 13), ya que se encuentra desplazado a campo bajo por la desprotección magnética de los oxígenos de la función éster del compuesto. El multiplete a 5.7 ppm se asigna a protones olefínicos, cuyas señales se encuentran traslapadas. Esta señal corresponde a los protones en carbonos 9, 10, 12, y 13, los cuales están acoplados entre sí, pero también a los protones 8, 11, y 14, lo cual causa el multiplete complejo observado. La constante de acoplamiento calculada para estos hidrógenos fue un promedio de $J=6$ Hz, un valor característico de protones con disposición espacial tipo *cis*, ya que los valores observados para los hidrógenos *trans* son mayores de 11 Hz (Pretsch et al., 2010).

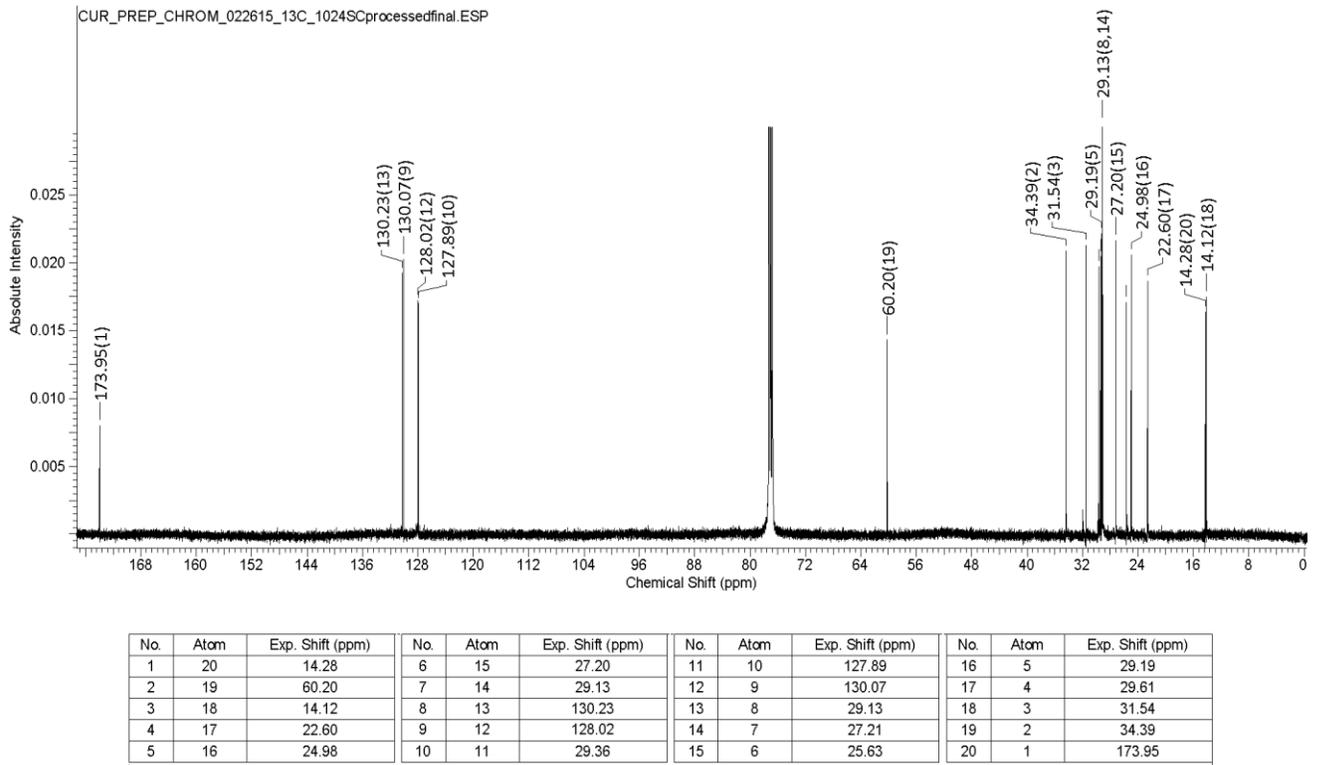


Figure 12. Análisis estructural por resonancia magnética nuclear de (^{13}C RMN) del linoleato de etilo (LAEE) aislado de *Lasiodiplodia theobromae*.

El espectro de carbono también reveló señales importantes para determinar que es un ácido graso de cadena larga. Los carbonos que constituyen los dobles enlaces, se encuentran en el espectro con desplazamientos entre 127.9-130.2 ppm (C-9, C-10, C-12 y C-13). La señal identificada a 60.2 ppm es atribuible al carbono metilénico del grupo etoxilo C-19, y el carbono carbonílico de la función éster C-1, se localiza a campo bajo en el espectro con un desplazamiento químico de 173.95 ppm (Figura 12). El resto de las señales de los carbonos de esta estructura, concuerdan con los resultados reportados en la literatura (Huh et al., 2010; Park et al., 2014). Finalmente y como ya se había mencionado, la disposición espacial (Z,Z) de los dobles enlaces de este compuesto, es establecida por la constante de acoplamiento de 6 Hz

calculada para los protones del multiplete a 5.37, esta asignación se corrobora con la información espectroscópica reportada en la bibliografía (Neuman, 1992-2013; Pretsch et al., 2009).

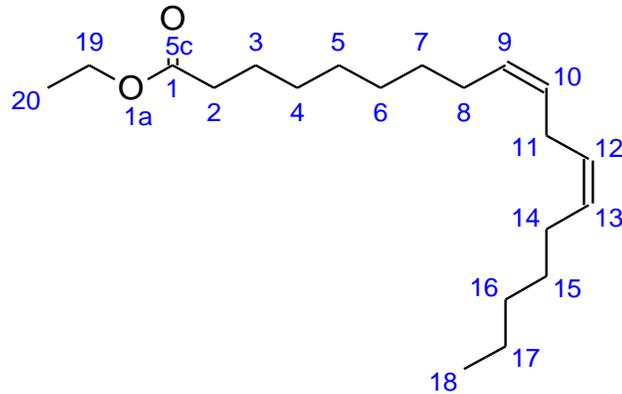


Figura 13. Estructura química caracterizada por resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto de interés aislado de *Lasiodiplodia theobromae*: linoleato de etilo.

Una curva estándar de cuatro puntos se creó con LAEE de grado estándar (Cayman Chemical) con un valor de $R^2 = 1.00$ y la ecuación $y = 3.53E+08x - 1.43E+06$, de donde se calcularon las concentraciones de LAEE de las muestras de *L. theobromae* incubado en avena. Utilizando avena como substrato, LAEE fue el éster de ácido graso mayoritario producido por *L. theobromae*.

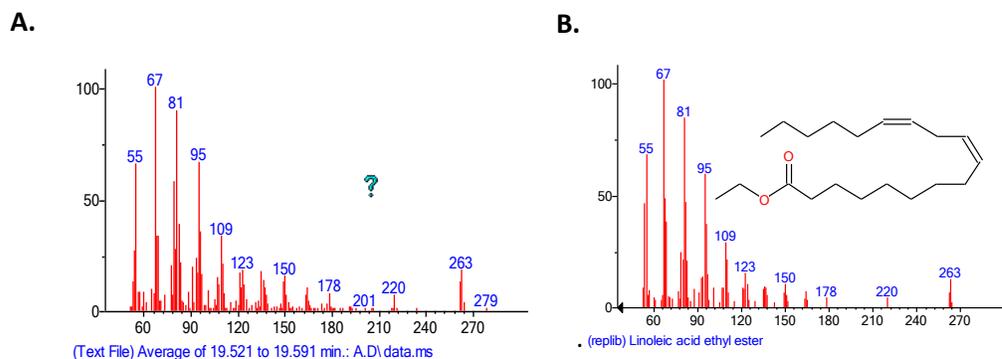


Figura 14. Estructura química revelada por CG-MS y búsqueda en la biblioteca NIST, donde se observa un patrón de fragmentación muy similar. A. El espectro de CG-MS obtenido de *L. theobromae* incubado en avena 60 días. B. El espectro arrojado por la biblioteca NIST, demostrando el linoleato de etilo.

La incubación de *L. theobromae* por 60 días arrojó 20.1 ± 1.3 g/L (20.1 mg/g o 65 mM) en UCD256Ma y 28.7 ± 7.1 g/L (28.7 mg/g o 93 mM) en MXL28 para LAEE. Siendo 10% la cantidad de lípidos en avena estándar (USDA, 2016); esta cantidad representa el 10% del total de la masa de avena utilizada en este experimento (25 g) lo cual indica una tasa de producción de LAEE de de 2 - 2.8 mg/g de avena completa

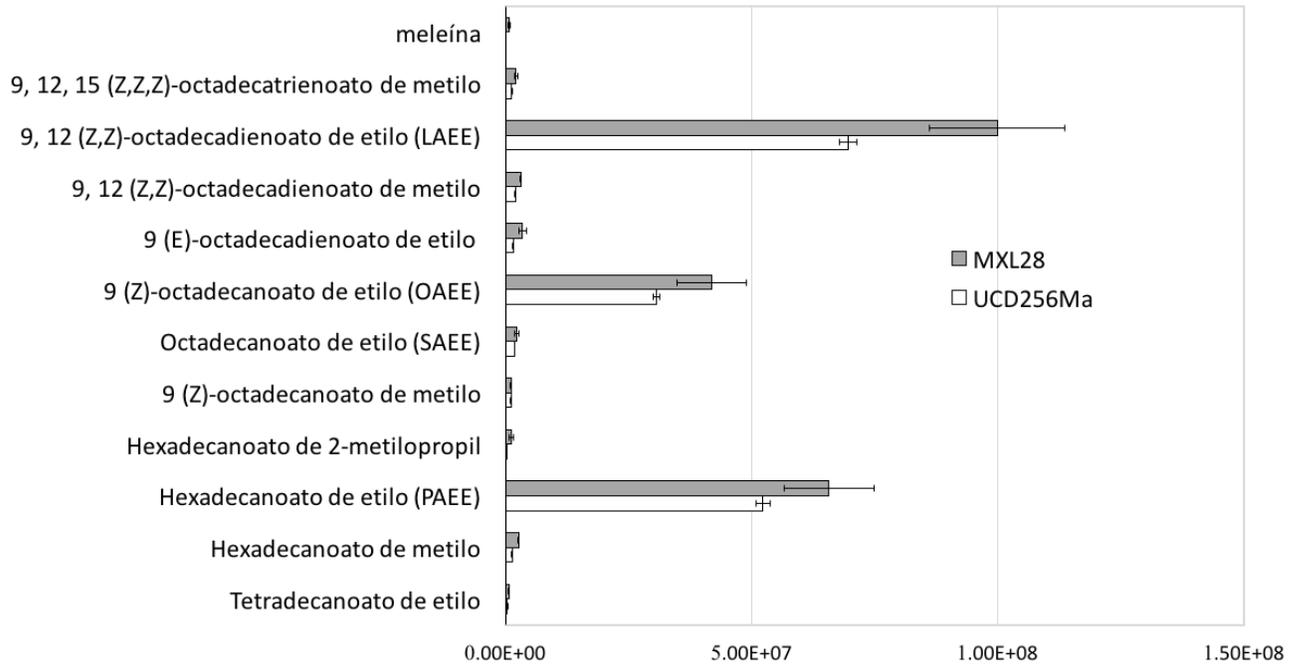


Figura 15. Promedio de la área bajo la curva de tres réplicas de dos cepas de *Lasiodiplodia theobromae* incubadas en avena y sales de Vogel 60 días. Las barras de error representan error estándar de la media.

Las dos cepas de *L. theobromae* mostraron un patrón de producción de ésteres de ácido grasos similar (Figura 15, Anexo 1 y Tablas 2 y 3), con algunas diferencias en cantidad y variedad de compuestos, ya que en la cepa MXL28 se observó mayor cantidad de todos los compuestos detectados, incluso otros compuestos que no fueron encontrados en UCD256Ma. Cabe mencionar que la meleína se detectó en la cepa MXL28 incubada en avena, la cual no se detectó en la cepa UCD256Ma incubada con avena (Tabla 2 y 3).

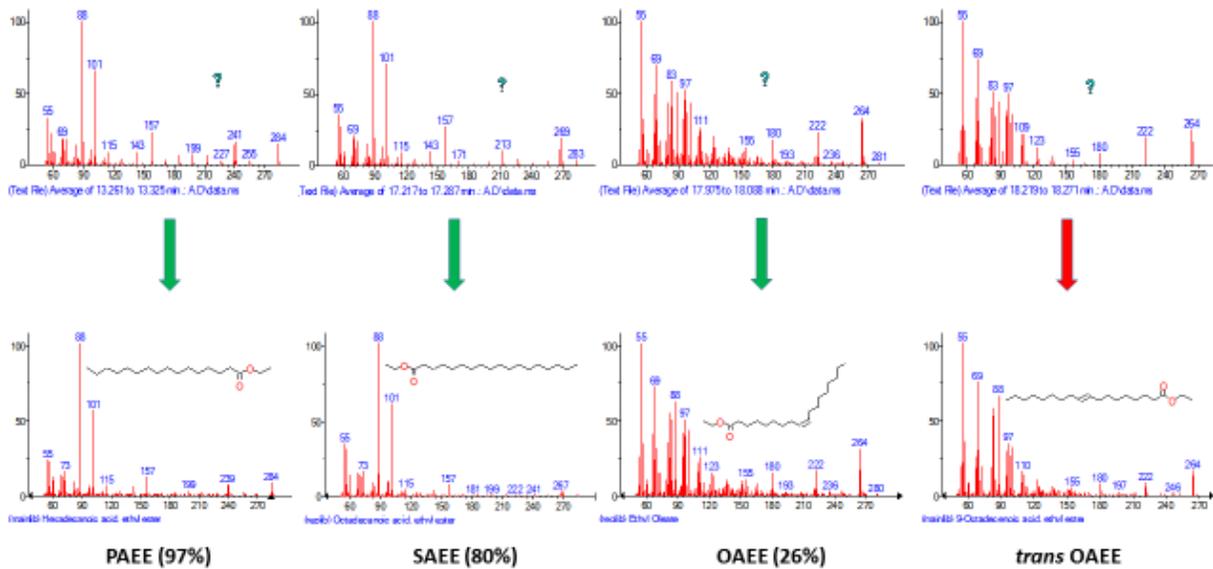


Figura 16. Patrones de fragmentación por CG-MS de muestras de *Lasiodiplodia theobromae* incubado en avena y sales de Vogel (espectros superiores) y patrones de fragmentación de Hexadecanoato de etilo (PAEE), Octadecanoato de etilo (SAEE), 9-Z-Octadecanoato de etilo (OAEE) y *trans*-9-Z-Octadecanoato de etilo (*trans* OAEE) obtenidas de la biblioteca NIST.

Se identificó tentativamente el *trans*-9-octadecenoato de etilo (elaidato de etilo) en varias de las muestras evaluadas, y en los dos controles positivos, que consistieron en aceites de avena y de uva esterificados con metanol y etanol. En las muestras derivadas de las dos Botryosphaeriaceae estudiadas (*L. theobromae* y *N. parvum*), éstos se encontraron en mayor cantidad en comparación con los controles positivos. En el patógeno de tomate *F. oxysporum*, no se detectó el ácido elaidico, ni en el no-patógeno, *T. asperellum*.

3.2 Evaluación de producción de ésteres de ácidos grasos en sustrato definido.

En *L. theobromae* incubado en la combinación de glucosa al 5% y aceite de semilla de uva al 5%, los resultados de TLC revelaron un compuesto con el mismo factor de retención (Rf) que LAEE. La presencia de LAEE se confirmó en sustrato definido, co-inyectando un estándar de LAEE con las muestras crudas en CG-MS. Palmitato etílico (PAEE) y 1H-2-Benzopiran-1-ona, 3, 4-dihidro-8 hidroxi-3-metilo- (meleína) se

detectaron en glucosa al 5% como la única fuente de carbono (Tablas 2, 3 y Figura 17), indicando producción *de novo* de PAEE y meleína por el hongo con glucosa como sustrato. Los AGE identificados por medio de CG-MS, el estándar de 37 ésteres de ácido grasos metilados y la biblioteca NIST se encuentran en la Tabla 2; muchos de ellos no habían estado previamente reportados para los hongos utilizados en este estudio.

En aceite de semilla de uva al 5%, el metabolismo cambió hacia la producción del 9-octadecanoato de metilo (OAME) (73%) y linoleato de metilo (16%) (Tabla 3), LAEE sí se produjo (2%), indicando la producción de etanol en la ausencia de glucosa pero también un aumento en la metilación de los ácidos grasos libres. SAEE (0.3%) y PAEE (3%) también se produjeron en la ausencia de glucosa. En cuanto el efecto de diferentes fuentes de carbono, no se produjeron ésteres de ácido grasos por *L. theobromae* (UCD256Ma) cuando se incubó en fructosa al 5% (Anexo 4).

En glucosa al 5% + aceite de semilla de uva al 5%, *L. theobromae* produjo 2.4 ± 0.7 g/L (2.4 mg/mL o 7.7 mM) LAEE (Tablas 2 y 3) relativo al aceite agregado. Se produjeron 6 mg LAEE en total a partir de 2.5 g de aceite de semilla de uva (0.24% del total) en 20 días. Se determinó una tasa de producción de LAEE de 0.24%, (2.4 mg/g) en 20 días. El hecho de que el tronco de vid contiene 20 mg/g lípidos en total, o 2% del total de compuestos (Vivin et al., 2003) indica que en vid, teóricamente, 40-48 $\mu\text{g/g}$ de ésteres de ácidos grasos se pueden estar produciendo en 20-60 días.

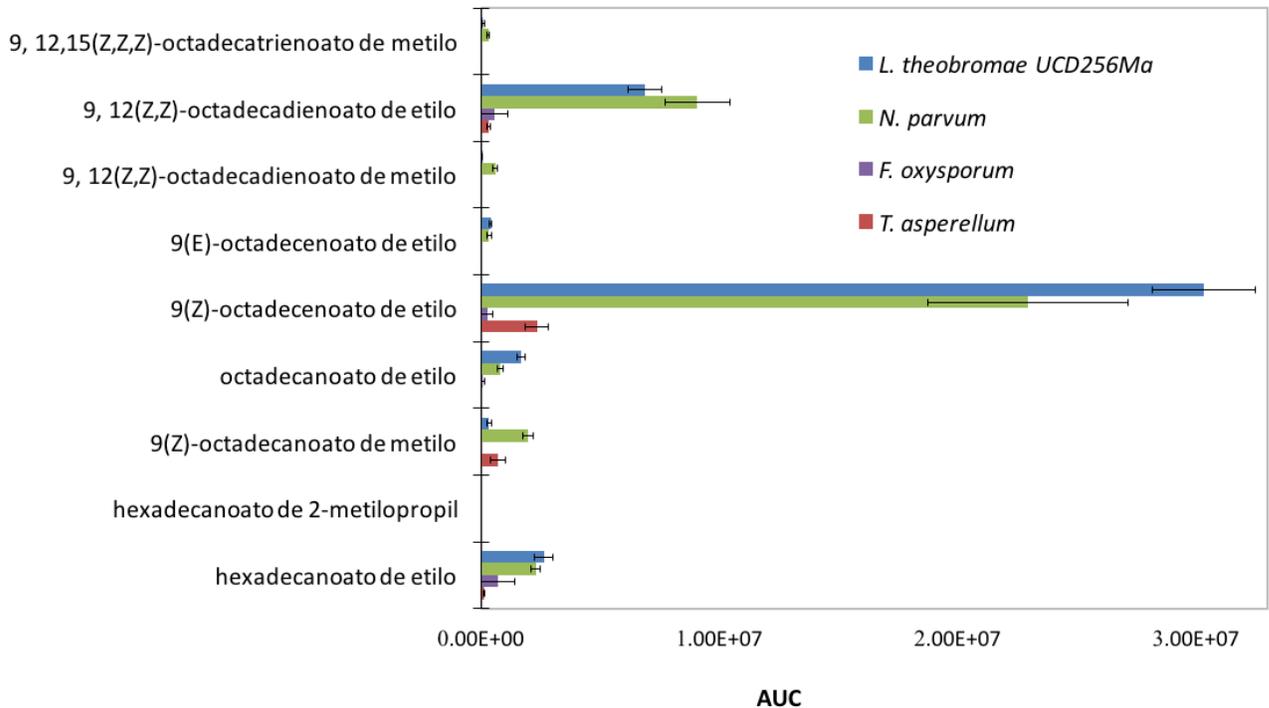


Figura 17. Ésteres de ácidos grasos producidos por varias especies de hongos incubados en sales de Vogel suplementado con glucosa al 5% y aceite de semilla de uva al 5%. Las cepas incluyen las Botryosphaeriaceae *Lasiodiplodia theobromae* (UCD256Ma) y *Neofusicoccum parvum*, el patógeno de tomate *Fusarium oxysporum*, y el no-patógeno *Trichoderma asperellum*. AUC significa área bajo la curva.

En la combinación de aceite de semilla de uva (5%) y glucosa (5%) en sales de Vogel, las Botryosphaeriaceae produjeron mayor cantidad y variedad de ésteres de ácidos grasos (Figura 17) en comparación a las otras especies estudiadas en este trabajo. Por ejemplo, *T. asperellum* no produjo el SAAE, mientras que los demás hongos, considerados fitopatógenos, sí lo produjeron. A diferencia de utilizar avena como el substrato, en glucosa (5%) + aceite de semilla de uva (5%) no se produjo ni la meleína ni el hexadecanoato de 2-metilpropil. Solamente las Botryosphaeriaceae produjeron el compuesto 9 (E)-octadecenoato de etilo, con el nombre común elaidato de etilo. Sin embargo, hasta ahora esta identificación es tentativa, ya que se requiere de estándar para verificar la producción de este compuesto.

Tabla 2. Ésteres de ácidos grasos esterificados de cepas de *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma asperellum*, identificados vía CG-MS, estándar 37 FAME y comparación con biblioteca NIST. Los promedios de áreas bajo las curvas se muestran para cada triplicado de cada cepa fúngica, con el error estándar de la media. Identificadores de ChEBI se incluyen donde es aplicable.

Compuesto	Control positivo		<i>L. theobromae</i> en avena inc. 60 días		Glucosa 5%	Aceite uva 5%	Incubación en glucosa, 5% glucosa+ aceite de uva 5%, 20 días			
	Aceite avena	Aceite uva	UCD256 Ma	MXL28	UCD 256Ma	UCD 256Ma	UCD 256Ma	<i>N. parvum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>T. asperellum</i>
Hexadecanoato de metilo ChEBI:69187	6 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁶ ± 1x 10 ⁵	2.6 x 10 ⁶ ± 5x 10 ⁴	N/D	1.7 x 10 ⁵ ± 1x 10 ⁵	N/D	N/D	N/D	N/D
Hexadecanoato de etilo (PAEE) ChEBI:84932	3.2 x 10 ⁷	1.9 x 10 ⁶	5.2 x 10 ⁷ ± 1.4x 10 ⁶	6.6 x 10 ⁷ ± 9x 10 ⁶	9.1 x 10 ⁴ ± 2x 10 ⁴	1 x 10 ⁵ ± 7x 10 ⁴	2.6 x 10 ⁶ ± 4x 10 ⁵	2.3 x 10 ⁶ ± 8x 10 ⁵	7 x 10 ⁵ ± 7x 10 ⁵	9.2 x 10 ⁴ ± 3x 10 ⁴
Hexadecanoato de 2-metilopropil	N/D	N/D	9.5 x 10 ⁴ ± 2x 10 ⁴	1.2 x 10 ⁶ ± 4x 10 ⁵	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
9-(Z) octadecenoato de metilo	9.8 x 10 ⁶	2.4 x 10 ⁷	1.1 x 10 ⁶ ± 8x 10 ⁴	1.1 x 10 ⁶ ± 1x 10 ⁵	N/D	2.8 x 10 ⁶ ± 2x 10 ⁶	3.1 x 10 ⁵ ± 1x 10 ⁵	2 x 10 ⁶ ± 6x 10 ⁵	N/D	6.9 x 10 ⁵ ± 2x 10 ⁵
Octadecanoato de etilo (SAEE) ChEBI:84936	1.8 x 10 ⁶	7.9 x 10 ⁵	1.8 x 10 ⁶ ± 4x 10 ⁴	2.2 x 10 ⁶ ± 4x 10 ⁵	N/D	1.3 x 10 ⁴ ± 2x 10 ³	1.6 x 10 ⁶ ± 2x 10 ⁵	7.9 x 10 ⁵ ± 3x 10 ⁵	7.7 x 10 ⁴ ± 7x 10 ⁴	N/D
9-(Z) octadecenoato de etilo (OAEE) ChEBI:84936	5.3 x 10 ⁷	3.2 x 10 ⁷	3.1 x 10 ⁷ ± 6x 10 ⁵	4.2 x 10 ⁷ ± 7x 10 ⁶	N/D	N/D	3.0 x 10 ⁷ ± 2x 10 ⁶	2.3 x 10 ⁷ ± 8x 10 ⁶	2.4 x 10 ⁵ ± 2x 10 ⁵	2.3 x 10 ⁶ ± 8x 10 ⁵
9-(E) octadecenoato de etilo ChEBI:84936	1.1 x 10 ⁶	2.5 x 10 ⁵	1.5 x 10 ⁶ ± 9x 10 ⁴	3.4 x 10 ⁶ ± 8x 10 ⁵	N/D	N/D	3.9 x 10 ⁵ ± 6x 10 ⁴	3.3 x 10 ⁵ ± 1x 10 ⁵	N/D	N/D
9,12-(Z,Z) octadecadienoato de metilo ChEBI:69080	2.3 x 10 ⁷	7 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶ ± 6x 10 ⁴	3.1 x 10 ⁶ ± 1x 10 ⁵	N/D	6 x 10 ⁵ ± 4x 10 ⁵	2.7 x 10 ⁴ ± 3x 10 ⁴	5.7 x 10 ⁵ ± 2x 10 ⁵	N/D	N/D
9,12-(Z,Z) octadecadienoato de etilo (LAEE) ChEBI:31572	1.1 x 10 ⁸	8.9 x 10 ⁶	7 x 10 ⁷ ± 2x 10 ⁶	1.0 x 10 ⁸ ± 1x 10 ⁷	N/D	7.6 x 10 ⁴ ± 4x 10 ⁴	6.9 x 10 ⁶	9.1 x 10 ⁶ ± 3x 10 ⁶	5.5 x 10 ⁵ ± 6x 10 ⁵	3 x 10 ⁵ ± 1x 10 ⁵
9,12,15-(Z,Z,Z) octadecatrienoato de metilo	2.0 x 10 ⁶	1.7 x 10 ⁵	1.3 x 10 ⁶ ± 7x 10 ⁴	2.2x 10 ⁶ ± 3x 10 ⁵	N/D	N/D	7.4 x 10 ⁵ ± 4x 10 ⁴	2.8 x 10 ⁵ ± 9x 10 ⁴	N/D	N/D
2H-1-Benzopyran, 3,4-dihydro- (R± meleína)	N/D	N/D	N/D	6.9 x 10 ⁵ ± 2x 10 ⁵	4.5 x 10 ⁵ ± 2x 10 ⁵	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

N/D: No detectado; *Neofusicoccum parvum*, cepa UCD646So. No se detectaron AGE en los controles negativos, por lo que no se incluyen en esta tabla

Tabla 3. Promedios de área bajo la curva presentados como porcentajes del total de los compuestos identificados en cada cepa y cada fuente de carbono en *Lasiodiplodia theobromae*.

Compuestos identificados	5% glucosa		Aceite semilla de uva 5%		5% glucosa + 5% aceite semilla de uva			
	Control positivo aceite avena (EtOH)	Control positivo aceite uva (EtOH)	UCD 256Ma	UCD 256Ma	UCD 256Ma	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>
Hexadecanoato de metilo ChEBI:69187	N/A	N/A	0%	4%	0%	0%	0%	0%
Hexadecanoato de etilo (PAEE) ChEBI:84932	15%	4.3%	16.8%	3%	6%	6%	45%	3%
Hexadecanoato de 2- metilopropil	N/A	N/A	0%	0%	0%	0%	0%	0%
9-(Z) octadecenoato de metilo ChEBI:27542	N/A	N/A	0%	73%	1%	5%	0%	20%
Octadecanoato de etilo (SAEE) ChEBI:84936	1%	1.8%	0%	0.3%	1%	2%	5%	0%
9-(Z) octadecenoato de etilo (OAEE) ChEBI:84940	26%	72.7%	0%	0%	72%	60%	16%	68%
9-(E) octadecenoato de etilo (elaidato de etilo)	N/A	2.0%	0%	0%	1%	1%	0%	0%
9,12-(Z,Z) octadecadienoato de metilo ChEBI:69080	N/A	N/A	0%	16%	0%	1%	0%	0%
9,12-(Z,Z) octadecadienoato de etilo (LAEE) ChEBI:31572	55%	21.2%	0%	2%	16%	24%	35%	9%
9,12,15-(Z,Z,Z) octadecatrienoato de etilo ChEBI:84851	1%	0.4%	0%	0%	0.2%	1%	0%	0%
2H-1-Benzopyran, 3,4-dihydro- (R± mellen)	N/A	N/A	83.2%	0%	0%	0%	0%	0%

N/D: No detectado; No se detectaron ésteres de ácidos grasos en los controles negativos, por lo que no se incluyen en esta tabla.

En la producción de ésteres de ácidos grasos por *L. theobromae* incubado en fosfolípidos (lípidos estructurales) y comparado con el no-patógeno, *T. asperellum*, se observó de nuevo, menos variedad y poca producción por *T. asperellum* de varios ésteres de ácidos grasos en comparación con *L. theobromae* (Tablas 4 y 5). Inclusive, se detectó un cambio en tipo de producción de ácidos grasos esterificados a través del tiempo en *L. theobromae*. Después de 20 días de incubación, se detectaron ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos. Después de 35 días de incubación, se encontraron en su mayoría ésteres metilado de ácidos grasos. A diferencia, SAEE se continuó produciendo, con un aumento a 35 días de incubación. LAEE se detectó haberse producido por *L. theobromae* incubado en glucosa al 5% y medio mínimo MM9 *de novo*, ya que no hubo triglicéridos exógenos adicionales en esta condición experimental.

En las muestras de *L. theobromae* incubadas en aceite de semilla de uva, en sales de Vogel, no se detectó el escualeno. Sin embargo, en medio mínimo MM9 sí se detectó el escualeno, el cual es producto de la ruta biosintética de terpenos y un precursor del ergosterol. La producción de escualeno se observó mayoritariamente en la presencia de glucosa, y fue ligeramente reducida con la adición de lecitina, indicando la glucosa como fuente de carbono principal en la producción de terpenos. Cabe mencionar que el medio mínimo MM9 no contiene hierro u otros metales en comparación con el medio mínimo de Vogel (Anexo 7), lo cual indica que medio de cultivo sin metales y minerales en el medio mínimo MM9 induce a *L. theobromae* a producir el escualeno, en comparación con usando medio mínimo de Vogel (Tabla 5).

Viendo la composición natural de ácidos grasos del micelio de *L. theobromae* (MXL28), *L. theobromae* contiene el ácido linoléico (42%) y el ácido palmítico (41%) mayoritariamente, seguido por el ácido oléico (9%) y el ácido esteárico (7%).

Tabla 4. Ésteres de ácidos grasos en *Lasiodiplodia theobromae* (MXL28) y *Trichoderma asperellum* incubado en 5% lecitina y/o glucosa en medio mínimo MM9 por 20 días. Producción de ésteres de ácidos grasos en *Lasiodiplodia theobromae* incubado en lecitina y glucosa al 5% 35 días. Composición natural de ácidos grasos en *Lasiodiplodia theobromae*. Se reportan promedios de área bajo la curva \pm error estándar de la media.

Compuestos identificados	Lecitina esterificación Fischer (MeOH)	MXL28 5% glucosa	MXL28 5% glucosa, Esterificación MeOH	MXL28 5% glucosa, 5% lecitina 20 días	MXL28 5% glucosa, 5% lecitina 35 días	<i>T. asperellum</i> 5% glucosa, 5% lecitina 20 días
Hexadecanoato de metilo ChEBI:69187	1.0×10^9	N/D	$2.8 \times 10^9 \pm 7.7 \times 10^7$	$2.3 \times 10^7 \pm 2.1 \times 10^6$	$6.9 \times 10^8 \pm 2.5 \times 10^8$	N/D
Hexadecanoato de etilo (PAEE) ChEBI:84932	N/D	N/D	N/D	$1.6 \times 10^8 \pm 5.4 \times 10^7$	N/D	$8.8 \times 10^6 \pm 5.4 \times 10^5$
Octadecanoato de metilo (SAME) ChEBI:69188	8.8×10^7	N/D	$4.6 \times 10^8 \pm 3.0 \times 10^7$	N/D	$7.9 \times 10^7 \pm 2.2 \times 10^7$	N/D
Octadecanoato de etilo (SAEE) ChEBI:84936	N/D	N/D	N/D	$2.5 \times 10^7 \pm 7.0 \times 10^6$	$1.9 \times 10^7 \pm 4.4 \times 10^6$	N/D
9-(Z) octadecenoato de metilo (OAME) ChEBI:27542	1.5×10^8	N/D	$6.3 \times 10^8 \pm 1.3 \times 10^8$	$1.0 \times 10^7 \pm 9.7 \times 10^5$	$7.1 \times 10^7 \pm 1.8 \times 10^7$	N/D
9-(Z) octadecenoato de etilo (OAEE)	N/D	N/D	N/D	$1.5 \times 10^8 \pm 5.8 \times 10^7$	N/D	N/D
9,12-(Z,Z) octadecadienoato de metilo ChEBI:69080	2.9×10^9	N/D	$2.9 \times 10^9 \pm 3.7 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8 \pm 1.4 \times 10^7$	$8.6 \times 10^8 \pm 2.9 \times 10^8$	$1.5 \times 10^7 \pm 3.8 \times 10^6$
9,12-(Z,Z) octadecadienoato de etilo (LAEE)	N/D	9.5×10^6	N/D	$2.9 \times 10^9 \pm 1.3 \times 10^9$	N/D	$4.6 \times 10^7 \pm 2.3 \times 10^6$
9,12,15-(Z,Z,Z) octadecatrienoato de metilo ChEBI:84851	1.5×10^8	N/D	$5.6 \times 10^7 \pm 1.9 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7 \pm 1.1 \times 10^6$	$4.1 \times 10^7 \pm 1.5 \times 10^7$	N/D
9,12,15-(Z,Z,Z) octadecatrienoato de etilo	N/D	N/D	N/D	$1.3 \times 10^8 \pm 5.2 \times 10^7$	N/D	N/D
2H-1-Benzopyran, 3,4-dihydro- (R± mellen)	N/D	$1.8E+07 \pm 5.0E+10^6$	$7.2 \times 10^7 \pm 1.5 \times 10^7$	$1.7 \times 10^7 \pm 2.7 \times 10^6$	$3.6 \times 10^7 \pm 7.5 \times 10^6$	N/D
Escualeno	N/D	$4.8 \times 10^7 \pm 8.5 \times 10^6$	N/D	N/D	$3.76 \times 10^7 \pm 1.8 \times 10^7$	N/D

Tabla 5. Ésteres de ácidos grasos en *Lasiodiplodia theobromae* (MXL28) y *Trichoderma asperellum* incubado en 5% lecitina y/o glucosa en medio mínimo MM9 20 días expresado en porcentajes.

Compuestos identificados	Lecitina esterificación Fischer	Aceite de uva esterificación Fischer	MXL28 5% glucosa	MXL28 5% glucosa, esterificación MeOH	MXL28 5% glucosa, 5% lecitina 20 días	MXL28 5% glucosa, 5% lecitina 35 días	<i>T. asperellum</i> 5% glucosa, 5% lecitina 20 días
Hexadecanoato de metilo ChEBI:69187	24%	4%	N/D	41%	0.6%	34%	8%
Hexadecanoato de etilo (PAEE) ChEBI:84932	N/D	N/D	N/D	N/D	4%	N/D	8%
Octadecanoato de metilo (SAME) ChEBI:69188	2%	2%	N/D	7%	N/D	4%	N/D
Octadecanoato de etilo (SAEE) ChEBI:84936	N/D	N/D	N/D	N/D	1%	1%	N/D
9-(Z) octadecenoato de metilo (OAME) ChEBI:27542	4%	72%	N/D	9%	0.3%	4%	N/D
9-(Z) octadecenoato de etilo (OAE)	N/D	N/D	N/D	N/D	4%	N/D	N/D
9,12-(Z,Z) octadecadienoato de metilo ChEBI:69080	66%	21%	N/D	42%	4%	43%	14%
9,12-(Z,Z) octadecadienoato de etilo(LAEE)	N/D	N/D	N/D	N/D	79%	N/D	42%
9,12,15-(Z,Z,Z) octadecatrienoato de metilo ChEBI:84851	3.4%	0.4%	N/D	1%	0.3%	2%	N/D
9,12,15-(Z,Z,Z) octadecatrienoato de etilo	N/D	N/D	N/D	N/D	4%	N/D	N/D
2H-1-Benzopyran, 3,4-dihidro- (R± meleína)	N/D	N/D	13%	1%	0.5%	2%	N/D
Escualeno	N/D	N/D	35%	N/D	2%	2%	N/D

3.3 Germinación de *Nicotiana tabacum* y crecimiento en ésteres de ácido grasos

Se observaron efectos estadísticamente significativos en la germinación de *N. tabacum* por algunos ésteres de ácido grasos probados a 0.2 mg/mL, comparado con los controles negativos ($p \leq 0.5$). El palmitato libre (PA) no mostró efecto alguno y el PAEE tuvo un efecto de inhibición leve en medio Murashige y Skoog (MS) en el primer experimento, pero, no tuvo efecto significativo en el segundo experimento (Figura 18). Estos experimentos preliminares indicaron que los ácidos grasos esterificados poseen actividad fisiológica. Los compuestos LAEE, OAEE, SAEE y el extracto crudo significativamente inhibieron el crecimiento de plántulas en estos primeros dos experimentos.

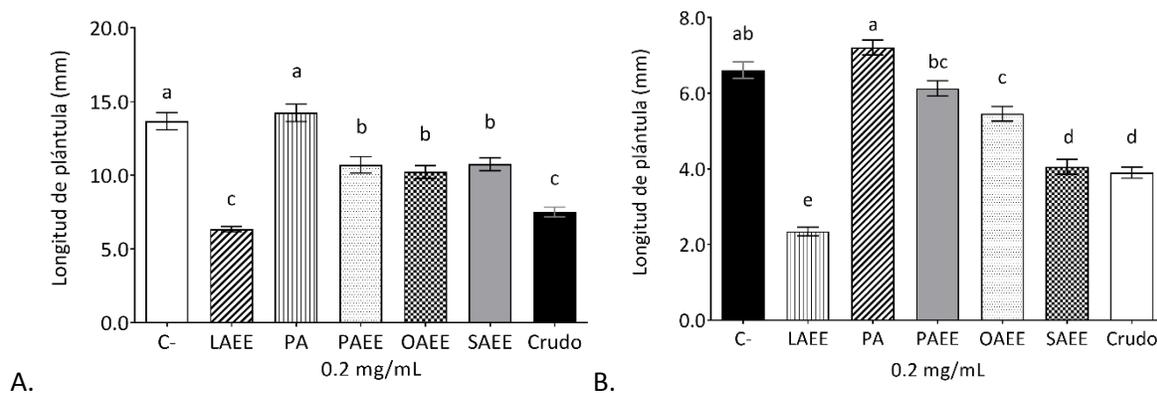


Figura 18. Efecto de ésteres de ácidos grasos a 0.2 mg/mL encontrados en *L. theobromae* durante la germinación *N. tabacum*. A; Experimento 1. B; Experimento 2. Las muestras se germinaron en sales de Murashige y Skoog (MS)-agar en cajas Petri con 0.2 mg/mL LAEE, ácido palmítico (PA), PAEE, OAEE, SAEE, o el extracto crudo del hongo incubado en aceite de semilla de uva (5%) y glucosa (5%) en sales de Vogel 20 días.

Tomando en cuenta el hecho de que los azúcares exógenos reprimen la germinación de plantas (Rolland et al., 2006), se realizó un segundo experimento de germinación, valiéndose de dos medios diferentes, sales Murashige y Skoog (MS) en agar (Figura 19A), y MS-agar suplementado con sacarosa al 3% (Figura 19B). En MS sin sacarosa, LAEE, OAEE, SAEE y el extracto aceitoso crudo causaron, nuevamente, inhibición de crecimiento. En MS+ sacarosa al 3%, LAEE, PAEE, OAEE, SAEE y el extracto crudo inhibieron la germinación. El ácido palmítico (PA) no reprimió la germinación a 0.2 mg/mL en ninguno de los medios probados pero, en contraste, la forma de PA esterificada con etanol (PAEE) sí reprimió la germinación, indicando la esterificación del alcohol etílico al ácido palmítico como aspecto bioquímico necesario para la actividad fisiológica de PAEE.

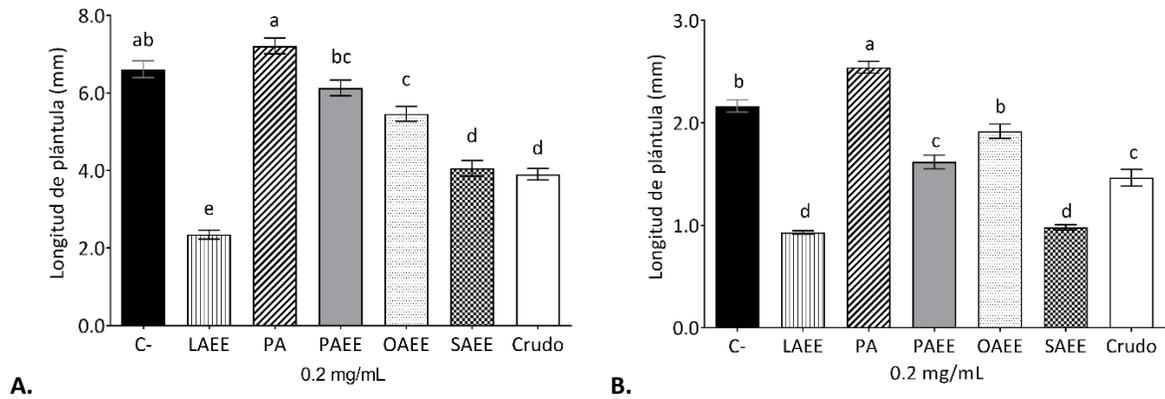


Figura 19. Efecto de ácidos grasos esterificados en la germinación de tabaco. Longitud de la plántula 7-10 días después de sembrar. A; 0.2 mg/mL de cada éster de ácido graso o extracto crudo aceitoso en sales de Murashige y Skoog solamente. B; 0.2 mg/mL de cada éster de ácido graso o extracto aceitoso crudo en sales de Murashige y Skoog + sacarosa al 3%. Se utilizó una prueba ANOVA de una vía y una prueba post-hoc Tukey HSD, con p -valor < 0.05 significativo.

Con la información obtenida de estos experimentos (Figura 19) se escogió la concentración 0.1 mg/mL (324 μ M LAEE) y el medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con sacarosa al 3%. La condición con sacarosa se escogió por la mayor supervivencia de las plántulas en sacarosa en comparación a las plántulas crecidas sin sacarosa. En este siguiente experimento, de nuevo, se observó que LAEE, PAEE y SAE inhibieron el crecimiento de las plántulas a 0.1 mg/mL (Figura 20).

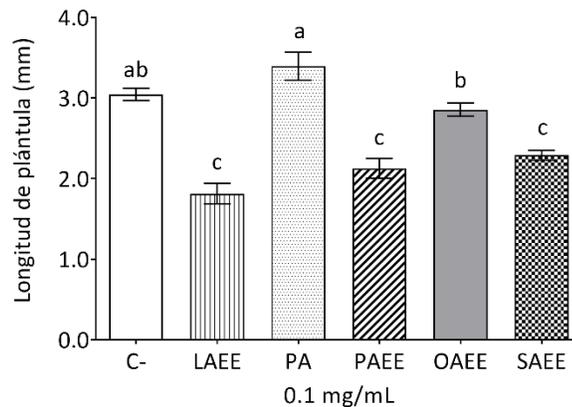


Figura 20. Experimento de germinación de *Nicotiana tabacum* en ácidos grasos esterificados encontrados en *Lasiodiplodia theobromae* usando CG-MS. En MS + sacarosa al 3% se ve el efecto inhibitorio de LAEE, PAEE y SAE a concentración de 0.1 mg/mL.

Para evaluar mejor el efecto de los ésteres de ácido grasos en el crecimiento de *N. tabacum*, se seleccionaron los dos compuestos de este tipo con mayor actividad inhibitoria, ya que mostraron actividad en los dos medios con o sin sacarosa al 3% (LAEE y SAE). Se usó medio MS-agar suplementado con

sacarosa al 3% de nuevo. Se realizaron diluciones de los dos compuestos, de 200- 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (650 μM -10 μM para LAEE y 640 μM -9.9 μM para SAEE) , y de igual manera se germinaron y midieron las plántulas (Figura 21).

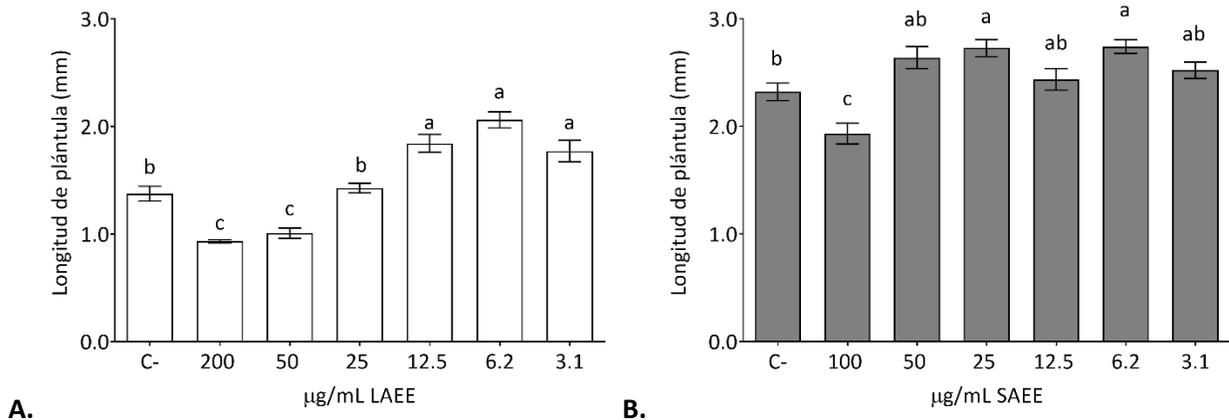


Figura 21. Gradiente de concentración de *Nicotiana tabacum* germinado en linoleato de etilo (LAEE) y estearato de etilo (SAEE) a concentraciones de 200 a 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio Murashige y Skoog con sacarosa al 3%, mostrando inhibición de crecimiento a mayores concentraciones e inducción de crecimiento a concentraciones bajas.

De nuevo, se observó que en concentraciones de 200 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LAEE y SAEE inhibieron el crecimiento. Sin embargo, para LAEE, a partir de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ya no hubo inhibición. Además, a partir de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, hubo un aumento estadísticamente significativo en el crecimiento de *N. tabacum* (Figura 21). Para SAEE, de nuevo hubo inhibición a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pero a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en diluciones subsecuentes, hubo inducción de crecimiento estadísticamente significativo. No se incluyen los datos de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SAEE en este experimento por contaminación de estas muestras. La tasa de producción de LAEE se determinó ser 0.2-0.24%, o 2-2.4 mg/g de producción en 20-60 días, dependiendo del substrato. El hecho de que el tronco de vid contiene 20 mg/g lípidos en total (Vivin et al., 2003), se puede deducir que en tronco de vid, teóricamente, 40-48 $\mu\text{g}/\text{g}$ de ésteres de ácidos grasos se producirán en 20-60 días, llegando a concentraciones inhibitorias (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dentro de seis meses.

Viendo el efecto opuesto en concentraciones bajas en comparación al efecto en concentraciones altas de LAEE y SAEE, se evaluó el efecto a concentraciones aún más bajas (3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -98 ng/mL) de LAEE (10 μM -318 nM) y SAEE (9.9 μM -314 nM) (Figura 22). De nuevo, se observó para LAEE un aumento estadísticamente significativo en todas las concentraciones evaluadas, en comparación con el control negativo (Figura 22A). El SAEE demostró resultados más estocásticos a las concentraciones evaluadas, sin

embargo, se observó aumento en crecimiento estadísticamente significativo en 3.1, 1.6, 0.8, 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y de nuevo a 98 ng/mL (Figura 22B).

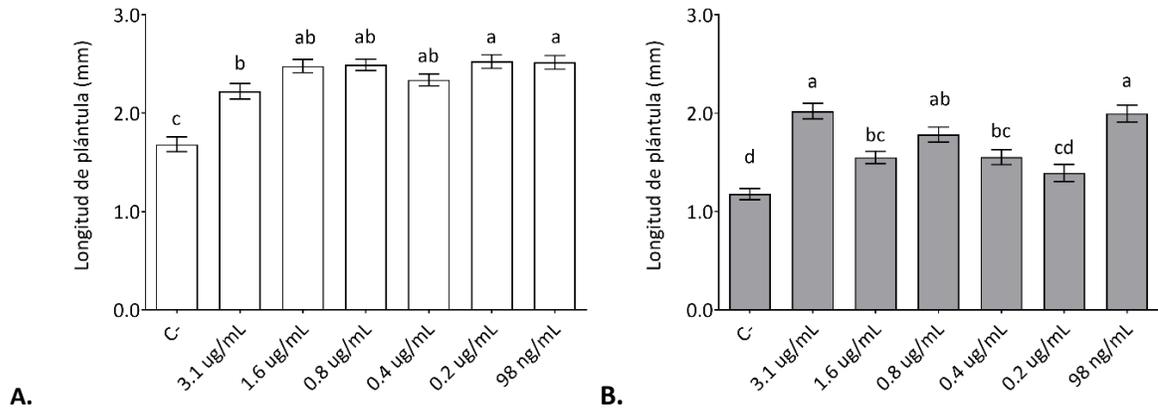


Figura 22. Gradiente de concentración A: Éster etílico del ácido linoléico (LAEE) 3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 98 ng/mL en medio Murashige y Skoog + sacarosa al 3%. B; Éster etílico del ácido esteárico SAE 3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 98 ng/mL en medio Murashige y Skoog + sacarosa al 3%. N=30 para cada condición.

Siendo SAE el único compuesto producido por los patógenos estudiados en este trabajo (*L. theobromae*, *N. parvum*, *F. oxysporum*), y no por el no-patógeno (*T. asperillum*), se seleccionó SAE para realizar un estudio de germinación bajo luz continua para observar la germinación de *N. tabacum* con grabación de un video de lapso de tiempo. El video mostró una tasa de germinación más rápida en *N. tabacum* expuesto a SAE a 98 ng/mL bajo luz blanca continua (Video 1, el cual se encuentra en el artículo publicado de este trabajo (C. C. Uranga et al., 2016), indicando la luz como un factor importante en este proceso, y confirmando de nuevo, la actividad fisiológica de SAE.

Para comparar este efecto de inducción con el de un regulador de crecimiento en plantas, se usó el ácido giberélico. Se usaron todos los compuestos a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un experimento de germinación (Figura 23). De nuevo, se observó un aumento significativo en la germinación y el crecimiento de *N. tabacum* a esta concentración, para todos los compuestos estudiados, aunque los compuestos esterificados con etanol tuvieron más actividad que sus versiones no esterificados los (ácidos grasos libres). El SAE y LAEE mostraron igual actividad que el ácido giberélico.

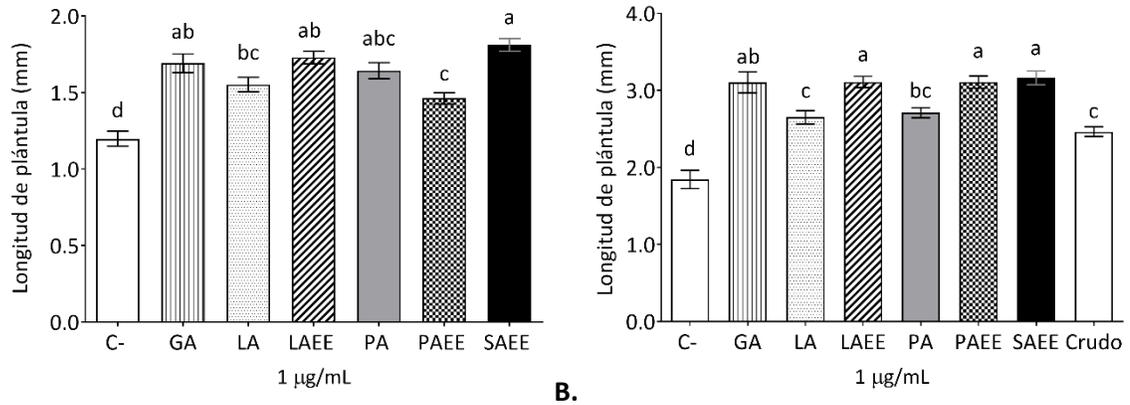


Figura 23. Germinación de *Nicotiana tabacum* en 1 µg/mL ácidos grasos esterificados para comparar con ácido giberélico (GA), un regulador de crecimiento de plantas conocido. A; germinación en 1 µg/mL ácidos grasos esterificados en MS. B; germinación en 1 µg/mL ácidos grasos esterificados en medio Murashige y Skoog + sacarosa al 3%.

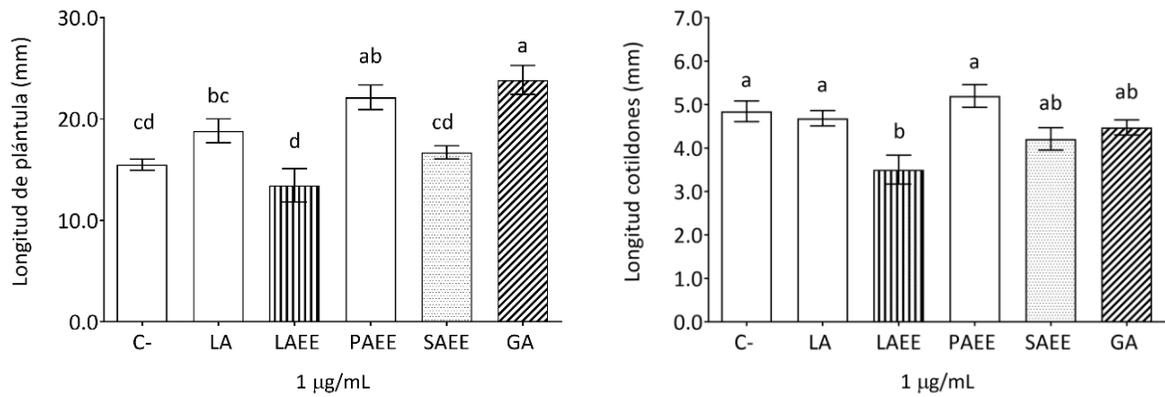
Se afectó la morfología de las plántulas de tabaco germinadas en ésteres de ácido grasos en sacarosa al 3%. Las hojas verdaderas mostraron elongación anormal y bifurcación cuando se expusieron al extracto crudo o a SAE a 0.2 mg/mL. En concentraciones más bajas de SAE, se observaron cotiledones expandidos y elongación anormal de la primera hoja verdadera. Las plántulas de tabaco expuestas a LAEE, PAEE, SAE y al extracto crudo durante la germinación mostraron menos crecimiento y clorosis (Figura 24).



Figura 24. Morfología de *Nicotiana tabacum* germinado con 0.2 mg/mL linoleato de etilo (LAEE), estearato de etilo (SAEE), palmitato de etilo (PAEE) o extracto crudo aceitoso de *L. theobromae* 45 días después de sembrar en medio Murashige y Skoog + sacarosa al 3%.

En cuanto a plántulas crecidas por hidroponía, se observaron, de nuevo, diferencias significativas en crecimiento entre los compuestos. El PAEE indujo el crecimiento del hipocotilo significativamente, similar al ácido giberélico. El LAEE fué el único compuesto con actividad, ya que se observó que inhibió el crecimiento de los cotiledones significativamente, medido por ANOVA de una vía. En PAEE, se observó cualitativamente un tamaño mayor en las hojas verdaderas, mientras que la filotaxia de las hojas verdaderas no se vio alterado en SAE, LA, y el ácido giberélico (Figura 25).

A.



B.

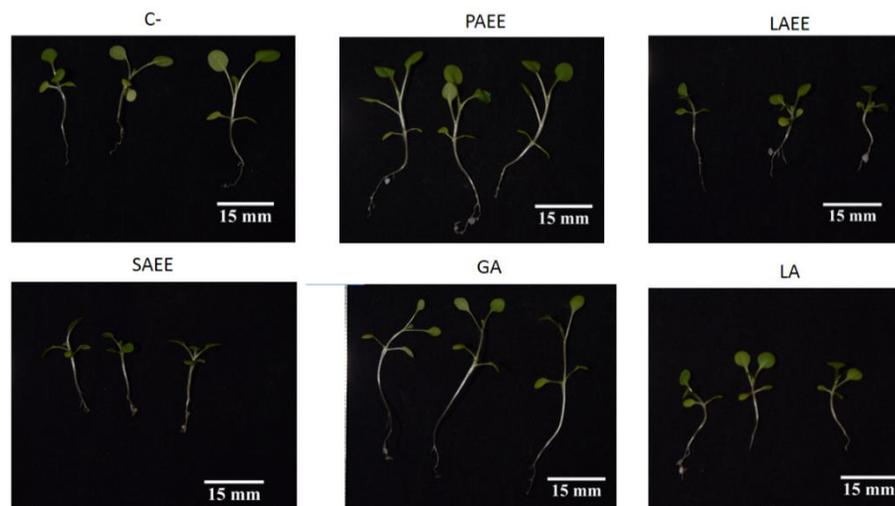


Figura 25. Plántulas de *N. tabacum* crecidas por hidroponía en presencia de 1 µg/mL de cada compuesto, linoleato de etilo (LAEE), estearato (octadecanoato) de etilo (SAEE), palmitato (hexadecanoato) de etilo (PAEE) o ácido giberélico (GA), emulsificados con 0.08% kolliphor P-188 en sales Murashige y Skoog. A; gráficas de la medición del hipocotilo y de los cotilodones de plántulas crecidas 35 días (N=9). B; imágenes del mismo experimento; plantas crecidas 50 días.

3.4 Proteómica

Los datos del análisis proteómico de fragmentación dependiente de base de datos arrojaron resultados sin precedente en estudios proteómicos de hongos filamentosos. Se obtuvieron 50,106 espectros, los cuales se analizaron por medio de varios algoritmos diferentes, incluidos en el paquete de SearchGUI, los cuales incluyeron MSGF Plus, X!Tandem, Comet y/o OMSSA. Los datos crudos y procesados se depositaron en su totalidad en la base de datos Pride (Vizcaino et al., 2016), con el identificador PXD003253. Ya identificados los péptidos, se utilizó la base de datos Uniprot (The UniProt Consortium, 2015) Swissprot para realizar una búsqueda de homólogos anotados, aparte de un análisis de ontología genética de estos datos.

Se reportan las categorías de funciones moleculares (Anexo 5; Figura 26), y componentes celulares enriquecidos (Anexo 5; Figura 27). En cuanto a funciones moleculares, la categoría más representada fue la actividad catalítica (84.2%) (Figura 26), seguida por actividad de transferasa, y actividad oxidoreductasa (Anexo 5). En la ontología de componentes celulares, se encontraron proteínas citosólicas en su mayoría (96%) (Figura 27), seguido por proteínas citoplasmáticas, incluyendo proteínas de la pared celular fúngica (Anexo 5). Los procesos biológicos más enriquecidos fueron en su mayoría procesos metabólicos, seguido por metabolismo de nitrógeno y biosíntesis de compuestos aromáticos (Anexo 5). En el Anexo 6, se encuentran todas las proteínas identificadas y validadas con 100% de confianza por medio de la base de datos completa de Uniprot, junto con su ontología completa. Se encuentran una gran cantidad de proteínas novedosas, homólogas o con un alto nivel de conservación a una variedad de grupos taxonómicos (Figura 28).

Cabe mencionar que las proteínas identificadas con un péptido solamente pero con >90% de probabilidad son proteínas de gran interés por ser homólogas a proteínas en vertebrados. Estos datos se pueden encontrar en los datos subidos al repositorio PRIDE con el identificador PXD003253, anteriormente mencionado. Por ejemplo, se encontró una proteína homóloga a la ankyrina POTE del ser humano (Uniprot ID A5A3E0). Esta familia de ankyrinas se ha considerado hasta ahora específica de primates (Bera et al., 2008), y expresadas solamente en ciertos tejidos en el ser humano, inclusive varias isoformas se han encontrado expresadas en varios tipos de cáncer, incluyendo el de próstata, de mama, y de pulmón. Otro miembro del citoesqueleto identificado con solamente un péptido es "Cat eye syndrome critical region protein 2" (CECR2_HUMAN) (Uniprot ID Q9BXF3). Esta proteína se encarga de remodelar la cromatina con un proceso dependiente de la ATP, transporte vesicular, ejecución de la apoptosis, organización del citoesqueleto, etc. (Banting et al., 2005; Footz et al., 2001). La versión en *L. theobromae* no se conoce,

pero se propone como proteína de interés para comprender aspectos fisiológicos novedosos en *L. theobromae*.

En cuanto a rutas de señalización, se encontraron varias versiones de la proteína Ras. Con la búsqueda de NCBI, se encontró la proteína Ras homóloga a la misma de *Macrophomina phaseolina* con 100% de confianza y validación. Sin embargo, utilizando todo Uniprot para la búsqueda, se encontraron las siguientes versiones de Ras: Proteína relacionada a Ras, Rab 6 homólogo de *Drosophila melanogaster* (Uniprot ID O18334); y una versión parecida a Ras del hongo *Botryotinia fuckeliana* (Uniprot ID P87018). Esta proteína se localiza anclada en el lado citosólico de la membrana plasmática, y es de importancia en señalización entre células (Fortwendel, 2012).

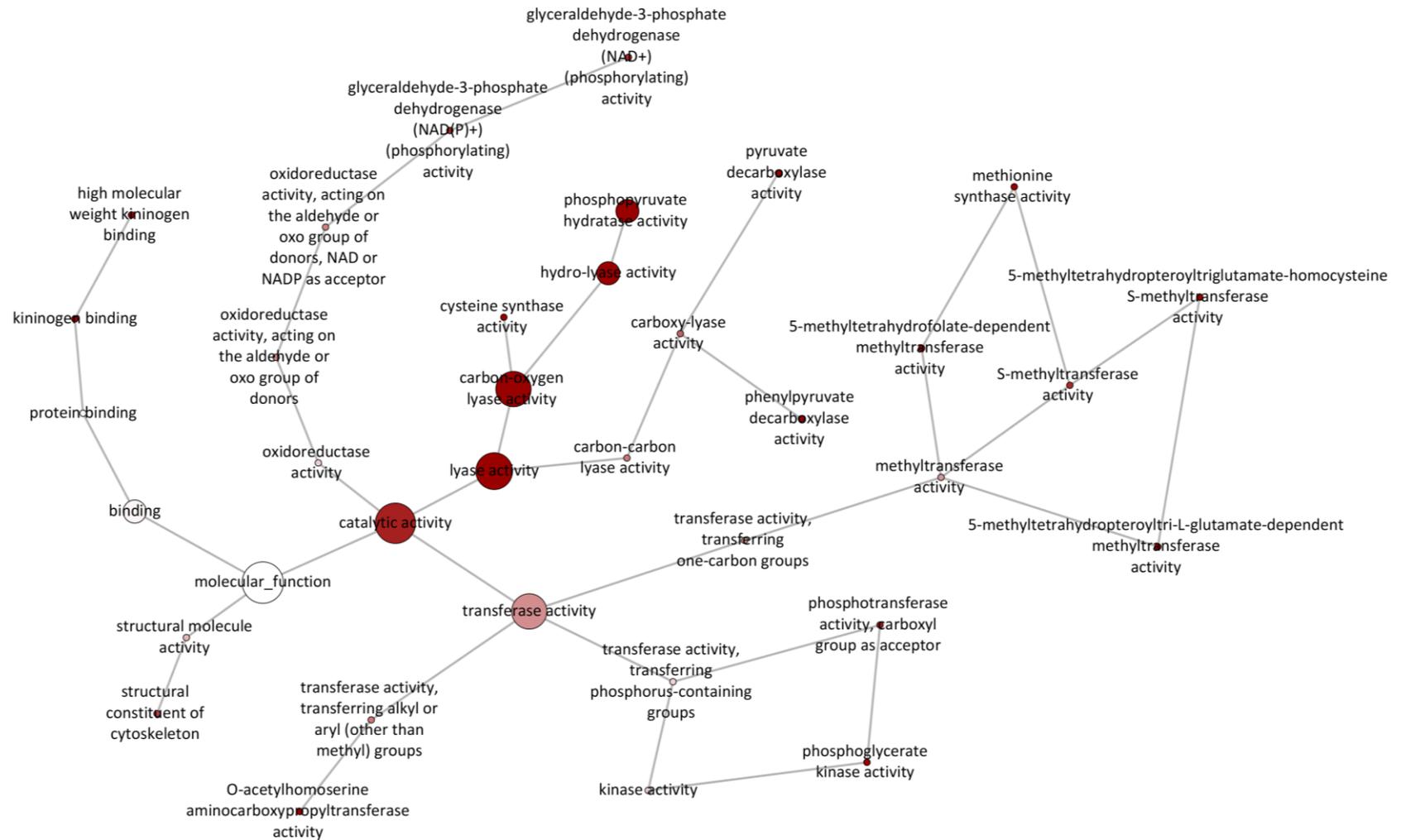


Figura 26. Red Cytoscape BiNGO de funciones moleculares enriquecidos ($p < 0.05$) en *Lasiodiplodia theobromae* incubado en sales de Vogel suplementado con glucosa al 5% + aceite de semilla de uva al 5%, determinados con prueba Hipergeométrica con corrección Benjamini y Hochberg. Círculos más grandes indican cantidad de genes dentro de la categoría. El color (graduado de blanco-rosa-rojo) del círculo indica significancia estadística. Los p-valores más significativos están en rojo, mientras los menos significativos en blanco, sin embargo, todas representan p-valor < 0.05 .

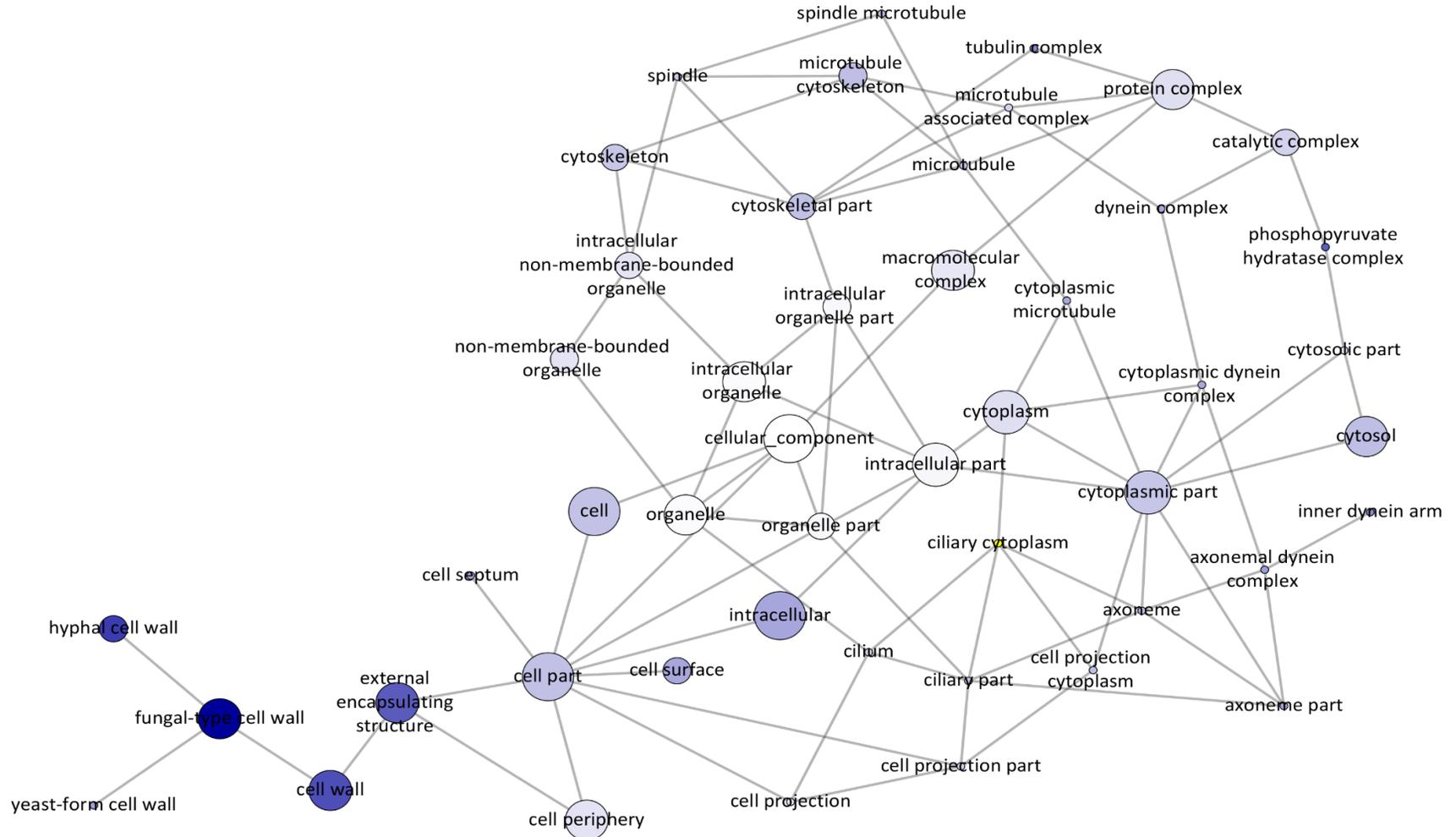


Figura 27. Red Cytoscape BiNGO de componentes celulares enriquecidos ($p < 0.05$) en *Lasiodiplodia theobromae* incubado en sales de Vogel suplementado con glucosa al 5% + aceite de semilla de uva al 5%, determinados con prueba Hipergeométrica con corrección Benjamini y Hochberg. Círculos más grandes indican cantidad de genes dentro de la categoría. El color (graduado de blanco-azul-azul marino) del círculo indica significancia. Los p-valores más significativos (menores) están en azul marino, mientras los menos significativos en blanco, sin embargo, todos representan p-valor < 0.05 .

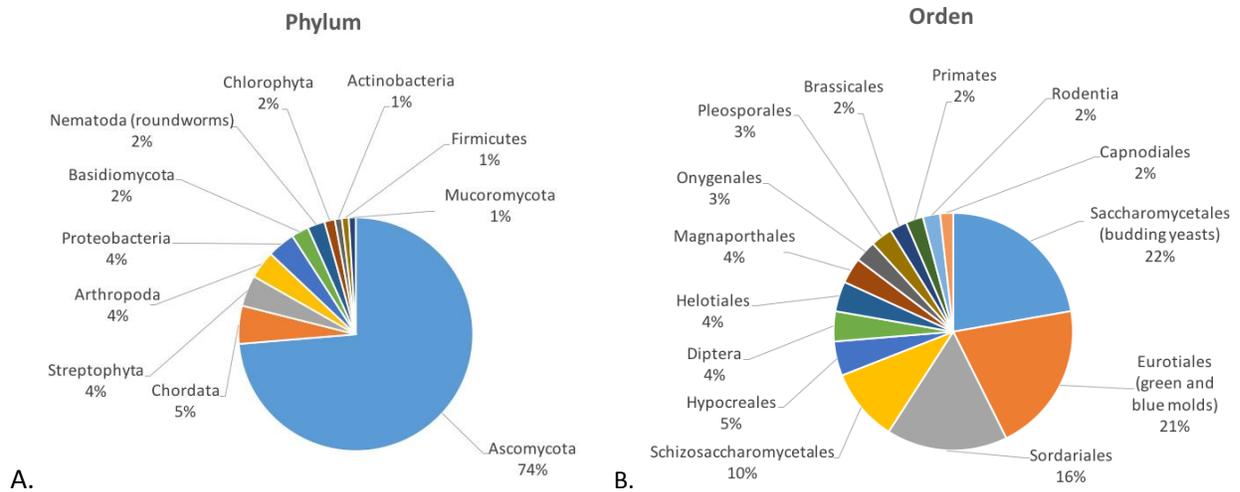


Figura 28. Representación taxonómica de las proteínas identificadas y validadas con análisis de fragmentación y búsqueda en la base de datos Uniprot que comparten homología con *Lasiodiplodia theobromae* incubado en sales de Vogel suplementado con glucosa al 5% y aceite de semilla de uva al 5%. A; Phylum de proteínas identificadas. B; Orden de proteínas identificadas.

También se realizaron búsquedas con la base de datos NCBI (Geer et al., 2009). Las secuencias de NCBI no están anotadas funcionalmente. La mayoría de las secuencias no tienen categorías de ontología genética establecidas, y las únicas evidencias de su función se establecen a través de homología de secuencias con proteínas caracterizadas funcionalmente. Por esta razón, los datos obtenidos con NCBI no arrojaron resultados en el análisis con Cytoscape BINGO, el cual detecta funciones enriquecidas en un conjunto de datos anotados e incluidos en el Gene Ontology Consortium bien anotadas con evidencias contundentes de funciones bioquímicas o moleculares. Se identificaron y validaron un total de 361 proteínas con 100% de confianza con el programa SearchGUI con una base de datos de NCBI incluyendo solamente secuencias proteicas de Botryosphaeriaceae hasta ahora secuenciadas. En la Tabla 5, se incluyen solamente las proteínas identificadas como “hipotéticas”, cuyas secuencias se utilizaron para buscar homólogos más cercanos a las secuencias proteicas identificadas (Tabla 6).

Tabla 6. Proteínas identificadas como “hipotéticas” por los algoritmos MSGF, X!Tandem, y OMSSA, buscadas manualmente con NCBI-BLAST. Se reporta el homólogo más probable de cada proteína identificada pero no anotada en *Lasiodiplodia theobromae*.

# Acceso	Descripción	PM [kDa]	Cobertura [%]	#Validados únicos	Confianza [%]	Validación	Secuencia homóloga (BLAST)
407929431	hypothetical protein MPH_00440 [Macrophomina phaseolina MS6]	79.5	10.0	1	100	Confiable	Neofusicoccum parvum UCRNP2 putative oligopeptidase family protein XM_007582002.1
407929156	hypothetical protein MPH_00684 [Macrophomina phaseolina MS6]	46.1	6.0	2	100	Confiable	Neofusicoccum parvum UCRNP2 putative protein mitochondrial targeting protein XM_007580308.1
407928922	hypothetical protein MPH_00885 [Macrophomina phaseolina MS6]	19.2	17.1	3	100	Confiable	Neofusicoccum parvum UCRNP2 putative phosphotransmitter protein ypd1 protein XM_007584095.1
407925824	hypothetical protein MPH_03925 [Macrophomina phaseolina MS6]	14.5	26.0	1	100	Confiable	Neofusicoccum parvum UCRNP2 putative -like antibiotic response protein XM_007582729.1
407922440	hypothetical protein MPH_07279 [Macrophomina phaseolina MS6]	14.7	9.9	2	100	Confiable	Neofusicoccum parvum UCRNP2 putative fk506-binding protein, XM_007581103.1
407921297	hypothetical protein MPH_08297 [Macrophomina phaseolina MS6]	35.1	12.3	3	100	Confiable	Neofusicoccum parvum UCRNP2 putative g-protein complex beta subunit protein XM_007582859.1
407920925	hypothetical protein MPH_08717 [Macrophomina phaseolina MS6]	22.1	23.4	7	100	Confiable	Neofusicoccum parvum UCRNP2 putative glycolipid transfer protein het-c2 protein XM_007581974.1
407916430	hypothetical protein MPH_13123 [Macrophomina phaseolina MS6]	15.3	21.2	4	100	Confiable	Neofusicoccum parvum UCRNP2 putative surface protein 1 protein XM_007588394.1

En cuanto a las proteínas relacionadas al metabolismo de ácidos grasos, se encuentran varias novedosas y poco estudiadas en los hongos filamentosos (Tabla 7). No se detectaron proteínas encargadas de su síntesis, pero sí varias encargadas de la regulación de ácidos grasos. Por ejemplo, se encuentran varias isoformas de la enzima málica (Rodríguez et al., 2012; Yang et al., 2014; Zhang et al., 2007), una proteína de importancia en la biosíntesis de ácidos grasos en hongos oleágenos como *Mortierella alpina*, hongo que se explota en la industria alimenticia por su síntesis del ácido araquidónico, propiciando la conversión de ácido málico a piruvato y regenerando NADH. Inclusive, se detectó la proteína “CoA binding protein” (Tabla 7), la cual es una proteína mitocondrial que vincula ésteres de ácidos grasos cortos y largos vinculados a coenzima A (CoA) y los transporta en la célula. La versión detectada en este trabajo pertenece a *Macrophomina phaseolina*. Proteínas potencialmente relacionadas a la producción de ésteres etílicos y metílicos de ácidos grasos incluyen la descarboxilasa de piruvato, varias isoformas de alcohol deshidrogenasas, metiltransferasas, y S-adenosilmetionina sintasa. De hecho, se encontró una aril-alcohol deshidrogenasa, la cual es de gran interés por la potencial degradación de lignina y en la biotecnología la producción de compuestos saborizantes (Bugg et al., 2011; Hernández-Ortega et al., 2012).

Otras proteínas de interés incluyen la proteína 14-3-3, que en levaduras, se conoce que se involucra en interacciones proteína: proteína con una variedad de actividades fisiológicas, pero en general, activan o reprimen la actividad de la proteína de la cual se vincula (van Heusden y Steensma, 2006), cambiando su morfología, ayudan a cambiar la localización celular de la proteína vinculada, y previene o induce interacciones entre proteínas que normalmente se vinculan. Uno de los procesos fisiológicos que regula es la meiosis, y en levaduras previene la entrada a meiosis (Sato et al., 2002).

Cabe mencionar que se detectaron varias proteínas encargadas de adherencia en el hospedero. La adherencia es un fenómeno patológico de gran importancia, pero poco explorado en *L. theobromae*. Una de las funciones enriquecidas detectadas fue adherencia de quinínógenos. En esta categoría, se detectó la enolasa homóloga a la misma de *Candida albicans* (Anexo 5, Tabla 5). Adicionalmente, se identificaron varias peptidasas, las cuales se conocen como factores de virulencia en hongos patógenos como *C. albicans* (Rapala-Kozik et al., 2015), especialmente las proteasas de tipo aspartil. En *L. theobromae* se detectaron proteasas de varios tipos, incluyendo del tipo aspartil (Tabla 7).

Una versión de la lectina cyanovirin-N se detectó, el cual es importante biotecnológicamente por su potencial uso como tratamiento anti-viral, en especial anti HIV (Percudani et al., 2005).

Tabla 7. Proteínas novedosas identificadas con una base de datos de Botryosphaeriaceae hasta ahora secuenciadas en la base de datos NCBI.

# Acceso NCBI	Uniprot ID	Nombre proteína	Homología en organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componente celular
407925133	K2RZL5	14-3-3 protein	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	N/A	N/A	N/A
407921114	K2SBP1	ABC transporter-like protein	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	N/A	ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]	N/A
821061031	A0A0G2E298	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (EC 2.3.1.12)	Diplodia seriata	pyruvate metabolic process [GO:0006090]	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase activity [GO:0004742]	mitochondrial matrix [GO:0005759]; pyruvate dehydrogenase complex [GO:0045254]
821057019	A0A0G2G7M3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	Diplodia seriata	Arp2/3 complex-mediated actin nucleation [GO:0034314]	N/A	Arp2/3 protein complex [GO:0005885]
407925510	K2R807	Alcohol dehydrogenase superfamily zinc-containing	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	peptidyl-lysine dimethylation [GO:0018027]; positive regulation of translational termination [GO:0045905]	oxidoreductase activity [GO:0016491]; protein-lysine N-methyltransferase activity [GO:0016279]; zinc ion binding [GO:0008270]	cytosol [GO:0005829]; nucleus [GO:0005634]

407923645	K2RVH4	Alcohol dehydrogenase superfamily zinc-containing	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	N/A	oxidoreductase activity [GO:0016491]; zinc ion binding [GO:0008270]	N/A
Tabla 7. Continuación.						
# Acceso NCBI	Uniprot ID	Nombre proteína	Homología en organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componente celular
407916996	K2R7K7	ArgE/DapE/ACY1/C PG2/YscS conserved site	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	N/A	dipeptidase activity [GO:0016805]; metallopeptidase activity [GO:0008237]	N/A
407922763	K2RSZ5	CoA-binding protein	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	metabolic process [GO:0008152]	cofactor binding [GO:0048037]; ligase activity [GO:0016874]	mitochondrion [GO:0005739]
407917814	K2QMM6	Coproporphyrinogen III oxidase aerobic	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	porphyrin-containing compound biosynthetic process [GO:0006779]	coproporphyrinogen oxidase activity [GO:0004109]	N/A
407924884	K2S5S8	Cytochrome P450	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	N/A	heme binding [GO:0020037]; iron ion binding [GO:0005506]; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen [GO:0016705]	N/A

821068650	AOA0G2ELW 6	Formate dehydrogenase (FDH) (EC 1.2.1.2) (NAD-dependent formate dehydrogenase)	Diplodia seriata	formate catabolic process [GO:0042183]	formate dehydrogenase (NAD+) activity [GO:0008863]; NAD binding [GO:0051287]; oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor [GO:0016616]	cytoplasm [GO:0005737]
-----------	----------------	--	------------------	--	--	------------------------

Tabla 7. Continuación.

# Acceso NCBI	Uniprot ID	Nombre proteína	Homología en organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componente celular
407918539	K2S4Y4	Inositol monophosphatase	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	Phosphatidyl inositol phosphorylation [GO:0046854]; sulfate assimilation [GO:0000103]	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase activity [GO:0008441]; inositol-1,3,4-trisphosphate 1-phosphatase activity [GO:0052829]; inositol-1,4-bisphosphate 1-phosphatase activity [GO:0004441]	cytosol [GO:0005829]; nucleus [GO:0005634]
407924223	K2RX20	K-like protein	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	3'-UTR-mediated mRNA stabilization [GO:0070935]; negative regulation of MAPK cascade [GO:0043409]	mRNA 3'-UTR AU-rich region binding [GO:0035925]	cytosol [GO:0005829]
485923371	R1ELB0	Malic enzyme	Botryosphaeria parva (strain UCR-NP2) (Grapevine canker fungus) (Neofusicoccum parvum)	malate metabolic process [GO:0006108]	malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD+) activity [GO:0004471]; metal ion binding [GO:0046872]; NAD binding [GO:0051287]	N/A
407917511	K2RD18	Methionine synthase vitamin-B12 independent	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	adenine biosynthetic process [GO:0046084]; L-methionine biosynthetic process from homoserine via O-acetyl-L-homoserine and cystathionine [GO:0019280]	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase activity [GO:0003871]; zinc ion binding [GO:0008270]	cytosol [GO:0005829]; nucleus [GO:0005634]

407920182	K2RT56	Methyltransferase type 11	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	N/A	methyltransferase activity [GO:0008168]	N/A
-----------	--------	---------------------------	--	-----	---	-----

Tabla 7. Continuación.

# Acceso NCBI	Uniprot ID	Nombre proteína	Homología en organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componente celular
407924727	K2RYG0	Pathogenesis associated protein Cap20, putative	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	N/A	N/A	N/A
407924694	K2R5R4	Peptidase A1	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	N/A	aspartic-type endopeptidase activity [GO:0004190]	fungal-type vacuole [GO:0000324]
407925131	K2SN01	Peptidase M16	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	N/A	catalytic activity [GO:0003824]; metal ion binding [GO:0046872]	mitochondrion [GO:0005739]
407923388	K2S1U2	Peptidase S41	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	N/A	serine-type peptidase activity [GO:0008236]	N/A

407921893	K2RXV9	Peptidase S8/S53 subtilisin/kex in/sedolisin	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	N/A	serine-type endopeptidase activity [GO:0004252]	N/A
407922528	K2SFN6	Prohibitin	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	inner mitochondrial membrane organization [GO:0007007]; metabolic process [GO:0008152]; mitochondrion inheritance [GO:0000001]; mitochondrion morphogenesis [GO:0070584]; negative regulation of proteolysis [GO:0045861]; protein folding [GO:0006457]; replicative cell aging [GO:0001302]	carbon-sulfur lyase activity [GO:0016846]	mitochondrial inner membrane [GO:0005743]

Tabla 7. Continuación.

# Acceso NCBI	Uniprot ID	Nombre proteína	Homología en organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componente celular
407922528	K2SFN6	Prohibitin	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	inner mitochondrial membrane organization [GO:0007007]; metabolic process [GO:0008152]; mitochondrion inheritance [GO:0000001]; mitochondrion morphogenesis [GO:0070584]; negative regulation of proteolysis [GO:0045861]; protein folding [GO:0006457]; replicative cell aging [GO:0001302]	carbon-sulfur lyase activity [GO:0016846]	mitochondrial inner membrane [GO:0005743]
821061800	A0A0G2E4F7	Putative alcohol dehydrogenase	Diplodia seriata	N/A	oxidoreductase activity [GO:0016491]; zinc ion binding [GO:0008270]	N/A
821068616	A0A0G2GJP9	Putative alcohol dehydrogenase 1	Diplodia seriata	N/A	oxidoreductase activity [GO:0016491]; zinc ion binding [GO:0008270]	N/A
821064119	A0A0G2G6P8	Putative aryl-alcohol dehydrogenase	Diplodia seriata	N/A		N/A

Tabla 7. Continuación.

# Acceso NCBI	Uniprot ID	Nombre proteína	Homología en organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componente celular
821058531	AOA0G2DVN7	Putative calmodulin	Diplodia seriata	N/A	calcium ion binding [GO:0005509]	N/A
485920226	R1EEV7	Putative cofilin protein	Botryosphaeria parva (strain UCR-NP2) (Grapevine canker fungus) (Neofusicoccum parvum)	actin filament depolymerization [GO:0030042]	N/A	actin cytoskeleton [GO:0015629]
485926166	R1GQI8	Putative cyanovirin-n family protein	Botryosphaeria parva (strain UCR-NP2) (Grapevine canker fungus) (Neofusicoccum parvum)	N/A	N/A	N/A
485918828	R1G1Q3	Putative epl1 protein	Botryosphaeria parva (strain UCR-NP2) (Grapevine canker fungus) (Neofusicoccum parvum)	N/A	N/A	N/A
821062741	AOA0G2GMJ2	Putative glucose-methanol-choline oxidoreductase:gmc oxidoreductase	Diplodia seriata	N/A	flavin adenine dinucleotide binding [GO:0050660]; oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors [GO:0016614]	N/A

Tabla 7. Continuación.

# Acceso NCBI	Uniprot ID	Nombre proteína	Homología en organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componente celular
821072397	A0A0G2GVV3	Putative gpi-anchored cell wall organization protein ecm33	Diplodia seriata	N/A	N/A	N/A
821060882	A0A0G2GHC2	Putative pyruvate decarboxylase	Diplodia seriata	N/A	carboxy-lyase activity [GO:0016831]; magnesium ion binding [GO:0000287]; thiamine pyrophosphate binding [GO:0030976]	N/A
821073855	A0A0G2F1T5	Putative vesicular-fusion protein sec17	Diplodia seriata	intracellular protein transport [GO:0006886]	N/A	intracellular [GO:0005622]
485925072	R1EQ74	Putative-like antibiotic response protein	Botryosphaeria parva (strain UCR-NP2) (Grapevine canker fungus) (Neofusicoccum parvum)	N/A	N/A	N/A
407927854	K2S746	S-(hydroxymethyl) glutathione dehydrogenase (EC 1.1.1.284)	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	amino acid catabolic process to alcohol via Ehrlich pathway [GO:0000947]; ethanol oxidation [GO:0006069]; formaldehyde catabolic process [GO:0046294]; furaldehyde metabolic process [GO:0033859]	alcohol dehydrogenase (NAD) activity [GO:0004022]; hydroxymethylfurfural reductase (NADH) activity [GO:0033833]; S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase activity [GO:0051903]; zinc ion binding [GO:0008270]	cytosol [GO:0005829]; nucleus [GO:0005634]

Tabla 7. Continuación.

# Acceso NCBI	Uniprot ID	Nombre proteína	Homología en organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componente celular
8210645 54	A0A0G2 E9Z5	Saccharopine dehydrogenase [NAD(+), L-lysine-forming] (SDH) (EC 1.5.1.7) (Lysine--2-oxoglutarate reductase)	Diplodia seriata	lysine biosynthetic process via amino adipic acid [GO:0019878]	saccharopine dehydrogenase (NAD+, L-lysine-forming) activity [GO:0004754]	N/A
4079296 21	K2S692	S-adenosyl methionine synthase (EC 2.5.1.6)	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	methionine metabolic process [GO:0006555]; one-carbon metabolic process [GO:0006730]; S-adenosyl methionine biosynthetic process [GO:0006556]	ATP binding [GO:0005524]; metal ion binding [GO:0046872]; methionine adenosyltransferase activity [GO:0004478]	cytosol [GO:0005829]; nucleus [GO:0005634]
4079249 03	K2RT45	Uncharacterized protein	Macrophomina phaseolina (strain MS6) (Charcoal rot fungus)	cellular calcium ion homeostasis [GO:0006874]; proteasome storage granule assembly [GO:1902906]; vacuolar acidification [GO:0007035]	ATP binding [GO:0005524]; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism [GO:0046961]	fungus-type vacuole membrane [GO:0000329]; vacuolar proton-transporting V-type ATPase, V1 domain [GO:0000221]

La secuenciación *de novo* arrojó 5983 péptidos homólogos con alguna proteína en la base de datos Uniprot utilizando DeNovoGUI. Se confirmaron los resultados de la identificación por medio de análisis de fragmentación, el cual identificó la ankyrina POTE, siendo esto una avenida nueva de investigación sobre la función del citoesqueleto, y su relación con la membrana plasmática del hongo (Tabla 8). También se confirmó la presencia de un péptido homólogo a la enolasa de *C. albicans* anteriormente mencionada.

Estos resultados sí arrojaron varios tipos de lipasas y proteínas de gran interés por su potencial y novedad (Tabla 8). Las lipasas que se encontraron son homólogos de bacteria y hasta de humanos, indicando un nivel de conservación alto entre estas proteínas. En relación a la regulación de lípidos, se encontraron varios péptidos homólogos a las flipasas, las cuales se encargan de intercambiar fosfolípidos entre las dos caras de las membranas plasmáticas con un mecanismo dependiente de ATP.

De proteínas secuenciadas *de novo*, se encontraron varias proteínas que no se esperaban encontrar, especialmente porque son homólogas a toxinas, tanto de medusas como de escorpión y víboras. Sorprendentemente, se encontraron varios péptidos homólogos a componentes encontrados en el veneno de víboras. Especialmente representadas son unas metaloproteinasas dependientes de zinc. Enolasas alergénicas también se detectaron por medio de secuenciación *de novo*, e inclusive proteínas homólogas al complemento humano, miembros del sistema inmunológico humano (Tabla 8). Inclusive, se encontraron péptidos homólogos a peptidasas de serina, aparte de peptidasas de tipo aspartil.

Tabla 8. Secuenciación *de novo* de péptidos de *Lasiodiplodia theobromae* (cepa UCD256Ma) incubado en aceite de semilla de uva (5%) y glucosa (5%) en sales de Vogel por 20 días, y búsqueda con el algoritmo BLASTp de la base de datos Uniprot entera.

Péptidos secuenciados de <i>L. theobromae</i>	-10logP Péptido	m/z	E-valor BLASTp	Uniprot ID	Organismo	Nombre de la proteína
YGMKWSLLMLAAGGGR	54.8	863.9	5.4	Q5XJ13	Danio rerio (Zebrafish) (Brachydanio rerio)	Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 6 (Ankyrin repeat domain-containing protein 14) (SamCystin)
LMAAWGQNGQAALYV EWNPEVMSAVWK	37.10	1054.8	1.2	Q68DC2	Homo sapiens (Human)	Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 6 (Ankyrin repeat domain-containing protein 14) (SamCystin)
LGAKWCHHCFAVPMK	19.9	929.4	0.95	Q6S8J3	Homo sapiens (Human)	POTE ankyrin domain family member E (ANKRD26-like family C member 1A) (Prostate, ovary, testis-expressed protein on chromosome 2) (POTE-2)
SAPDPGTGDEVVMGQM DPR	37.1	658.9	4.8	P42211	Oryza sativa subsp. japonica (Rice)	Aspartic proteinase (EC 3.4.23.-)
PAYHDLGVVPMADTR	41.7	821.4	9.2	Q8VYV9	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)	Aspartyl protease family protein 1 (EC 3.4.23.-)
ALKGFYLMNPPAPVWW TR	49.6	716.4	5.6	B8I4B9	Clostridium cellulolyticum	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH (EC 3.4.24.-)
LAAPNPYLWHDLVPR	40.5	974.5	6.7	Q2EEX7	Helicosporidium sp. subsp. Simulium jonesii	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH homolog
TLVAGFFFLAASLTCLLVP SEAPTFSETTR	45.0	812.4	1.8	Q9HDT3	Alternaria alternata	Enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (2-phosphoglycerate dehydratase) (Allergen Alt a 11) (Allergen Alt a 5) (Allergen Alt a XI)
ELGAHTLGFLESNPKFDP GSYEQLADLYK	53.2	1080.5	1.7	Q96X30	Neosartorya fumigata ((Aspergillus fumigatus)	Enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (2-phosphoglycerate dehydratase) (allergen Asp f 22)
ELKAKKVGAMDVASSEFY K	52.7	701.04	1.5	P30575	Candida albicans	Enolase 1 (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (2-phosphoglycerate dehydratase)
HCLAAVPCMGQSPAAAA LLNSSEVQNMAMGFK	40.4	1025.5	1.6	Q59121	Arcanobacterium haemolyticum	Phospholipase D (EC 3.1.4.4) (Choline phosphatase) (PLD-A)

Tabla 8. Continuación.

Péptidos secuenciados <i>de novo</i> de <i>L. theobromae</i>	-10logP Péptido	m/z	E-valor BLASTp	Uniprot ID	Organismo	Nombre de la proteína
VFRLKDSGNSKPKAAP PPGPLPR	29.2	848.8	8.3	O14939	Homo sapiens (Human)	Phospholipase D2 (PLD 2) (hPLD2) (EC 3.1.4.4) (Choline phosphatase 2) (PLD1C) (Phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D2)
LHMGTDCAELDCVRSAPK	33.2	687.3	4.5	Q9LI83	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)	Phospholipid-transporting ATPase 10 (AtALA10) (EC 3.6.3.1) (Aminophospholipid flippase 10)
DTVAVDFSWLPVVDPR	11.4	605.9	7.9	Q5BL50	Xenopus tropicalis (Western clawed frog)	Phospholipid-transporting ATPase IC (EC 3.6.3.1) (ATPase class I type 8B member 1) (P4-ATPase flippase complex alpha subunit atp8b1)
DDGSMDTCEDDGAGR	43.1	808.8	8.6	Q7RTY9	Homo sapiens (Human)	Serine protease 41 (EC 3.4.21.-) (Testis serine protease 1) (TESSP-1)
ELGFLASLGWNAPPAFPGPEL TALDKLSAALSNR	28.7	1175.2	2	Q8T9W1	Dictyostelium discoideum (Slime mold)	Serine protease/ABC transporter B family protein tagD (EC 3.4.21.-) (Serine protease/ABC transporter tagD)
QETSVPGDSQATLDALNEWRR	66.5	739.7	1.6	Q10749	Naja mossambica (Mozambique spitting cobra)	Snake venom metalloproteinase-disintegrin- like mocarhagin (MOC) (Mocarhagin-1) (SVMP) (EC 3.4.24.-) (Zinc metalloproteinase)
LLGTAMHVAGHLCAMMGWYR LTPSLHK	17.0	1033.8	4.6	J3RY93	Crotalus adamanteus	Snake venom serine proteinase 12 (SVSP) (EC 3.4.21.-)
WLSAKGWAQGVAEKGDPR	35.9	991.5	7.7	P0DL42	Daboia siamensis (Eastern Russel's viper)	Snake venom vascular endothelial growth factor toxin VR-1' (svVEGF) (VEGF-F)
DPGFLGLTASGKFGEGDPH AKTSGLNK	40.0	1010.5	0.21	A7L035	Chironex fleckeri (Box jellyfish)	Toxin CfTX-1 (Toxin 1)

Tabla 8. Continuación.

Péptidos secuenciados de novo de <i>L. theobromae</i>	-10logP Péptido	m/z	E-valor BLASTp	Uniprot ID	Organismo	Nombre de la proteína
TLMGYLLAVDGCALGCFFVM PGLGLVAALSK	28.3	815.9	3.2	P60262	Tityus discrepans (Venezuelan scorpion)	Toxin TdII-3 (Fragment)
DYPPVLEHLLAWEEEQR	19.0	708.7	7	B2MVK7	Rhynchium brunneum (Potter wasp)	Venom allergen 5 (Antigen 5) (Cysteine-rich venom protein) (CRVP)
VLTVKGSCNLTMLVSFWTFS GNLTNGASTGSHK	37.4	1172.3	5.7	C0ITL3	Pachycondyla chinensis (Asian needle ant)	Venom allergen 5 (Antigen 5) (Cysteine-rich venom protein) (CRVP) (allergen Pac c 3) (Fragment)
VHPPRPLEVWRKDMEMKK	10.10	770.1	3.1	B2D0J5	Apis mellifera (Honeybee)	Venom carboxylesterase-6 (EC 3.1.1.1) (allergen Api m 8)
MLPAFLVDVHHSKKGVP NYYYQHSK	15.10	793.4	7.1	P83370	Hoplocephalus stephensii (Stephens' banded snake)	Venom prothrombin activator hopsarin-D (vPA) (EC 3.4.21.6) (Venom coagulation factor Xa-like protease) [Cleaved into: Hopsarin-D light chain; Hopsarin-D heavy chain]
APTPALDGGKLMFVSAK	38.6	568.3	0.63	Q5WFT5	Bacillus clausii (strain KSM-K16)	Zinc metalloprotease RasP (EC 3.4.24.-) (Regulating alternative sigma factor protease) (Regulating anti-sigma-W factor activity protease)
LASHKPNCFAPPLGTHDVVPK	34.5	800.1	6	B8K1W0	Daboia russelii (Russel's viper) (Vipera russelii)	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like daborhagin-K (EC 3.4.24.-) (Haemorrhagic metalloproteinase russelysin) (Snake venom metalloproteinase) (SVMP)
VDSDFTVGLAAQWAETDLYK	49.3	743.7	7	C5H5D6	Lachesis muta rhombeata (Bushmaster)	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like lachestatin-2 (EC 3.4.24.-) (Snake venom metalloprotease) (SVMP) (Vascular apoptosis-inducing protein-like) (VAP-like)

Tabla 8. Continuación.

Péptidos secuenciados <i>de novo</i> de <i>L. theobromae</i>	-10logP Péptido	m/z	E-valor BLASTp	Uniprot ID	Organismo	Nombre de la proteína
DLADALKAAMGAPKHAVDHVA EPMDVAQLAPGNK	36.9	867.7	4.2	P06681	Homo sapiens (Human)	Complement C2 (EC 3.4.21.43) (C3/C5 convertase) [Cleaved into: Complement C2b fragment; Complement C2a fragment]
NTLHAPEGTVVHLNAHK	54.2	919.5	8.7	P98094	Eptatretus burgeri (Inshore hagfish)	Complement C3 [Cleaved into: Complement C3 beta chain; Complement C3 alpha chain; C3a anaphylatoxin; Complement C3 gamma chain] (Fragment)
HNDRCPCMCNCQNDDC RCDTSNVPAK	16.2	825.8	6.3	Q00685	Lethenteron camtschaticum (Japanese lamprey) (Lampetra japonica)	Complement C3 [Cleaved into: Complement C3 beta chain; Complement C3 alpha chain; C3a anaphylatoxin; Complement C3 gamma chain] (Fragment)
SWFVNVPNCDGALAGMTASFVR	30.9	800.4	9.7	P01031	Homo sapiens (Human)	Complement C5 (C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 4) [Cleaved into: Complement C5 beta chain; Complement C5 alpha chain; C5a anaphylatoxin; Complement C5 alpha chain]
KDLKYLDVYYWRYFWKWR QVDYLVAPAK	22.6	928.9	4.1	P15304	Rattus norvegicus (Rat)	Hormone-sensitive lipase (HSL) (EC 3.1.1.79)

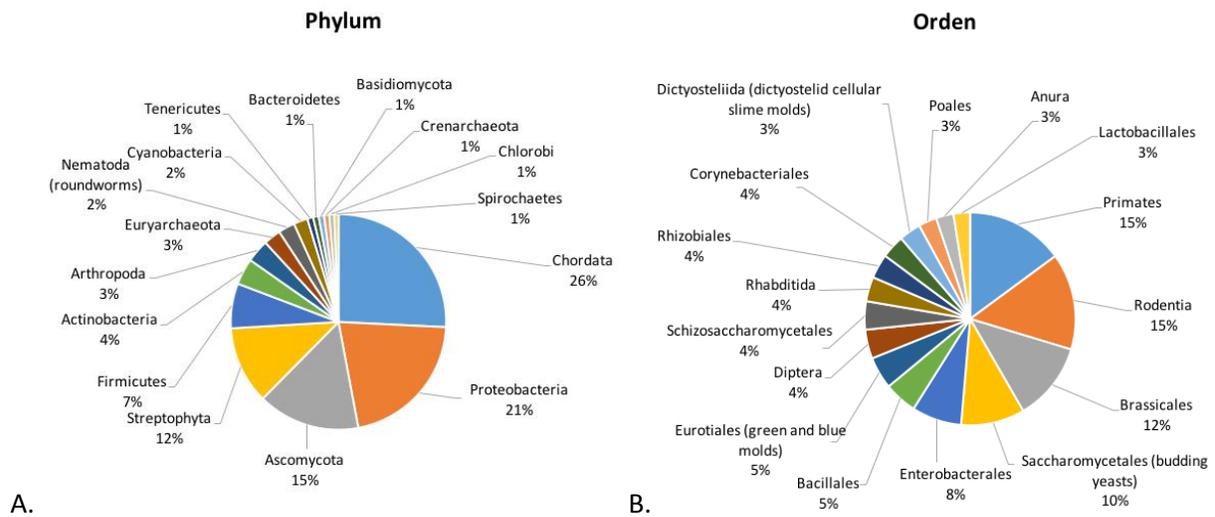


Figura 29. Distribución taxonómica de péptidos secuenciados *de novo* de *Lasiodiplodia theobromae* utilizando el programa DeNovoGUI y los algoritmos Novor y PepNovo. Se muestran los homólogos más probables determinados con una búsqueda con BLASTp de la base de datos Uniprot.

La taxonomía de los péptidos identificados por secuenciación *de novo* arrojaron resultados distintos que la búsqueda por identificaciones por medio de análisis de fragmentación dependiente de la base de datos Uniprot (Figura 29). Los Phylum más representados en la secuenciación *de novo* fueron Chordata, Proteobacteria y Ascomycota, mientras que en el análisis de fragmentación los Phylum más representados fueron los Ascomycota, Streptophyta y Basidiomycota (Figura 28). Sin embargo, los dos métodos de análisis del peptidoma arrojaron a los Ascomycota como uno de los grupos más representados.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Producción de ésteres de ácidos grasos en *L. theobromae* y otros hongos

Los ácidos grasos y ácidos grasos modificados son moléculas importantes durante la colonización de plantas por los hongos fitopatógenos. Su liberación y modificación por medio de lipasas por el hongo tiene varias funciones aparentes: como fuentes de energía, moléculas de señalización, y/o factores de virulencia (Pohl et al., 2011). En este trabajo se identificó a los ésteres de ácidos grasos como compuestos producidos en la presencia de ácidos grasos exógenos. Este es el primer trabajo en donde se describe la producción en *L. theobromae* de una variedad de ésteres de ácido grasos; así como en otra especie de las Botryosphaeriaceae, *N. parvum*, y en la especie no-patógena, *T. asperellum*. En 1971 detectaron ésteres de ácido grasos producidos por *Rhizopus arrhizus*, un patógeno de planta y humano (Laseter y Weete, 1971). En el estudio de Laseter y Weete, detectaron ácidos grasos metilados en su mayoría con un patrón y variedad distinta a los de *L. theobromae* detectados en este trabajo. Las Botryosphaeriaceae estudiadas en este trabajo producen una mezcla de ácidos grasos esterificados que es, en efecto, biodiesel, o mycodiesel (Strobel, 2014). En los estudios de este tipo en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), donde realizaron análisis de producción de ésteres de ácidos grasos en mosto de uva (Yunoki et al., 2007), se encontró una potencial producción de 59 μ M LAEE en 20 días por *S. cerevisiae*, mientras que en este trabajo detectamos 7.7 mM LAEE producido por *L. theobromae* después de 20 días, es decir, 130 veces más se produjo por *L. theobromae*.

Dos especies de la familia Botryosphaeriaceae fueron capaces de producir una variedad más amplia y cantidades mayores de ésteres de ácidos grasos que los otros hongos estudiados. La producción de ésteres de ácidos grasos en *T. asperellum* resultó más baja que en *L. theobromae* y *N. parvum* tanto con triglicéridos como en lecitina de soya (lípidos estructurales) como fuente de carbono. Los ácidos grasos esterificados que afectaron el crecimiento en tabaco se produjeron en mayor abundancia en las Botryosphaeriaceae, y apenas se distinguieron en los otros hongos analizados. Por ejemplo, SAEE no se produjo por *T. asperellum*, y *F. oxysporum* produjo más PAEE que *T. asperellum* (Tabla 3). Estas diferencias en metabolismo de ácidos grasos son un factor que diferencia a los hongos de enfermedades de madera (Botryosphaeriaceae) de otros hongos fitopatógenos como *F. oxysporum* (patógeno de tomate), o de hongos no-patógenos como *T. asperellum*.

PAEE se produjo *de novo* por *L. theobromae* en la presencia de glucosa como la única fuente de carbono en medio mínimo de Vogel, y en medio mínimo MM9, LAEE se detectó haberse producido *de novo*.

4.2 Efectos de ésteres de ácidos grasos en planta

Se determinó que LAEE y SAEE tienen efectos fisiológicos significativos en el modelo de plantas *N. tabacum*, actuando como reguladores de germinación y crecimiento temprano de la plántula, similarmente al ácido giberélico, hasta una concentración de 1 µg/mL y hasta 98 ng/mL en el caso de LAEE y SAEE. En 1960, Stowe (Stowe, 1960) reportó la capacidad de los ésteres de ácidos grasos metílicos y etílicos de estimular el crecimiento de tallos de chícharo en una solución con ácido giberélico y ácido indoloacético exógenos, proponiendo que los ácidos grasos esterificados actúan en sinergia con estos reguladores de crecimiento de plantas. Desde entonces no se han publicado estudios explorando este fenómeno más a fondo. En este trabajo, no se agregaron reguladores de crecimiento exógenos al medio de crecimiento (sales de MS) durante la germinación y crecimiento temprano de *N. tabacum*, indicando que ciertos ácidos grasos esterificados poseen la habilidad de regular procesos de crecimiento, independientemente de los reguladores de crecimiento de plantas. Faltan estudios para comprender las rutas fisiológicas afectadas en la planta, pero se propone en este trabajo que LAEE y SAEE se consideren reguladores de crecimiento de plantas y factores de virulencia debido a su habilidad de afectar la germinación de *N. tabacum* y el crecimiento temprano de la plántula, aparte de la morfología de las primeras hojas verdaderas. En las plantas crecidas en hidroponía, se observó inhibición de crecimiento cuando las plántulas se sometieron a 1 µg/mL de LAEE, LA, y SAEE. Sin embargo, el PAEE tuvo la habilidad de inducir el crecimiento de las hojas verdaderas de manera significativa en hidroponía, en comparación con el control negativo, superando, inclusive, al ácido giberélico, lo cual es más evidencia de su acción como reguladores de crecimiento novedosos.

Puede que los ácidos grasos esterificados estén actuando en una variedad de procesos de crecimiento o virulencia en planta. En otros eucariotas, por ejemplo en humanos, se ha reportado que están relacionados con la activación de receptores de hormonas de tipo esteroide (Schmidt et al., 1996), o la inducción de apoptosis (Aydin et al., 2005). En abejas, el oleato etílico actúa como hormona de crecimiento, causando que las abejas queden en su estado de nodrizas, las cuales funcionan solamente para cuidar y nutrir a la abeja reina. Previene el cambio fisiológico de las abejas que las convierte en abejas forrajeras (Castillo et al., 2012). Inclusive, se sabe que el PAEE induce necrosis en el páncreas de humanos después de consumir alcohol (Criddle et al., 2015, 2006, 2004). LAEE y SAEE han sido extraídos de plantas

como ajo (*Allium sativum*) (Park et al., 2014), la flor *Oxalis triangularis* (Huh et al., 2010), y la planta medicinal *Moringa oleifera* (Inbathamizh y Padmini, 2012), entre otras, indicando que al menos estos ésteres de ácidos grasos participan en algún proceso fisiológico específico en plantas.

Se ha estudiado la fermentación en las plantas, especialmente en el polen. En estudios del crecimiento de tubos de polen en la flor *Petunia hybrida*, Gass et al. (2005) demostraron el hecho que la piruvato descarboxilasa es la enzima fermentativa más importante en el crecimiento del tubo germinativo, concediéndole una ventaja en crecimiento (aumento de tasa de crecimiento), vinculada a la alta producción de etanol durante la germinación de polen (Gass et al., 2005). La enzima piruvato deshidrogenasa también se expresa altamente en el polen (Thelen et al., 1999). Por lo tanto, la maquinaria biosintética que conduce a la producción de ésteres de ácidos grasos en las plantas y hongos, probablemente incluye la descarboxilasa de piruvato, deshidrogenasa de alcohol, y lipasas (Grahl et al., 2011; Or, 2009a).

Similarmente, las plantas tienen la habilidad de fermentar la glucosa para producir energía durante la floración, aparte de durante el desarrollo del polen (Proels et al., 2011; Selinski and Scheibe, 2014; Zabalza et al., 2008), con unas de las ventajas de la fermentación siendo la producción de NADH (Gass et al., 2005). Como la producción de etanol es un proceso anaeróbico, uno de los contextos que propician su producción es bajo nivel de oxígeno. Por ejemplo, se sabe que los niveles de oxígeno en el ovario de las plantas están en cero (Linskens and Schrauwen, 1966). Otra causa de niveles bajos de oxígeno en la planta es el exceso de agua alrededor de las raíces (Blokhina et al., 2003). Sin embargo, la hipoxia también es parte de la latencia invernal y liberación de latencia en *V. vinifera* (Or, 2009b) y otros árboles frutales, con la producción de glucósidos cianogénicos y la hidrólisis de almidón de almacenamiento ligado al comienzo de la floración (Gleadow and Woodrow, 2000; Sánchez-Pérez et al., 2014). La hipoxia se induce químicamente en la agricultura en vid y otros árboles para estimular la brotación artificialmente con el uso de cianamida de hidrógeno, aumentando así el rendimiento frutal (Rubio et al., 2014).

En este trabajo, se propone que la práctica mundial de utilizar cianamida de hidrógeno para aumentar el rendimiento frutal puede estar contribuyendo al aumento de enfermedades en plantas debido a hongos fitopatógenos como las Botryosphaeriaceae. El método de acción de la cianamida de hidrógeno es de inducir hipoxia y un estado oxidativo artificialmente en la planta, por medio de la inhibición de la catalasa,

así estimulando la brotación de yemas frutales en zonas de climas en las cuales la dormancia no alcanza a desarrollarse por falta de temperaturas las suficientemente bajas, como es el caso de Baja California y Sonora, México (Lavee and May, 1997). *L. theobromae* tiene una fase endofítica en la planta, sufriendo periodos de latencia y/o dormancia naturales (estados hipóxicos) como también hipoxia inducida químicamente en *V. vinifera* u otros árboles, los cuales pueden estar produciendo un hábitat que esté promoviendo la fermentación anaeróbica, resultando en la producción de etanol y otros alcoholes utilizados por las lipasas para esterificarlas a los ácidos grasos libres.

La fermentación en Botryosphaeriaceae es un proceso poco estudiado, y la relación entre la fermentación y la patogenia no se ha estudiado a fondo en hongos filamentosos en general. La fermentación es un proceso mejor estudiado en hongos utilizados en la producción de productos de consumo económicamente importantes, como la levadura *S. cerevisiae*, utilizado en la producción de cerveza y vino, etc. En respecto a estudios de la habilidad de producir etanol, se han realizado estudios de *Rhizopus* spp. y de *Aspergillus* spp., comparando diez cepas de varias especies de cada género, y se encontró que especies de *Rhizopus* fueron más eficientes en la producción de etanol (Skory et al., 1997).

En cuanto a las proteínas clave en la fermentación, la enzima piruvato descarboxilasa es la más importante en el hongo, produciendo acetaldehído desde el substrato piruvato, el cual se convierte en alcohol por la enzima alcohol deshidrogenasa, aparte de entrar en otras rutas metabólicas relacionadas a la síntesis de lípidos. Se ha encontrado que la piruvato descarboxilasa tiene un papel importante en la biosíntesis y acumulación de lípidos en el micelio aéreo del hongo fitopatógeno *Gibberella zeae* (Son et al., 2012), y es requerido para la expresión de la sintasa de acetil CoA-1 (ACS1). Inclusive, tanto PDC-1 como ACS-1 se requieren para la formación de peritecios en *G. zeae*. Esto está de acuerdo con lo que se encontró en el hongo *Rhizopus arrhizus*, donde se correlaciona la producción de micelio aéreo con la producción de etanol durante el crecimiento (Lawler y Weber, 1980).

La observación que los ácidos grasos esterificados cambiaron a mayoritariamente metilados involucra otros procesos metabólicos aparte de la fermentación, el cual incluye S-adenosilmetionina sintasa y metiltransferasas. La producción de estas proteínas se verificó con la proteómica en este trabajo. Aunque este proceso no está bien descrito en hongos, se sabe que en mamíferos esterifican un grupo metilo a los ácidos grasos libres (Aleryani et al., 2005; Zatz et al., 1981) y la detección de ésteres de ácidos grasos metilados en la sangre de humanos significa disfunción del hígado. En hongos, se ha reportado que la S-

adenosilmetionina sintasa es un regulador del metabolismo secundario en *Aspergillus nidulans* (Gerke et al., 2012), forma parte del complejo Velvet, y la delección de S-adenosilmetionina sintasa es letal para este hongo.

El haber detectado (tentativamente) un éster de ácido graso *trans* (elaidato de etilo) en las dos Botryosphaeriaceae (*L. theobromae* y *N. parvum*) es de interés, ya que ningún ácido graso *trans* se ha reportado en la literatura como producido por las Botryosphaeriaceae. Falta esclarecer su papel fisiológico y su producción por *L. theobromae*. Cabe mencionar que no se encontró el elaidato de etilo en el patógeno de tomate *F. oxysporum* ni en el no-patógeno *T. asperellum*, marcando de nuevo, una diferencia entre las Botryosphaeriaceae y otros hongos filamentosos que puede estar relacionada a la virulencia. Inclusive, solo se formó en las Botryosphaeriaceae incubadas en la combinación de glucosa y aceite de semilla de uva, indicando la fuente de carbono como importante en su formación. El hecho de que se encontró en el control positivo (aceite de semilla de uva esterificada con etanol), indica un mecanismo no-enzimático en su producción en este caso. Está reportado que la isomerización *cis-trans* de los dobles enlaces puede ocurrir a través de los radicales libres, provenientes de radicales tiilo (Chatgialloglu and Ferreri, 2005; Ferreri et al., 2005).

La habilidad de hongos fitopatógenos de manipular el crecimiento se ha observado en el hongo patógeno de arroz, *Gibberella fujikuroi*, que se sabe produce el ácido giberélico. El hongo *Botrytis cinerea*, produce el ácido abscísico (Siewers et al., 2004; Zak, 1976). En este trabajo, se propone que la producción de ésteres de ácidos grasos a destiempo puede estar afectando el crecimiento de la planta, y en efecto, unos de los síntomas en *V. vinífera* es estatura reducida, por lo que la acción de la fermentación puede estar contribuyendo a este síntoma, en parte a través de la producción de ésteres de ácidos grasos.

4.3 Proteómica

Con los datos masivos que se obtuvieron en este trabajo, el estudio de categorías ontológicas enriquecidas fue indispensable para identificar proteínas de interés, especialmente para encontrar proteínas con potencial uso biotecnológico, o como blancos nuevos para el diseño de nuevos y mejores antifúngicos. Con la prueba hipergeométrica se detectó enriquecida la categoría de adherencia a quinínogenos. En esta categoría, se encontró la enolasa homóloga de *Candida albicans* (Anexo 5, Tabla 5). Esto es de gran interés

porque la enolasa es necesaria para la adherencia y colonización del epitelio del intestino humano, y se encuentra en las biopelículas de *C. albicans* (Silva et al., 2014). Aparte, según Silva et al. (2004) es un alergénico fuerte en humanos, provocando respuesta inmune significativa, y mediada por IgE (Horner et al., 1995). Los “quininógenos”, en humanos, son proteínas que tienen que ser escindidas para volverse activas fisiológicamente. Por ejemplo, la enolasa de *C. albicans* se adhiere al plasminógeno (un quininógeno), activando su escisión para producir plasmín, una peptidasa de tipo serina que se encarga de degradar la fibrina (fibrinólisis), la proteína de la coagulación, así amplificando la invasión y diseminación de *C. albicans* en el cuerpo humano. Aunque no se sabe de la existencia de quininógenos en plantas, el poseer una proteína con homología significativa a la misma de *C. albicans* puede indicar funciones proteicas que le permite a *L. theobromae* infectar a seres humanos, ya que *L. theobromae* y *Macrophomina phaseolina* se han reportado en varios casos médicos.

Este trabajo vincula la fermentación en *L. theobromae* como parte de su patogenia, vinculada a la producción de ésteres de ácidos grasos, ya que el etanol proviene de la fermentación. Los resultados de la identificación de proteínas basada en análisis de fragmentación arrojaron varias enzimas relacionadas a la fermentación, incluyendo la alcohol deshidrogenasa y la piruvato descarboxilasa. No se detectaron lipasas con 100% de confianza, lo cual se esperaba, ya que se ha reportado que los triglicéridos son capaces de inducir las lipasas en *Botryosphaeria ribis* (Barbosa et al., 2011). Sin embargo, con el análisis bioinformático de secuenciación *de novo* sí se detectaron varias lipasas, indicando la presencia de lipasas novedosas, pero aún no secuenciadas. Se esperaba detectar más lipasas aun así. El no haber detectado más lipasas en los dos análisis bioinformáticos es probablemente debido a varios factores, por ejemplo, aspectos técnicos del espectrómetro de masas. La metodología utilizada excluyó a las proteínas de baja abundancia. Aparte, está reportado que la glucosa inhibe la producción de lipasas (Fickers et al., 2005).

En cuanto las proteínas encargadas de producir ésteres metílicos de ácidos grasos, se detectaron varias proteínas potencialmente encargadas de su producción, siendo estas las metiltransferasas identificadas por medio de búsqueda de la base de datos NCBI (Tabla 7). Específicamente, se detectaron y validaron con 100% de confianza una S-adenosilmetionina sintasa y una metiltransferasas de tipo 11, la cual utiliza S-adenosilmetionina (SAM) como fuente de grupos metil (Struck et al., 2012) para metilar una gran cantidad de compuestos, incluyendo ácidos grasos libres. De nuevo, este aspecto en Botryosphaeriaceae es poco estudiado, pero su importancia esclarecida en otros hongos como *Aspergillus nidulans* (Gerke et al., 2012).

Secuenciación *de novo* identificó una variedad de proteínas novedosas, incluyendo factores de patogenicidad homólogos a las mismas de víboras, siendo estas las metaloproteinasas de zinc, de las cuales se sabe muy poco en los hongos. Sin embargo, sí se sabe que la versión en víboras causa hemorragia cutánea en la piel de las ratas (Chen et al., 2008). Los resultados de la secuenciación *de novo* de péptidos deben ser validados en *L. theobromae*, pero esto requiere de la secuencia genómica de *L. theobromae*, o bien, secuenciación por medio de amplificación con PCR utilizando cebadores degenerados.

Capítulo 5. Conclusiones

Los hongos fitopatógenos estudiados en este trabajo (*L. theobromae* y *N. parvum*), miembros de la familia Botryosphaeriaceae (*L. theobromae* y *N. parvum*) los cuales se consideran hongos de madera, se diferenciaron de un patógeno de tomate (*Fusarium oxysporum*) y un no-patógeno (*Trichoderma asperellum*) en su capacidad de liberar ácidos grasos y de esterificarlos, tanto de lípidos estructurales como de lípidos de almacenamiento.

Los ésteres de ácidos grasos mostraron actividad fisiológica significativa en la germinación y crecimiento de la planta modelo *N. tabacum*. 9,12(Z,Z) octadecadienoato de etilo (LAEE) y estearato de etilo (SAEE) demostraron actividad inhibitoria a concentraciones de 50-200 µg/mL y aumentaron el crecimiento a concentraciones de 25-3.1 µg/mL.

El estearato de etilo (SAEE) fue el único compuesto detectado en los hongos patógenos estudiados en este trabajo, y su actividad consistió en aumentar la germinación de plantas de *N. tabacum* hasta 98 ng/mL. Hexadecanoato de etilo (PAEE) demostró actividad inhibitoria solamente en presencia de sacarosa.

Hexadecanoato de etilo (PAEE) tuvo actividad significativa en plántulas de *N. tabacum* crecidas en hidroponía, aumentando el crecimiento (longitud) y tamaño de las hojas de las plántulas a 1 µg/mL.

Por medio de identificación por análisis de fragmentación dependiente de la base de datos entera de Uniprot, la proteómica identificó proteínas de interés biotecnológico, contribuyendo a los esfuerzos de anotación de proteínas en *L. theobromae*, por ejemplo, la aril-alcohol deshidrogenasa, la cual degrada la lignina. Se detectaron proteínas importantes para la adherencia que actúan manipulando el sistema inmune de los seres humanos. Por ejemplo, se detectó una proteína homóloga a una ankyrina POTE, muy novedosa en hongos filamentosos. También se encontró una proteína homóloga a la enolasa de *C. albicans*, la cual activa una respuesta alérgica humoral a través de la estimulación de IgE. Aparte, la enolasa de *C. albicans* tiene la habilidad de activar quinínógenos, utilizando mecanismos del hospedero para propiciar su invasión.

Adicionalmente, secuenciación *de novo* del peptidoma de *L. theobromae* detectó una variedad de enolasas alérgicas, como también varios péptidos homólogos a la proteinasa dependiente de zinc misma de las víboras, aparte de péptidos homólogos a miembros del sistema inmune humano, siendo estos proteínas

de complemento C3. Resultados de secuenciación *de novo* apoyaron el haber encontrado una proteína homóloga a la ankyrina POTE como también la enolasa homóloga a la misma de *C. albicans*.

Aunque falta trabajo para caracterizar la función de las proteínas detectadas en *L. theobromae*, este trabajo ha identificado proteínas con funciones novedosas merecedoras de esfuerzos de caracterización funcional adicionales, destacando nuevos paradigmas en la patogenicidad.

Capítulo 6. Literatura citada

ACD Labs, 2010. ACD/NMR Processor Academic Edition (Version 12.01 (Build 39104, 18 Mar)).

Aleryani, S.L., Cluette-Brown, J.E., Khan, Z.A., Hasaba, H., Lopez De Heredia, L., Laposata, M., 2005. Fatty

- acid methyl esters are detectable in the plasma and their presence correlates with liver dysfunction. *Clin. Chim. Acta* 359, 141–149. doi:10.1016/j.cccn.2005.03.038
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A., Evidente, A., 2011. Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases, *Toxins*. doi:10.3390/toxins3121569
- Ashburner, M., Ball, C., Blake, J., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A., Dolinski, K., Dwight, S., Eppig, J., Harris, M., Hill, D., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J., Richardson, J., Ringwald, M., Rubin, G., Sherlock, G., 2000. Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25, 25–29. doi:10.1038/75556.Gene
- Aydin, H.H., Celik, H.A., Deveci, R., Karacali, S., Saydam, G., Bedii Omay, S., Batur, Y., 2005. Induction of apoptosis by fatty acid ethyl esters in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol* 43, 139–145. doi:10.1016/j.fct.2004.09.003
- Banting, G.S., Barak, O., Ames, T.M., Burnham, A.C., Kardel, M.D., Cooch, N.S., Davidson, C.E., Godbout, R., McDermid, H.E., Shiekhattar, R., 2005. CECR2, a protein involved in neurulation, forms a novel chromatin remodeling complex with SNF2L. *Hum. Mol. Genet.* 14, 513–524. doi:10.1093/hmg/ddi048
- Barbosa, A.M., Messias, J.M., Andrade, M.M., Dekker, R.F.H., Venkatesagowda, B., 2011. Soybean Oil and Meal as Substrates for Lipase Production by *Botryosphaeria ribis*, and Soybean Oil to Enhance the Production of *Botryosphaera* by *Botryosphaeria rhodina*. *Soybean - Biochem. Chem. Physiol.* 101–118. doi:10.5772/15623
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7, 249–260. doi:1139-6709
- Bera, T.K., Saint Fleur, A., Ha, D., Yamada, M., Lee, Y., Lee, B., Hahn, Y., Kaufman, D.S., Pera, M., Pastan, I., 2008. Selective POTE paralogs on chromosome 2 are expressed in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 17, 325–32. doi:10.1089/scd.2007.0079
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot.* 91, 179–194. doi:10.1093/aob/mcf118
- Bonfante, P., Genre, A., 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* 1, 48. doi:10.1038/ncomms1046
- Borges, T.A., Souza, A.T. De, Squina, F.M., Riaño-Pachón, D.M., Santos, R.A.C. Dos, Machado, E., Oliveira, J.V.D.C., Damásio, A.R.L., Goldman, G.H., 2014. Biochemical characterization of an endoxylanase from *Pseudozyma brasiliensis* sp. nov. strain GHG001 isolated from the intestinal tract of *Chrysomelidae* larvae associated to sugarcane roots. *Process Biochem.* 49, 77–83. doi:10.1016/j.procbio.2013.10.004
- Bugg, T.D.H., Ahmad, M., Hardiman, E.M., Rahmanpour, R., 2011. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 28, 1883–96. doi:10.1039/c1np00042j
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST + : architecture and applications 9, 1–9. doi:10.1186/1471-2105-10-421
- Candolfi-Arballo, O., 2009. Caracterización de anamorfos de *Botryosphaeriaceae* asociados a deterioro progresivo en vid (*Vitis vinifera* L.) aislados de la región vitivinícola de Baja California. Centro de Investigación Científica y Educación Superior (CICESE).
- Castillo, C., Chen, H., Graves, C., Maisonnasse, A., Le Conte, Y., Plettner, E., 2012. Biosynthesis of ethyl

- oleate, a primer pheromone, in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 404–416. doi:10.1016/j.ibmb.2012.02.002
- Chatgililoglu, C., Ferreri, C., 2005. Trans lipids: The free radical path. *Acc. Chem. Res.* 38, 441–448. doi:10.1021/ar0400847
- Chen, H. Sen, Tsai, H.Y., Wang, Y.M., Tsai, I.H., 2008. P-III hemorrhagic metalloproteinases from Russell's viper venom: Cloning, characterization, phylogenetic and functional site analyses. *Biochimie* 90, 1486–1498. doi:10.1016/j.biochi.2008.05.012
- Cilliers, A.J., 1993. *Lasiodiplodia theobromae* with special reference to its occurrence on Pinus seeds in South Africa.
- Cobos, R., Barreiro, C., Mateos, R.M., Coque, J.-J.R., 2010. Cytoplasmic- and extracellular-proteome analysis of *Diplodia seriata*: a phytopathogenic fungus involved in grapevine decline. *Proteome Sci.* 8, 46. doi:10.1186/1477-5956-8-46
- Craig, R., Beavis, R.C., 2004. TANDEM: Matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* 20, 1466–1467. doi:10.1093/bioinformatics/bth092
- Criddle, D., Murphy, J., Fistetto, G., Barrow, S., Tepikin, A. V., Neoptolemos, J.P., Sutton, R., Petersen, O.H., 2006. Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis. *Gastroenterology* 130, 781–793. doi:10.1053/j.gastro.2005.12.031
- Criddle, D., Raraty, M.G.T., Neoptolemos, J.P., Tepikin, A. V, Petersen, O.H., Sutton, R., 2004. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10738–10743. doi:10.1073/pnas.0403431101
- Criddle, D., Waldron, R., Lugea, A., Pandol, S., 2015. Alcohol-Related Mechanisms of Acute Pancreatitis : The Roles of Mitochondrial Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress 3 . Mitochondrial Dysfunction in Alcoholic Acute Pancreatitis. *Pancreapedia* 1–9. doi:10.3998/panc.2015.28
- Curtin, C., Zhang, W., Franco, C., 2003. Manipulating anthocyanin composition in *Vitis vinifera* suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation. *Biotechnol. Lett.* 25, 1131–1135. doi:10.1023/A:1024556825544
- Czemmel, S., Galarneau, E.R., Travadon, R., McElrone, A.J., Cramer, G.R., Baumgartner, K., 2015. Genes Expressed in Grapevine Leaves Reveal Latent Wood Infection by the Fungal Pathogen *Neofusicoccum parvum*. *PLoS One* 10, e0121828.
- de los Santos-Villalobos, S., Guzmán-Ortiz, D.A., Gómez-Lim, M.A., Delano-Frier, J.P., de-Folter, S., Sánchez-García, P., Peña-Cabriales, J.J., 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biol. Control* 64, 37–44. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.10.006
- Dhandhukia, P.C., Thakkar, V.R., 2007. Standardization of growth and fermentation criteria of *Lasiodiplodia theobromae* for production of jasmonic acid. *African J. Biotechnol.* 6, 707–712.
- Eng, J.K., Jahan, T.A., Hoopmann, M.R., 2013. Comet: An open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics* 13, 22–24. doi:10.1002/pmic.201200439
- Felnagle, E.A., Jackson, E.E., Chan, Y.A., Podevels, A.M., Berti, D., McMahon, M.D., Thomas, M.G., 2008. NIH Public Access 5, 191–211. doi:10.1021/mp700137g.Nonribosomal
- Ferreri, C., Kratzsch, S., Landi, L., Brede, O., 2005. Thiyl radicals in biosystems: Effects on lipid structures and metabolisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 834–847. doi:10.1007/s00018-005-4475-y

- Fickers, P., Nicaud, J.M., Destain, J., Thonart, P., 2005. Involvement of hexokinase Hxk1 in glucose catabolite repression of LIP2 encoding extracellular lipase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Microbiol.* 50, 133–137. doi:10.1007/s00284-004-4401-9
- Fischer, E., Speier, A., 1895. Darstellung der Ester. *Chem. Ber.* 28, 3252–3258. doi:10.1002/cber.189502803176.
- Flores-Sanchez, I.J., Verpoorte, R., 2009. Plant Polyketide Synthases: A fascinating group of enzymes. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 167–174. doi:10.1016/j.plaphy.2008.11.005
- Folch, J., Lees, M., Sloan Stanley, G.H., 1957. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Footz, T.K., Brinkman-Mills, P., Banting, G.S., Maier, S.A., Riazi, M.A., Bridgland, L., Hu, S., Birren, B., Minoshima, S., Shimizu, N., Pan, H., Nguyen, T., Fang, F., Fu, Y., Ray, L., Wu, H., Shaull, S., Phan, S., Yao, Z., Chen, F., Huan, A., Hu, P., Wang, Q., Loh, P., Qi, S., Roe, B.A., McDermid, H.E., 2001. Analysis of the cat eye syndrome critical region in humans and the region of conserved synteny in mice: A search for candidate genes at or near the human chromosome 22 pericentromere. *Genome Res.* 11, 1053–1070. doi:10.1101/gr.154901
- Fortwendel, J., 2012. Ras-mediated signal transduction and virulence in human pathogenic fungi. *Fungal Genomics Biol.* 2, 105–126. doi:10.1016/j.surg.2006.10.010.Use
- Frank, A., Pevzner, P., 2005. PepNovo: De novo peptide sequencing via probabilistic network modeling. *Anal. Chem.* 77, 964–973. doi:10.1021/ac048788h
- Fu, H., Feng, J., Aboukhaddour, R., Cao, T., Hwang, S.F., Strelkov, S.E., 2013. An exo-1,3- β -glucanase GLU1 contributes to the virulence of the wheat tan spot pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. *Fungal Biol.* 117, 673–681. doi:10.1016/j.funbio.2013.07.003
- Gaillardin, C., 2010. Lipases as Pathogenicity Factors of Fungi, in: Timmis, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 3259–3268. doi:10.1007/978-3-540-77587-4_247
- Gass, N., Glagotskaia, T., Mellema, S., Stuurman, J., Barone, M., Mandel, T., Roessner-Tunali, U., Kuhlemeier, C., 2005. Pyruvate decarboxylase provides growing pollen tubes with a competitive advantage in petunia. *Plant Cell* 17, 2355–2368. doi:10.1105/tpc.105.033290
- Geer, L.Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R.C., Han, L., He, J., He, S., Liu, C., Shi, W., Bryant, S.H., 2009. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res.* 38, 492–496. doi:10.1093/nar/gkp858
- Geer, L.Y., Markey, S.P., Kowalak, J. a, Wagner, L., Xu, M., Maynard, D.M., Yang, X., Shi, W., Bryant, S.H., 2004. Open Mass Spectrometry Search Algorithm research articles. *J. Proteome Res.* 1–25. doi:10.1021/pr0499491
- Geisler, M., Murphy, A., Sze, H., 2013. Evolution of Membrane Signaling and Trafficking in Plants. *Front. Plant Sci.* 4, 148. doi:10.3389/fpls.2013.00040
- Gerke, J., Bayram, Ö., Braus, G.H., 2012. Fungal S-adenosylmethionine synthetase and the control of development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 49, 443–454. doi:10.1016/j.fgb.2012.04.003
- Gigon, A., Matos, A.R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.T., 2004. Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Columbia). *Ann. Bot.* 94, 345–351. doi:10.1093/aob/mch150

- Gleadow, R.M., Woodrow, I.E., 2000. Temporal and spatial variation in cyanogenic glycosides in *Eucalyptus cladocalyx*. *Tree Physiol.* 20, 591–598. doi:10.1093/treephys/20.9.591
- Grahl, N., Puttikamonkul, S., Macdonald, J.M., Gamcsik, M.P., Ngo, L.Y., Hohl, T.M., Cramer, R.A., 2011. In vivo hypoxia and a fungal alcohol dehydrogenase influence the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis. *PLoS Pathog.* 7. doi:10.1371/journal.ppat.1002145
- Halleen, F., Fourie, P.H., Crous, P.W., 2006. A Review of Black Foot Disease of Grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* 45, 55–67. doi:10.14601/PHYTOPATHOL_MEDITERR-1845
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., Martínez, A.T., 2012. Fungal aryl-alcohol oxidase: A peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1395–1410. doi:10.1007/s00253-011-3836-8
- Higashi, Y., Okazaki, Y., Myouga, F., Shinozaki, K., Saito, K., 2015. Landscape of the lipidome and transcriptome under heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 5, 10533. doi:10.1038/srep10533
- Holzberg, M., Artis, W.M., 1983. Hydroxymate siderophore production by opportunistic and systematic fungal pathogens. *Infect. Immun.* 40, 1134–1139.
- Horner, W.E., Helbling, A., Salvaggio, J.E., Lehrer, S.B., 1995. Fungal allergens. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 161–179.
- Huh, S., Kim, Y.-S., Jung, E., Lim, J., Jung, K.S., Kim, M.-O., Lee, J., Park, D., 2010. Melanogenesis inhibitory effect of fatty acid alkyl esters isolated from *Oxalis triangularis*. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 1242–1245. doi:10.1248/bpb.33.1242
- Hynes, M., Murray, S., Duncan, A., Khew, G., Ma, 2006. Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal functions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. cel* 5, 794–805. doi:10.1128/EC.5.5.794
- Inbathamizh, I., Padmini, E., 2012. Gas Chromatography-Mass Spectrometric analyses of methanol extract of *Moringa oleifera* flowers. *Int. J. Chem. Anal. Sci.* 3, 1394–1397.
- J.R.Úrbez-Torres, W.D.Gubler, 2009. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Species Isolated from Grapevine Cankers in California. *Plant Dis.* 93, 584–592. doi:10.1094/PDIS-93-6-0584
- Jernerén, F., Eng, F., Hamberg, M., Oliw, E.H., 2012. Linolenate 9R-dioxygenase and allene oxide synthase activities of *Lasiodiplodia theobromae*. *Lipids* 47, 65–73. doi:10.1007/s11745-011-3622-5
- Jia, Z., Zhang, X., Cao, X., 2009. Effects of carbon sources on fungal morphology and lovastatin biosynthesis by submerged cultivation of *Aspergillus terreus*. *Asia Pacific J. Chem. Eng.* 4, 672–677.
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W., 2005. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* 3, 937–947. doi:10.1038/nrmicro1286
- Khanzada, M.A., Lodhi, A.M., Shahzad, S., 2005. Chemical control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of mango decline in Sindh. *Pakistan J. Bot.* 37, 1023–1030.
- Kim, S., Pevzner, P.A., 2014. MS-GF+ makes progress towards a universal database search tool for proteomics. *Nat. Commun.* 5, 5277. doi:10.1038/ncomms6277
- Laseter, J., Weete, J., 1971. Fatty Acid Ethyl Esters of *Rhizopus arrhizus*. *Science* (80-.). 172, 864–865.
- Lavee, S., May, P., 1997. Dormancy of grapevine buds - facts and speculation. *Aust. J. Grape Wine Res.* 3, 31–46. doi:10.1111/j.1755-0238.1997.tb00114.x

- Lawler, G.C., Weber, D.J., 1980. Metabolism During Asexual Sporulation in *Rhizopus arrhizus* (Fischer). *J. Gen. Microbiol.* 117, 465–474. doi:10.1099/00221287-117-2-465
- Lin, H.C., Tsunematsu, Y., Dhingra, S., Xu, W., Fukutomi, M., Chooi, Y.H., Cane, D.E., Calvo, A.M., Watanabe, K., Tang, Y., 2014. Generation of complexity in fungal terpene biosynthesis: Discovery of a multifunctional cytochrome P450 in the fumagillin pathway. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 4426–4436. doi:10.1021/ja500881e
- Linskens, H.F., Schrauwen, J., 1966. Measurement of oxygen tension changes in the style during pollen tube growth. *Planta* 71, 98–106.
- Liu, Y., Chen, J., Sethi, A., Li, Q.K., Chen, L., Collins, B., Gillet, L.C.J., Wollscheid, B., Zhang, H., Aebersold, R., 2014. Glycoproteomic Analysis of Prostate Cancer Tissues by SWATH Mass Spectrometry Discovers N-acyl ethanolamine Acid Amidase and Protein Tyrosine Kinase 7 as Signatures for Tumor Aggressiveness. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 1753–68. doi:10.1074/mcp.M114.038273
- Ma, B., 2015. Novor: Real-Time Peptide de Novo Sequencing Software. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26, 1885–1894. doi:10.1007/s13361-015-1204-0
- Machado, A.R., Pereira, O.L., 2012. Major Diseases of the Biofuel Plant , Physic Nut (*Jatropha curcas*). *Biodiesel - Feed. Prod. Appl.* 18. doi:10.5772/52336
- Maere, S., Heymans, K., Kuiper, M., 2005. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics* 21, 3448–3449. doi:10.1093/bioinformatics/bti551
- Mayorquin, J.S., Wang, D.H., Twizeyimana, M., Eskalen, A., 2016. Identification, Distribution, and Pathogenicity of Diatrypaceae and Botryosphaeriaceae Associated with Citrus Branch Canker in the Southern California Desert. *Plant Dis.* 100, PDIS-03-16-0362. doi:10.1094/PDIS-03-16-0362-RE
- Mbenoun, M., Momo Zeutsa, E.H., Samuels, G., Nsougou Amougou, F., Nyasse, S., 2008. Dieback due to *Lasioidiplodia theobromae*, a new constraint to cocoa production in Cameroon. *Plant Pathol.* 57, 381. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01755.x
- Minina, E.A., Filonova, L.H., Daniel, G., Bozhkov, P. V., 2013. Necrosis 1004, 229–248. doi:10.1007/978-1-62703-383-1
- Mohali, S., Burgess, T.I., Wingfield, M.J., 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasioidiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *For. Pathol.* 35, 385–396. doi:10.1111/j.1439-0329.2005.00418.x
- Muniz, C.R., Freire, F.C.O., Viana, F.M.P., Cardoso, J.E., Cooke, P., Wood, D., Guedes, M.I.F., 2011. Colonization of cashew plants by *Lasioidiplodia theobromae*: Microscopical features. *Micron* 42, 419–428. doi:10.1016/j.micron.2010.12.003
- Myburg, A.A., Lev-Yadun, S., Sederoff, R.R., 2013. Xylem Structure and Function. eLS 1–9. doi:10.1002/9780470015902.a0001302.pub2
- Nghia, N.A., Thi, V., Chi, Q., Dong, N.X., 2012. Molecular Analysis of *Botryodiplodia theobromae* Isolates from Rubber in Vietnam Using rDNA ITS Sequencing and ISSR Markers. *Int. Rubber Conf.*
- Niedermeyer, T.H.J., Strohm, M., 2012. mMass as a Software Tool for the Annotation of Cyclic Peptide Tandem Mass Spectra. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0044913
- Or, E., 2009a. Grape bud dormancy release - The molecular aspect, in: Roubelakis-Angelakis, K. (Ed.), *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology: Second Edition*. pp. 1–29. doi:10.1007/978-90-

481-2305-6_1

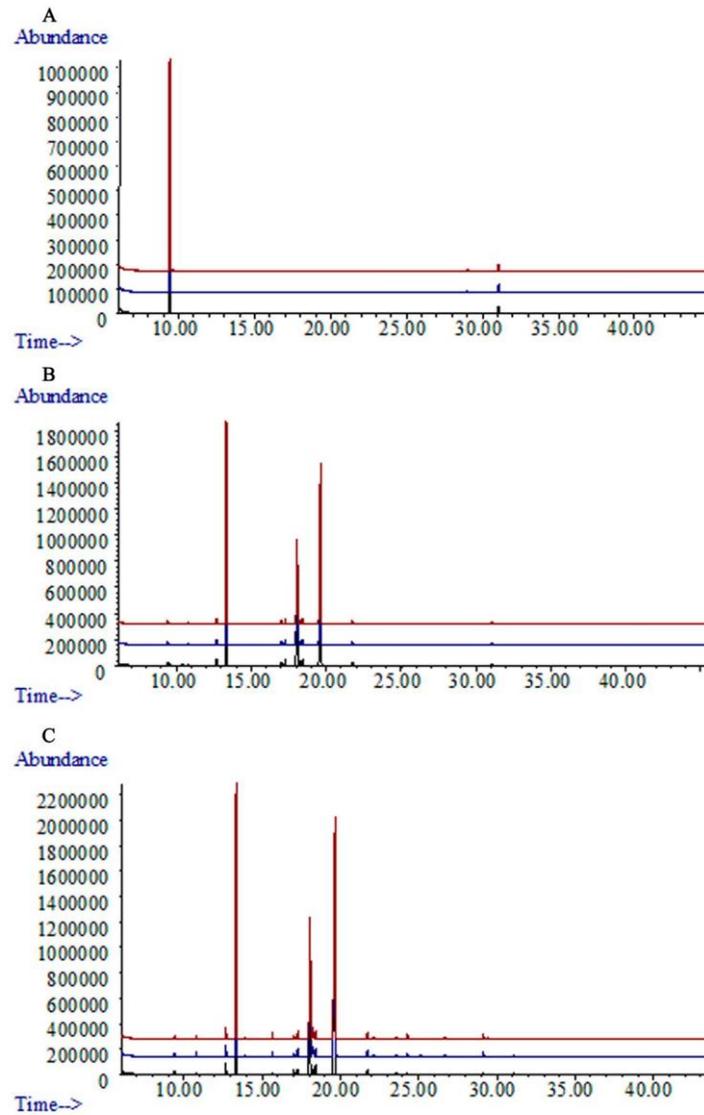
- Or, E., 2009b. *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*, Second Edi. ed. Springer. doi:10.1007/978-90-481-2305-6
- Pandi, M., Kumaran, R.S., Choi, Y.K., Kim, H.J., Muthumary, J., 2011. Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda citrifolia*. *African J. Biotechnol.* 10, 1428–1435. doi:10.5897/AJB10.950
- Papacostas, L.J., Henderson, A., Choong, K., Sowden, D., 2015. An unusual skin lesion caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Med. Mycol. Case Rep.* 8, 44–46. doi:10.1016/j.mmcr.2015.03.002
- Pardo, J.E., Fernández, E., Rubio, M., Alvarruiz, A., Alonso, G.L., 2009. Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*vitis vinifera*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 188–193. doi:10.1002/ejlt.200800052
- Park, S.Y., Seetharaman, R., Ko, M.J., Kim, D.Y., Kim, T.H., Yoon, M.K., Kwak, J.H., Lee, S.J., Bae, Y.S., Choi, Y.W., 2014. Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells. *Int. Immunopharmacol.* 19, 253–261. doi:10.1016/j.intimp.2014.01.017
- Percudani, R., Montanini, B., Ottonello, S., 2005. The anti-HIV cyanovirin-N domain is evolutionarily conserved and occurs as a protein module in eukaryotes. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 60, 670–678. doi:10.1002/prot.20543
- Pohl, C.H., Kock, J.L.F., Thibane, V.S., 2011. Antifungal free fatty acids: a review. *Sci. against Microb. Pathog. Curr. Res. Technol. Adv.* 1, 61–71.
- Pretsch, E., Buhlmann, P., Badertscher, M., 2010. Structure Determination of Organic Compounds, *Accounts of Chemical Research.* doi:10.1021/ar100041j
- Proels, R.K., Westermeier, W., Hückelhoven, R., 2011. Infection of barley with the parasitic fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* results in the induction of HvADH1 and HvADH2. *Plant Signal. Behav.* 6, 1584–1587. doi:10.4161/psb.6.10.16889
- Rapala-Kozik, M., Bochenska, O., Zawrotniak, M., Wolak, N., Trebacz, G., Gogol, M., Ostrowska, D., Aoki, W., Ueda, M., Kozik, A., 2015. Inactivation of the antifungal and immunomodulatory properties of human cathelicidin LL-37 by aspartic proteases produced by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 83, 2518–2530. doi:10.1128/IAI.00023-15
- Rodriguez, E., Navone, L., Casati, P., Gramajo, H., 2012. Impact of malic enzymes on antibiotic and triacylglycerol: Production in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4571–4579. doi:10.1128/AEM.00838-12
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J., 2006. SUGAR SENSING AND SIGNALING IN PLANTS: Conserved and Novel Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 675–709. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441
- Rubio, S., Donoso, A., Pérez, F.J., 2014. The dormancy-breaking stimuli “chilling, hypoxia and cyanamide exposure” up-regulate the expression of α -amylase genes in grapevine buds. *J. Plant Physiol.* 171, 373–381. doi:10.1016/j.jplph.2013.11.009
- Sánchez-Pérez, R., Del Cueto, J., Dicenta, F., Martínez-Gómez, P., 2014. Recent advancements to study flowering time in almond and other *Prunus* species. *Front. Plant Sci.* 5, 334. doi:10.3389/fpls.2014.00334

- Sato, M., Watanabe, Y., Akiyoshi, Y., Yamamoto, M., 2002. 14-3-3 Protein interferes with the binding of RNA to the phosphorylated form of fission yeast meiotic regulator Mei2p. *Curr. Biol.* 12, 141–145. doi:10.1016/S0960-9822(01)00654-6
- Schmidt-Dannert, C., 2015. Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 148, 19–61. doi:doi: 10.1007/10_2014_283
- Schmidt, A., Vogel, R.L., Witherup, K.M., Jane, S., Pitzenberger, M., Adam, M., Rodan, G.A., 1996. Identification of Fatty Acid Methyl Ester as Naturally Occurring Transcriptional Regulators of the Members of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Family. *Med. Chem. (Los. Angeles)*. 31.
- Selinski, J., Scheibe, R., 2014. Pollen tube growth: where does the energy come from? *Plant Signal. Behav.* 9, e977200. doi:10.4161/15592324.2014.977200
- Shimada, T.L.T., Takano, Y., Shimada, T.L.T., Fujiwara, M., Fukao, Y., Mori, M., Okazaki, Y., Saito, K., Sasaki, R., Aoki, K., Hara-Nishimura, I., 2014. Leaf oil body functions as a subcellular factory for the production of a phytoalexin in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 164, 105–18. doi:10.1104/pp.113.230185
- SIAP, 2016. No Title [WWW Document]. *Serv. Inf. Agroaliment. y Pesq.* URL http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/ientidad/index.jsp
- Sierro, N., Battey, J.N.D., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M.C., Ivanov, N. V., 2014. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat. Commun.* 5, 3833. doi:10.1038/ncomms4833
- Siewers, V., Smedsgaard, J., Tudzynski, P., 2004. The P450 monooxygenase BcABA1 is essential for abscisic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3868–38676. doi:10.1128/AEM.70.7.3868
- Silva, R.C., Padovan, A.C.B., Pimenta, D.C., Ferreira, R.C., da Silva, C. V, Briones, M.R.S., 2014. Extracellular enolase of *Candida albicans* is involved in colonization of mammalian intestinal epithelium. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 66. doi:10.3389/fcimb.2014.00066
- Skory, C.D., Freer, S.N., Bothast, R.J., 1997. Screening for ethanol-producing filamentous fungi. *Biotechnology* 19, 203–206.
- Son, H., Min, K., Lee, J., Choi, G.J., Kim, J.C., Lee, Y.W., 2012. Differential roles of pyruvate decarboxylase in aerial and embedded mycelia of the ascomycete *Gibberella zeae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 329, 123–130. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02511.x
- Stowe, B., 1960. Growth promotion in pea stem sections, 1. Stimulation of auxin and gibberessin action by alkyl lipids. *Science (80-)*. 262–269.
- Strobel, G., 2014. The story of mycodiesel. *Curr. Opin. Microbiol.* 19, 52–58. doi:10.1016/j.mib.2014.06.003
- Struck, A.W., Thompson, M.L., Wong, L.S., Micklefield, J., 2012. S-Adenosyl-Methionine-Dependent Methyltransferases: Highly Versatile Enzymes in Biocatalysis, Biosynthesis and Other Biotechnological Applications. *ChemBioChem* 13, 2642–2655. doi:10.1002/cbic.201200556
- Thelen, J.J., Miernyk, J.A., Randall, D.D., 1999. Molecular cloning and expression analysis of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase from maize. *Plant Physiol.* 119, 635–44.
- Tsitsigiannis, D.I., Keller, N.P., 2007. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol.* 15, 109–118. doi:10.1016/j.tim.2007.01.005

- Tsukada, K., Takahashi, K., Nabeta, K., 2010. Biosynthesis of jasmonic acid in a plant pathogenic fungus, *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytochemistry* 71, 2019–2023. doi:10.1016/j.phytochem.2010.09.013
- Uranga, C.C., Beld, J., Mrse, A., Córdova-Guerrero, I., Burkart, M.D., Hernández-Martínez, R., 2016. Fatty acid esters produced by *Lasiodiplodia theobromae* function as growth regulators in tobacco seedlings. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 472. doi:10.1016/j.bbrc.2016.02.104
- Uranga, C.C., Beld, J., Mrse, A., Córdova-Guerrero, I., Burkart, M.D., Hernández-Martínez, R., Córdova-Guerrero, I., Burkart, M.D., Hernández-Martínez, R., 2016. Fatty acid esters produced by *Lasiodiplodia theobromae* function as growth regulators in tobacco seedlings. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 472, 339–345. doi:10.1016/j.bbrc.2016.02.104
- Úrbez-Torres, J.R., 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 5–45. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-9316
- Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Guerrero, J.C., Guevara, J., Gubler, W.D., 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Dis.* 92, 519–529. doi:10.1094/PDIS-92-4-0519
- Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Voegel, T.M., Gubler, W.D., 2006. Identification and Distribution of *Botryosphaeria* spp. Associated with Grapevine Cankers in California. *Plant Dis.* 90, 1490–1503. doi:10.1094/PD-90-1490
- USDA, 2016. United States Department of Agriculture [WWW Document]. *Natl. Nutr. Database Stand. Ref. Release* 28. URL <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/6507?fg=&man=&facet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Full&new=&measureby=>
- van der Schoot, C., Paul, L.K., Paul, S.B., Rinne, P.L.H., 2011. Plant lipid bodies and cell-cell signaling: a new role for an old organelle? *Plant Signal. Behav.* 6, 1732–8. doi:10.4161/psb.6.11.17639
- van Heusden, G.P.H., Steensma, H.Y., 2006. Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast* 23, 159–171. doi:10.1002/yea.1338
- Vaudel, M., Barsnes, H., Berven, F.S., Sickmann, A., Martens, L., 2011. SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches. *Proteomics* 11, 996–999. doi:10.1002/pmic.201000595
- Vivin, P., Castellan-Estrade, M., Gaudillère, J.-P., 2003. Seasonal changes in chemical composition and construction costs of grapevine tissues. *Vitis* 42, 5–12.
- Vogel, H.J., 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). *Microb. Genet. Bull.* 13, 42–43.
- Walsh, T., O'Brien, R., Khosla, C., 2013. HHS Public Access. Nonproteinogenic Amin. acid Build. blocks nonribosomal Pept. hybrid polyketide scaffolds 52, 7098–7124. doi:10.1038/nbt.3121.ChIP-nexus
- White, D.A., Fisk, I.D., Gray, D.A., 2006. Characterisation of oat (*Avena sativa* L.) oil bodies and intrinsically associated E-vitamins. *J. Cereal Sci.* 43, 244–249. doi:10.1016/j.jcs.2005.10.002
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Ngan, A.H.Y., Tse, H., Tung, E.T.K., Yuen, K.Y., 2008. *Lasiodiplodia theobromae* pneumonia in a liver transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* 46, 380–384. doi:10.1128/JCM.01137-07
- Wood [WWW Document], 2017.
- Yang, J., Hu, X., Zhang, H., Chen, H., Kargbo, M.R., Zhao, J., Song, Y., Chen, Y.Q., Zhang, H., Chen, W., 2014.

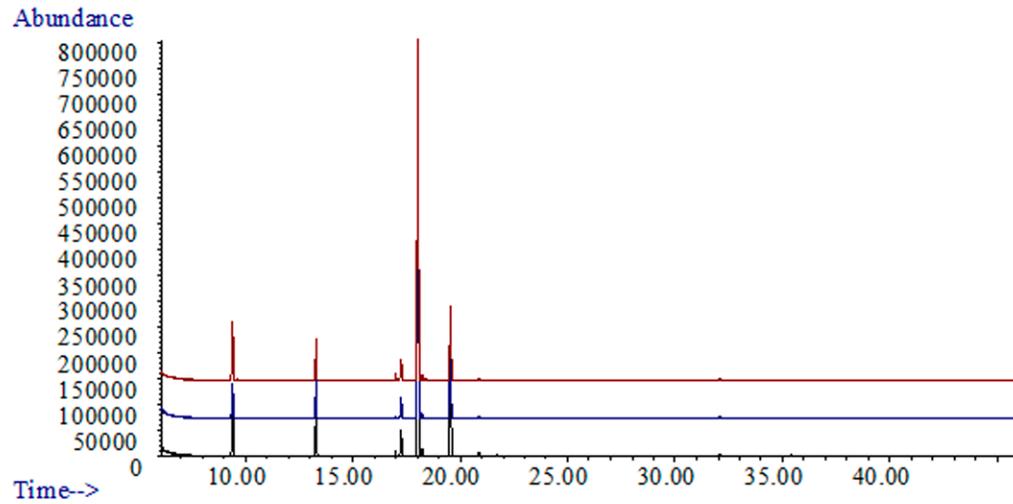
- Expression, purification, and characterization of NADP⁺- dependent malic enzyme from the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173, 1849–1857. doi:10.1007/s12010-014-0971-6
- Yunoki, K., Hirose, S., Ohnishi, M., 2007. Ethyl esterification of long-chain unsaturated fatty acids derived from grape must by yeast during alcoholic fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 3105–3109. doi:10.1271/bbb.70444
- Yurkovich, J.T., Palsson, B.O., 2016. Solving puzzles with missing pieces: The power of systems biology [Point of View]. *Proc. IEEE* 104, 2–7. doi:10.1109/JPROC.2015.2505338
- Zabalza, A., van Dongen, J.T., Froehlich, A., Oliver, S.N., Faix, B., Gupta, K.J., Schmalzlin, E., Igal, M., Orcaray, L., Royuela, M., Geigenberger, P., 2008. Regulation of Respiration and Fermentation to Control the Plant Internal Oxygen Concentration. *Plant Physiol.* 149, 1087–1098. doi:10.1104/pp.108.129288
- Zak, J., 1976. Mycological Society of America Pathogenicity of a Gibberellin-Producing and a Nonproducing Strain of *Fusarium moniliforme* in Oats as Determined by a Colorimetric Assay for N-Acetyl Glucosamine Author (s): John C . Zak Published by : Mycological Society 68, 151–158.
- Zatz, M., Dudley, P.A., Klooga, Y., Markey, P., 1981. Nonpolar Upid Methylation 256, 10028–10032.
- Zhang, J., Xin, L., Shan, B., Chen, W., Xie, M., Yuen, D., Zhang, W., Zhang, Z., Lajoie, G. a., Ma, B., 2012. PEAKS DB: De Novo Sequencing Assisted Database Search for Sensitive and Accurate Peptide Identification. *Mol. Cell. Proteomics* 11, M111.010587-M111.010587. doi:10.1074/mcp.M111.010587
- Zhang, Y., Adams, I.P., Ratledge, C., 2007. Malic enzyme: The controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. *Microbiology* 153, 2013–2025. doi:10.1099/mic.0.2006/002683-0

Anexos

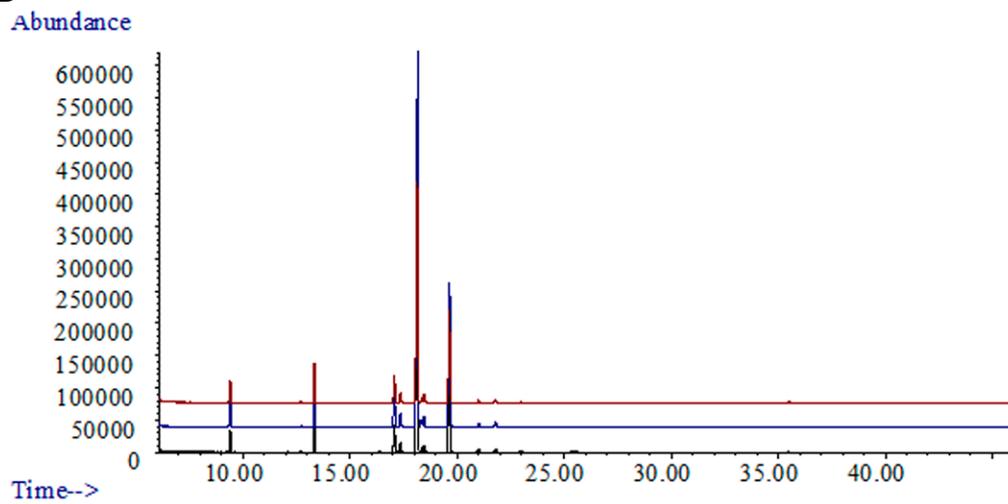


Anexo 1. Cromatogramas de GC/MS cepas de *Lasiodiplodia theobromae* incubadas en avena. A: Tres réplicas del control negativo. B: Tres réplicas de la cepa UCD256Ma. C: Tres réplicas de la cepa MXL28.

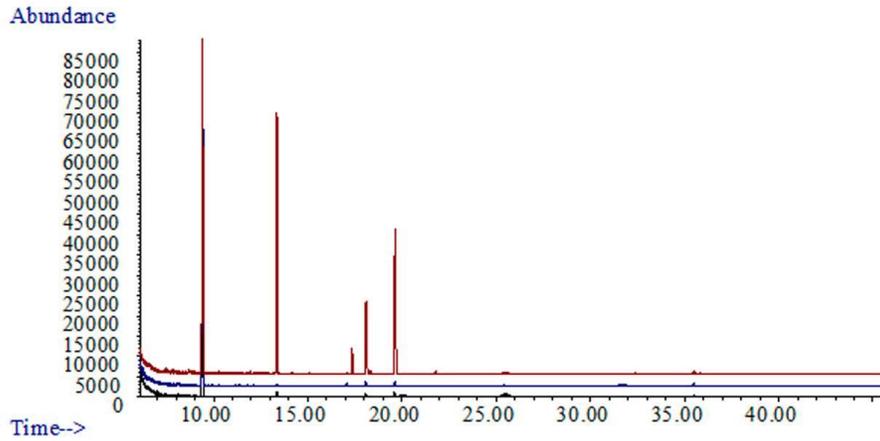
A



B

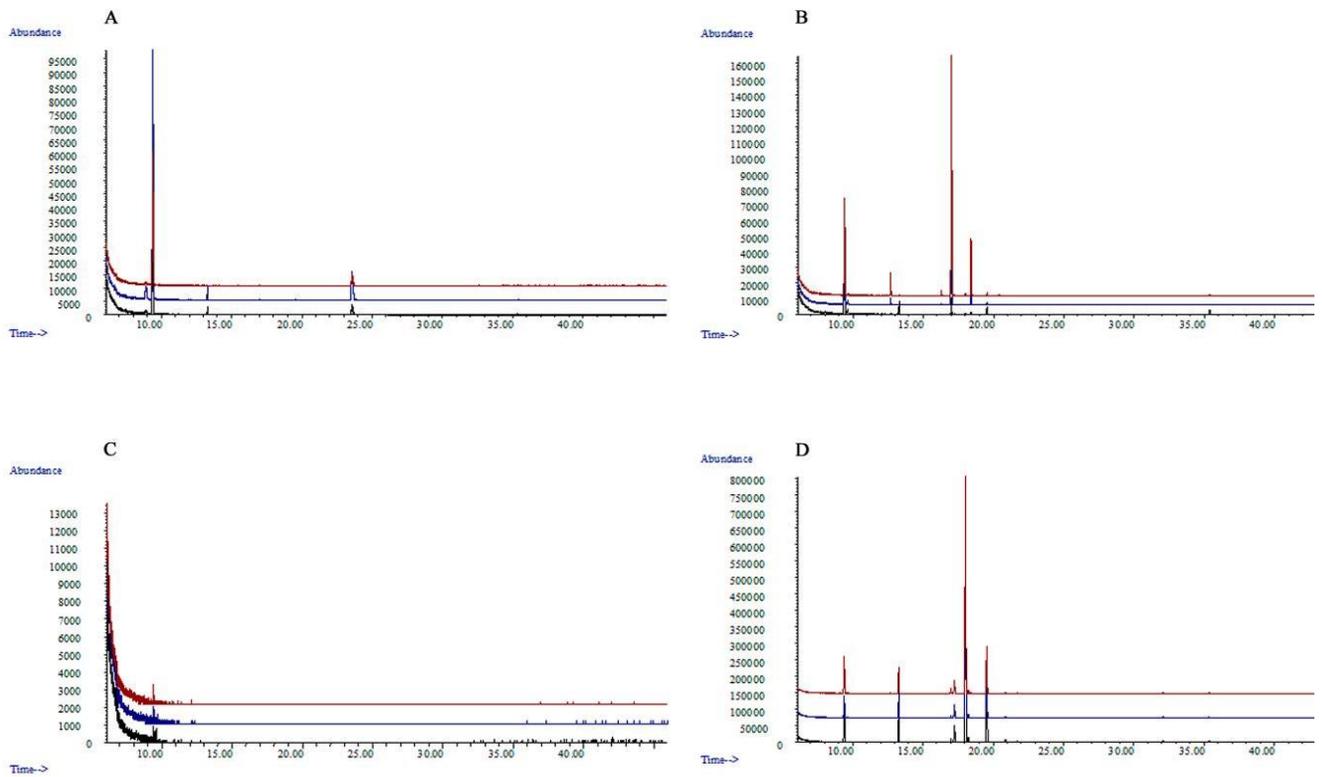


Anexo 2. Cromatogramas de GC-MS de A; *Lasiodiplodia theobromae* (UCD256Ma) and B; *Neofusicoccum parvum* (UCD646So). Ambos se incubaron en la combinación de glucosa al 5% y aceite de semilla de uva al 5%.



Anexo

3. Cromatogramas de GC-MS del patógeno de suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* incubado en sales de Vogel con la combinación de glucosa al 5% y aceite de semilla de uva al 5%.



Anexo 4. Cromatogramas de CG-MS de *Lasiodiplodia theobromae* (UCD256Ma) incubado en sales de Vogel suplementado con varias fuentes de carbono A; glucosa al 5%. B; aceite de semilla de uva al 5% C; fructosa al 5%. D; La combinación de glucosa al 5%+ aceite de semilla de uva al 5%.

Anexo 5. Funciones moleculares enriquecidos en *Lasiodiplodia theobromae* incubado en sales de Vogel suplementado con glucosa al 5% + aceite de semilla de uva al 5%, determinado con prueba Hipergeométrica (p -valor < 0.05) con el programa Cytoscape BiNGO.

P-valor corregido	% Enriquecimiento	Descripción	Genes detectados
3.15E-04	84.2%	catalytic activity	P80534 P11977 Q4WLN1 A7F1E9 P50125 P30575 Q5B135 P83783 P87208 P82610 P20445 P83778 P62820 O13437 P46614 Q0QHL3
4.32E-02	31.6%	transferase activity	P80534 P11977 P82610 P50125 P46614 Q0QHL3
1.15E-04	26.3%	lyase activity	Q4WLN1 Q5B135 P87208 P50125 P30575
1.03E-04	21.1%	carbon-oxygen lyase activity	Q4WLN1 Q5B135 P50125 P30575
2.30E-02	21.1%	oxidoreductase activity	P80534 P20445 P83778 O13437
4.29E-04	15.8%	hydro-lyase activity	Q4WLN1 Q5B135 P30575
1.40E-03	15.8%	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	P80534 P20445 O13437
2.29E-03	15.8%	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors	P80534 P20445 O13437
5.79E-05	10.5%	phosphopyruvate hydratase activity	Q5B135 P30575
8.84E-04	10.5%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity	P80534 P20445

Anexo 5. Continuación

P-valor corregido	% Enriquecimiento	Descripción	Genes detectados
1.05E-03	5.3%	phenylpyruvate decarboxylase activity	P87208
2.29E-03	5.3%	high molecular weight kininogen binding	P30575
3.15E-03	5.3%	pyruvate decarboxylase activity	P87208
3.15E-03	5.3%	O-acetylhomoserine aminocarboxypropyltransferase activity	P50125
3.15E-03	5.3%	kininogen binding	P30575
3.15E-03	5.3%	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase	P82610
3.15E-03	5.3%	5-methyltetrahydropteroyltri-L-glutamate-dependent methyltransferase activity	P82610
3.95E-03	5.3%	Rab GDP-dissociation inhibitor activity	P21856
7.93E-03	5.3%	pyruvate kinase activity	P46614
8.39E-03	5.3%	phosphoglycerate kinase activity	P11977
8.39E-03	5.3%	peptidyl-cysteine S-nitrosylase activity	P80534
8.39E-03	5.3%	cysteine synthase activity	P50125

Anexo 5. Continuación

P-valor corregido	% Enriquecimiento	Descripción	Genes detectados
8.77E-03	5.3%	GDP-dissociation inhibitor activity	P21856
9.49E-03	5.3%	citrate (Si)-synthase activity	Q0QHL3
1.09E-02	5.3%	malate dehydrogenase activity	P83778
1.09E-02	5.3%	methionine synthase activity	P82610
1.09E-02	5.3%	formate dehydrogenase (NAD+) activity	O13437
1.09E-02	5.3%	5-methyltetrahydrofolate-dependent methyltransferase activity	P82610
1.14E-02	5.3%	citrate synthase activity	Q0QHL3
1.38E-02	5.3%	NAD+ binding	O13437
1.38E-02	5.3%	aconitate hydratase activity	Q4WLN1
1.38E-02	5.3%	trialkylsulfonium hydrolase activity	P83783
1.38E-02	5.3%	adenosylhomocysteinase activity	P83783
1.38E-02	5.3%	NADHX epimerase activity	A7F1E9

Anexo 5. Continuación

P-valor corregido	% Enriquecimiento	Descripción	Genes detectados
1.77E-02	5.3%	phosphotransferase activity, carboxyl group as acceptor	P11977
2.14E-02	5.3%	transferase activity, transferring acyl groups, acyl groups converted into alkyl on transfer	Q0QHL3
2.92E-02	5.3%	S-methyltransferase activity	P82610
3.78E-02	5.3%	hydrolase activity, acting on ether bonds	P83783
4.32E-02	5.3%	structural constituent of cytoskeleton	P10653

Anexo 6. Componentes celulares enriquecidos en *Lasiodiplodia theobromae* incubado en sales de Vogel suplementado con glucosa al 5% + aceite de semilla de uva al 5%, determinado con prueba Hipergeométrica (p -valor < 0.05) con el programa Cytoscape BiNGO.

P-valor corregido	% Enriquecimiento	Descripción	Genes detectados
5.09E-03	95.83%	cell part	P80534 P53498 P11977 Q4WLN1 O42630 O73885 A7F1E9 P40292 P10653 P30575 Q9BXF3 P21856 Q5B135 P83783 P87208 Q6FPW3 P82610 P20445 P83778 P62820 O13437 P46614 Q0QHL3
7.00E-04	91.67%	intracellular	P80534 P53498 P11977 Q4WLN1 O42630 O73885 A7F1E9 P40292 P10653 P30575 Q9BXF3 P21856 Q5B135 P83783 P87208 Q6FPW3 P82610 P20445 P83778 P62820 O13437 Q0QHL3
4.17E-02	58.33%	cytoplasm	P80534 P53498 A7F1E9 P40292 P10653 P30575 P21856 P83783 Q6FPW3 P82610 P83778 P62820 O13437 Q0QHL3
1.81E-03	58.33%	cytoplasmic part	P80534 P53498 A7F1E9 P40292 P10653 P30575 P21856 P83783 Q6FPW3 P82610 P83778 P62820 O13437 Q0QHL3
2.69E-04	37.50%	cytosol	P80534 P21856 P83783 P40292 Q6FPW3 P82610 P62820 O13437 P30575
3.72E-04	16.67%	external encapsulating structure	P40292 P82610 P46614 P30575
2.19E-04	16.67%	cell wall	P40292 P82610 P46614 P30575

Anexo 6. Continuación

P-valor corregido	% Enriquecimiento	Descripción	Genes detectados
1.16E-06	16.67%	fungus-type cell wall	P40292 P82610 P46614 P30575
1.40E-02	12.50%	cell surface	P82610 P46614 P30575
2.64E-06	12.50%	hyphal cell wall	P82610 P46614 P30575
2.95E-04	8.33%	yeast-form cell wall	P46614 P30575
4.17E-02	4.17%	dynein complex	P53498
4.17E-02	4.17%	cytoplasmic dynein complex	P53498
3.98E-02	4.17%	cytoplasmic microtubule	P10653
3.81E-02	4.17%	cell septum	P40292

Anexo 6. Continuación

P-valor corregido	% Enrique-cimiento	Descripción	Genes detectados
2.64E-02	4.17%	axoneme part	P53498
1.69E-02	4.17%	axonemal dynein complex	P53498
1.42E-02	4.17%	GAIT complex	P80534
7.68E-03	4.17%	ISWI-type complex	Q9BXF3
7.48E-03	4.17%	inner dynein arm	P53498
7.25E-03	4.17%	tubulin complex	P10653
2.10E-03	4.17%	CERF complex	Q9BXF3
1.31E-03	4.17%	phosphopyruvate hydratase complex	P30575

Anexo 7. Ontología genética completa de las 74 proteínas identificadas y validadas con 100% de confianza.

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
D4NXE7	40S ribosomal protein S1	<i>Magnaporthe oryzae</i>	mycelium development [GO:0043581]; translation [GO:0006412]	structural constituent of ribosome [GO:0003735]	cytosolic small ribosomal subunit [GO:0022627]
P19115	40S ribosomal protein S14 (CRP2)	<i>Neurospora crassa</i>	maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA) [GO:0000462]; ribosomal small subunit assembly [GO:0000028]; translation [GO:0006412]	mRNA 5'-UTR binding [GO:0048027]; small ribosomal subunit rRNA binding [GO:0070181]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]	cytosolic small ribosomal subunit [GO:0022627]
P26783	40S ribosomal protein S5 (RP14) (S2) (YS8)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	cytoplasmic translation [GO:0002181]; regulation of translational fidelity [GO:0006450]; ribosomal small subunit assembly [GO:0000028]; rRNA export from nucleus [GO:0006407]; translation [GO:0006412]	mRNA binding [GO:0003729]; rRNA binding [GO:0019843]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]	cytosolic small ribosomal subunit [GO:0022627]
P26198	Actin, muscle	<i>Styela clava (Sea squirt)</i>		ATP binding [GO:0005524]	cytoplasm [GO:0005737]; cytoskeleton [GO:0005856]
P93371	Actin-93 (Fragment)	<i>Nicotiana tabacum (Common tobacco)</i>		ATP binding [GO:0005524]	cytoplasm [GO:0005737]; cytoskeleton [GO:0005856]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
C4YMW2	4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine phosphate synthase (HMP-P synthase) (Hydroxymethylpyrimidine phosphate synthase) (Thiamine biosynthesis protein 5) (Thiamine pyrimidine synthase)	Candida albicans (strain WO-1) (Yeast)	thiamine biosynthetic process [GO:0009228]; thiamine diphosphate biosynthetic process [GO:0009229]		
P42882	4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine phosphate synthase (HMP-P synthase) (Hydroxymethylpyrimidine phosphate synthase) (Thiamine pyrimidine synthase)	Aspergillus parasiticus	thiamine biosynthetic process [GO:0009228]; thiamine diphosphate biosynthetic process [GO:0009229]		
P82610	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14) (Cobalamin-independent methionine synthase) (Methionine synthase, vitamin-B12 independent isozyme)	Candida albicans (strain SC5314 / ATCC MYA-2876) (Yeast)	cellular response to heat [GO:0034605]; induction by symbiont of host defense response [GO:0044416]; methionine biosynthetic process	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase activity [GO:0003871]; zinc ion binding [GO:0008270]	cell surface [GO:0009986]; fungal-type cell wall [GO:0009277]; hyphal cell wall [GO:0030446]
P78712	Actin-related protein 3 (Actin-like protein 3)	Neurospora crassa (strain ATCC 24698 /74-OR23-1A)		ATP binding [GO:0005524]	cytoplasm [GO:0005737]; cytoskeleton [GO:0005856]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
Q8NKF4	60S ribosomal protein L3 (allergen Asp f 23)	Neosartorya fumigata (strain ATCC MYA-4609 / Af293 / CBS 101355 / FGSC A1100) (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	ribosomal large subunit assembly [GO:0000027]; translation [GO:0006412]	structural constituent of ribosome [GO:0003735]	cytosolic large ribosomal subunit [GO:0022625]
Q54XI5	60S ribosomal protein L9	Dictyostelium discoideum (Slime mold)	cytoplasmic translation [GO:0002181]	RNA binding [GO:0003723]; rRNA binding [GO:0019843]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]	cytosolic large ribosomal subunit [GO:0022625]; phagocytic vesicle [GO:0045335]
P78695	78 kDa glucose-regulated protein homolog (GRP-78) (Immunoglobulin heavy chain-binding protein homolog) (BiP)	<i>Neurospora crassa</i> (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987)		ATP binding [GO:0005524]	endoplasmic reticulum lumen [GO:0005788]
P53498	Actin	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (<i>Chlamydomonas smithii</i>)		ATP binding [GO:0005524]	cytoplasm [GO:0005737]; inner dynein arm [GO:0036156]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
A5VSE3	ATP synthase subunit alpha (EC 3.6.3.14) (ATP synthase F1 sector subunit alpha) (F-ATPase subunit alpha)	<i>Brucella ovis</i> (strain ATCC 25840 / 63/290 / NCTC 10512)	ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]; ATP synthesis coupled proton transport [GO:0015986]	ATP binding [GO:0005524]; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism [GO:0046961]; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism [GO:0046933]	plasma membrane [GO:0005886]; proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1) [GO:0045261]
P37211	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	<i>Neurospora crassa</i> (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987)	ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]; ATP synthesis coupled proton transport [GO:0015986]	ATP binding [GO:0005524]; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism [GO:0046961]; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism [GO:0046933]	mitochondrial inner membrane [GO:0005743]; proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1) [GO:0045261]
Q1MAZ2	ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14) (ATP synthase F1 sector subunit beta) (F-ATPase subunit beta)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (strain 3841)	ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]; ATP synthesis coupled proton transport [GO:0015986]	ATP binding [GO:0005524]; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism [GO:0046933]	plasma membrane [GO:0005886]; proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1) [GO:0045261]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
P23704	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (EC 3.6.3.14)	<i>Neurospora crassa</i> (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987)	ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]; ATP synthesis coupled proton transport [GO:0015986]	ATP binding [GO:0005524]; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism [GO:0046933]	mitochondrial inner membrane [GO:0005743]; proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1) [GO:0045261]
A1CJT5	ATP-dependent RNA helicase eIF4A (EC 3.6.4.13) (Eukaryotic initiation factor 4A) (eIF-4A) (Translation initiation factor 1)	<i>Aspergillus clavatus</i> (strain ATCC 1007 / CBS 513.65 / DSM 816 / NCTC 3887 / NRRL 1)		ATP binding [GO:0005524]; helicase activity [GO:0004386]; translation initiation factor activity [GO:0003743]	cytosol [GO:0005829]
A2QEN5	ATP-dependent RNA helicase eIF4A (EC 3.6.4.13) (Eukaryotic initiation factor 4A) (eIF-4A) (Translation initiation factor 1)	<i>Aspergillus niger</i> (strain CBS 513.88 / FGSC A1513)		ATP binding [GO:0005524]; helicase activity [GO:0004386]; translation initiation factor activity [GO:0003743]	cytoplasm [GO:0005737]
Q8X1P0	Catalase (EC 1.11.1.6)	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. hordei (Barley powdery mildew) (<i>Oidium monilioides</i> f. sp. hordei)	hydrogen peroxide catabolic process [GO:0042744]; response to oxidative stress [GO:0006979]	catalase activity [GO:0004096]; heme binding [GO:0020037]; metal ion binding [GO:0046872]	

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
Q01359	Cytochrome c oxidase subunit 6, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide VI)	Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987)	mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen [GO:0006123]	cytochrome-c oxidase activity [GO:0004129]; metal ion binding [GO:0046872]	mitochondrial respiratory chain complex IV [GO:0005751]
P28295	Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	Absidia glauca (Pin mould)		GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor activity [GO:0003746]	cytoplasm [GO:0005737]
P34825	Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei)		GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor activity [GO:0003746]	cytoplasm [GO:0005737]
Q01765	Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	Podospora curvicolla		GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor activity [GO:0003746]	cytoplasm [GO:0005737]
POCT53	Elongation factor 1-alpha-A (EF-1-alpha-A)	Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) (Fission yeast)	cytoplasmic translational elongation [GO:0002182]	calmodulin binding [GO:0005516]; GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor activity [GO:0003746]	cytosol [GO:0005829]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
Q96X45	Elongation factor 2 (EF-2) (Colonial temperature-sensitive 3)	Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987)	translation [GO:0006412]	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor activity [GO:0003746]	cytoplasm [GO:0005737]; intracellular [GO:0005622]
Q756H2	Enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydrolyase) (2-phosphoglycerate dehydratase)	Ashbya gossypii (strain ATCC 10895 / CBS 109.51 / FGSC 9923 / NRRL Y-1056) (Yeast) (Eremothecium gossypii)	glycolytic process [GO:0006096]	magnesium ion binding [GO:0000287]; phosphopyruvate hydratase activity [GO:0004634]	phosphopyruvate hydratase complex [GO:0000015]
Q6W3C0	Enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydrolyase) (2-phosphoglycerate dehydratase)	Tuber borchii (White truffle)	glycolytic process [GO:0006096]	magnesium ion binding [GO:0000287]; phosphopyruvate hydratase activity [GO:0004634]	phosphopyruvate hydratase complex [GO:0000015]
Q5B135	Enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydrolyase) (2-phosphoglycerate dehydratase)	Emericella nidulans (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) (Aspergillus nidulans)	carbon utilization [GO:0015976]; cellular response to farnesol [GO:0097308]; cellular response to osmotic stress [GO:0071470]	magnesium ion binding [GO:0000287]; phosphopyruvate hydratase activity [GO:0004634]	intracellular [GO:0005622]; phosphopyruvate hydratase complex [GO:0000015]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
Q9HDT3	Enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydrolyase) (2-phosphoglycerate dehidratase) (Alérgen Alt a 11) (Alérgen Alt a 5) (Alérgen Alt a XI) (alérgen Alt a 6)	Alternaria alternata (Alternaria rot fungus) (Torula alternata)	glycolytic process [GO:0006096]	magnesium ion binding [GO:0000287]; phosphopyruvate hydratase activity [GO:0004634]	phosphopyruvate hydratase complex [GO:0000015]
P42040	Enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydrolyase) (2-phosphoglycerate dehidratase) (Alérgen Cla h VI) (alérgen Cla h 6)	Davidiella tassiana (Mycosphaerella tassiana) (Cladosporium herbarum)	glycolytic process [GO:0006096]	magnesium ion binding [GO:0000287]; phosphopyruvate hydratase activity [GO:0004634]	phosphopyruvate hydratase complex [GO:0000015]
Q7RV85	Enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydrolyase) (2-phosphoglycerate dehidratase) (Embden-meyerhof pathway protein 7)	Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987)	glycolytic process [GO:0006096]	magnesium ion binding [GO:0000287]; phosphopyruvate hydratase activity [GO:0004634]	phosphopyruvate hydratase complex [GO:0000015]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
P30575	Enolase 1 (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (2-phosphoglycerate dehydratase)	Candida albicans (strain SC5314 / ATCC MYA-2876) (Yeast)	entry into host [GO:0044409]; filamentous growth [GO:0030447]; filamentous growth of a population of unicellular organisms in response to biotic stimulus [GO:0036180]; gluconeogenesis [GO:0006094]; glycolytic process [GO:0006096]; induction by symbiont of host defense response [GO:0044416]	high molecular weight kininogen binding [GO:0030985]; magnesium ion binding [GO:0000287]; phosphopyruvate hydratase activity [GO:0004634]	cell surface [GO:0009986]; cytosol [GO:0005829]; extracellular region [GO:0005576]; fungal-type cell wall [GO:0009277]; hyphal cell wall [GO:0030446]; intracellular [GO:0005622]; membrane [GO:0016020]; nucleus [GO:0005634]; phosphopyruvate hydratase complex [GO:0000015]; plasma membrane [GO:0005886]; yeast-form cell wall [GO:0030445]
P53430	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12)	Monascus purpureus (Monascus anka)	glucose metabolic process [GO:0006006]; glycolytic process [GO:0006096]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity [GO:0004365]; NAD binding [GO:0051287]; NADP binding [GO:0050661]	cytoplasm [GO:0005737]
P32637	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12)	Podospira anserina (Pleurage anserina)	glucose metabolic process [GO:0006006]; glycolytic process [GO:0006096]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity [GO:0004365]; NAD binding [GO:0051287]; NADP binding [GO:0050661]	cytoplasm [GO:0005737]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
P20445	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12)	Emericella nidulans (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) (<i>Aspergillus nidulans</i>)	cellular response to drug [GO:0035690]; cellular response to osmotic stress [GO:0071470]; gluconeogenesis [GO:0006094]; glycolytic process [GO:0006096]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity [GO:0004365]; NAD binding [GO:0051287]; NADP binding [GO:0050661]	cytoplasm [GO:0005737]; intracellular [GO:0005622]
Q01982	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12)	Phanerochaete chrysosporium (White-rot fungus) (<i>Sporotrichum pruinosum</i>)	glucose metabolic process [GO:0006006]; glycolytic process [GO:0006096]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity [GO:0004365]; NAD binding [GO:0051287]; NADP binding [GO:0050661]	cytoplasm [GO:0005737]
Q96US8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12)	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (White mold) (<i>Whetzelinia sclerotiorum</i>)	glucose metabolic process [GO:0006006]; glycolytic process [GO:0006096]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity [GO:0004365]; NAD binding [GO:0051287]; NADP binding [GO:0050661]	cytoplasm [GO:0005737]
P20287	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (Major larval surface antigen) (P-37)	<i>Schistosoma mansoni</i> (Blood fluke)	glucose metabolic process [GO:0006006]; glycolytic process [GO:0006096]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity [GO:0004365]; NAD binding [GO:0051287]; NADP binding [GO:0050661]	

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
P17730	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 (GAPDH2) (EC 1.2.1.12)	Trichoderma koningii (Hypocrea koningii)	glucose metabolic process [GO:0006006]; glycolytic process [GO:0006096]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity [GO:0004365]; NAD binding [GO:0051287]; NADP binding [GO:0050661]	cytoplasm [GO:0005737]
Q5B0C0	Heat shock 70 kDa protein	Emericella nidulans (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) (Aspergillus nidulans)	cellular response to osmotic stress [GO:0071470]; protein folding [GO:0006457]; spore germination [GO:0009847]	ATP binding [GO:0005524]	mitochondrion [GO:0005739]
P40918	Heat shock 70 kDa protein (Allergen Cla h IV) (allergen Cla h 4)	Davidiella tassiana (Mycosphaerella tassiana) (Cladosporium herbarum)		ATP binding [GO:0005524]	
P87047	Heat shock 70 kDa protein 1	Paracoccidioides lutzii (strain ATCC MYA-826 / Pb01) (Paracoccidioides brasiliensis)		ATP binding [GO:0005524]	
P33125	Heat shock protein 82	Ajellomyces capsulatus (Darling's disease fungus) (Histoplasma capsulatum)	protein folding [GO:0006457]; response to stress [GO:0006950]	ATP binding [GO:0005524]	cytoplasm [GO:0005737]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
P40292	Heat shock protein 90 (65 kDa IgE-binding protein) (Heat shock protein hsp1) (allergen Asp f 12)	Neosartorya fumigata (strain ATCC MYA-4609 / Af293 / CBS 101355 / FGSC A1100) (Aspergillus fumigatus)	protein folding [GO:0006457]; response to stress [GO:0006950]	ATP binding [GO:0005524]	cell septum [GO:0030428]; cytosol [GO:0005829]; fungal-type cell wall [GO:0009277]
P78567	Histone H2B	Agaricus bisporus (White button mushroom)		DNA binding [GO:0003677]	nucleosome [GO:0000786]; nucleus [GO:0005634]
P37210	Histone H2B	Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987)	nucleosome assembly [GO:0006334]	DNA binding [GO:0003677]	nuclear nucleosome [GO:0000788]
P50125	Homocysteine synthase (EC 2.5.1.49) (O-acetylhomoserine sulfhydrylase) (OAH SHL) (OAH sulfhydrylase)	Emericella nidulans (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) (Aspergillus nidulans)	'de novo' L-methionine biosynthetic process [GO:0071266]; cysteine biosynthetic process via cystathionine [GO:0019343]; cysteine metabolic process [GO:0006534]; transsulfuration [GO:0019346]	cysteine synthase activity [GO:0004124]; O-acetylhomoserine aminocarboxypropyltransferase activity [GO:0003961]; pyridoxal phosphate binding [GO:0030170]	cytoplasm [GO:0005737]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
Q92441	Homocysteine/cysteine synthase (EC 2.5.1.47) (EC 2.5.1.49) (O-acetylserine/O-acetylhomoserine sulfhydrylase) (OAS-OAH SHLase) (OAS-OAH sulfhydrylase)	Kluyveromyces lactis (strain ATCC 8585 / CBS 2359 / DSM 70799 / NBRC 1267 / NRRL Y-1140 / WM37) (Yeast) (Candida sphaerica)		cysteine synthase activity [GO:0004124]; O-acetylhomoserine aminocarboxypropyltransferase activity [GO:0003961]; pyridoxal phosphate binding [GO:0030170]	cytoplasm [GO:0005737]
POCT06	Isocitrate lyase (ICL) (Isocitrase) (EC 4.1.3.1) (Methylisocitrate lyase) (MICA) (EC 4.1.3.30) (Threo-D(S)-isocitrate glyoxylate-lyase)	Magnaporthe oryzae (strain 70-15 / ATCC MYA-4617 / FGSC 8958) (Rice blast fungus) (Pyricularia oryzae)	glyoxylate cycle [GO:0006097]; tricarboxylic acid cycle [GO:0006099]	isocitrate lyase activity [GO:0004451]; metal ion binding [GO:0046872]; methylisocitrate lyase activity [GO:0046421]	glyoxysome [GO:0009514]
P38674	Ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial (EC 1.1.1.86) (Acetohydroxy-acid reductoisomerase) (Alpha-keto-beta-hydroxylacyl reductoisomerase)	Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987)	isoleucine biosynthetic process [GO:0009097]; valine biosynthetic process [GO:0009099]	ketol-acid reductoisomerase activity [GO:0004455]; metal ion binding [GO:0046872]	mitochondrion [GO:0005739]
P14228	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei)	glycolytic process [GO:0006096]	ATP binding [GO:0005524]; phosphoglycerate kinase activity [GO:0004618]	cytoplasm [GO:0005737]
P24590	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	Hypocrea rufa (Trichoderma viride)	glycolytic process [GO:0006096]	ATP binding [GO:0005524]; phosphoglycerate kinase activity [GO:0004618]	cytoplasm [GO:0005737]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
O60101	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) (Fission yeast)	glycolytic process [GO:0006096]	ATP binding [GO:0005524]; phosphoglycerate kinase activity [GO:0004618]	cytosol [GO:0005829]; nucleus [GO:0005634]
P11977	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	Emericella nidulans (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) (Aspergillus nidulans)	glycolytic process [GO:0006096]	ATP binding [GO:0005524]; phosphoglycerate kinase activity [GO:0004618]	cytoplasm [GO:0005737]; intracellular [GO:0005622]
P41756	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40) (Yellow koji mold)	glycolytic process [GO:0006096]	ATP binding [GO:0005524]; phosphoglycerate kinase activity [GO:0004618]	cytoplasm [GO:0005737]
P87208	Pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1)	Emericella nidulans (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) (Aspergillus nidulans)		magnesium ion binding [GO:0000287]; pyruvate decarboxylase activity [GO:0004737]; thiamine pyrophosphate binding [GO:0030976]	intracellular [GO:0005622]
P22360	Pyruvate kinase (PK) (EC 2.7.1.40)	Emericella nidulans (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) (Aspergillus nidulans)	canonical glycolysis [GO:0061621]; pyruvate biosynthetic process [GO:0042866]	ATP binding [GO:0005524]; kinase activity [GO:0016301]; magnesium ion binding [GO:0000287]; potassium ion binding [GO:0030955]	cytosol [GO:0005829]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
O48661	Spermidine synthase 2 (SPDSY 2) (EC 2.5.1.16) (Putrescine aminopropyltransferase 2)	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)	spermidine biosynthetic process [GO:0008295]	spermidine synthase activity [GO:0004766]	plasma membrane [GO:0005886]
J9MJK9	Transaldolase (FoTal) (EC 2.2.1.2)	Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (strain 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) (Fusarium vascular wilt of tomato)	carbohydrate metabolic process [GO:0005975]; pentose-phosphate shunt [GO:0006098]	sedoheptulose-7-phosphate-D-glyceraldehyde-3-phosphate glyceronetransferase activity [GO:0004801]	cytosol [GO:0005829]; nucleus [GO:0005634]
Q9HGY8	Triosephosphate isomerase (TIM) (EC 5.3.1.1) (Triose-phosphate isomerase)	Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40) (Yellow koji mold)	gluconeogenesis [GO:0006094]; glycolytic process [GO:0006096]; pentose-phosphate shunt [GO:0006098]	triose-phosphate isomerase activity [GO:0004807]	
Q5I2J3	Tubulin alpha chain (Alpha-tubulin)	Gibberella zeae (strain PH-1 / ATCC MYA-4620 / FGSC 9075 / NRRL 31084) (Wheat head blight fungus) (Fusarium graminearum)	microtubule-based process [GO:0007017]	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]	cytoplasm [GO:0005737]; microtubule [GO:0005874]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
P24634	Tubulin alpha-2 chain	<i>Emericella nidulans</i> (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) (<i>Aspergillus nidulans</i>)	ascospore formation [GO:0030437]; meiotic nuclear division [GO:0007126]; microtubule-based process [GO:0007017]	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]	cytoplasm [GO:0005737]; microtubule [GO:0005874]
P38669	Tubulin alpha-B chain	<i>Neurospora crassa</i> (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987)	microtubule-based process [GO:0007017]	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]	cytoplasm [GO:0005737]; microtubule [GO:0005874]
P41799	Tubulin beta chain (Beta-tubulin)	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> (strain SN15 / ATCC MYA-4574 / FGSC 10173) (<i>Glume blotch fungus</i>) (<i>Septoria nodorum</i>)	microtubule-based process [GO:0007017]	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]	cytoplasm [GO:0005737]; microtubule [GO:0005874]
Q9LKI8	Tubulin beta chain (Beta-tubulin)	<i>Thalassiosira weissflogii</i> (Marine diatom)	microtubule-based process [GO:0007017]	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]	cytoplasm [GO:0005737]; microtubule [GO:0005874]

Anexo 7. Continuación

# Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Organismo	Ontología de proceso biológico	Ontología de función molecular	Ontología de componentes celulares
P10653	Tubulin beta-1 chain (Beta-1-tubulin)	<i>Emericella nidulans</i> (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) (<i>Aspergillus nidulans</i>)	microtubule-based process [GO:0007017]; microtubule depolymerization [GO:0007019]; mitotic sister chromatid segregation [GO:0000070]; mitotic spindle disassembly [GO:0051228]; nuclear migration along microtubule [GO:0030473]; response to antibiotic [GO:0046677]	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]	cytoplasmic microtubule [GO:0005881]; spindle microtubule [GO:0005876]; tubulin complex [GO:0045298]
P11593	V-type proton ATPase subunit B (V-ATPase subunit B) (V-ATPase 57 kDa subunit) (Vacuolar proton pump subunit B)	<i>Neurospora crassa</i> (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987)	ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]; ATP metabolic process [GO:0046034]	ATP binding [GO:0005524]; hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances [GO:0016820]	proton-transporting V-type ATPase, V1 domain [GO:0033180]
P87252	Woronin body major protein	<i>Neurospora crassa</i> (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987)	positive regulation of translational elongation [GO:0045901]; positive regulation of translational termination [GO:0045905]; translational frameshifting [GO:0006452]	ribosome binding [GO:0043022]; translation elongation factor activity [GO:0003746]	peroxisome [GO:0005777]

Anexo 8 Receta de sales de Vogel, basado en Vogel, 1956 (Vogel, 1956).**Sales de Vogel:**

Agua 755 ml
Citrato de sodio.2H₂O 125 g
KH₂PO₄ 250 g
NH₄NO₃ 10 g
MgSO₄.7 H₂O 10 g
CaCl₂. 2H₂O 5g
Elementos traza: 5 ml
Biotina (0.1 mg/mL) 2.5 ml

Elementos traza:

Ácido cítrico.1 H₂O 5g
ZnSO₄.7 H₂O 5g
Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6 H₂O 1g
CuSO₄.5 H₂O 0.25 g
MnSO₄.1 H₂O 0.05 g
H₃BO₃ (anhidro) 0.05 g
Na₂MoO₄.2 H₂O 0.05 g
95 mL H₂O