

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



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación en
Microbiología Celular y Molecular**

**Identificación de sideróforos y ácido oxálico producidos por
Lasiodiplodia spp.**

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

Presenta:

Andrea Guzmán Páez

Ensenada, Baja California, México
2020

Tesis defendida por

Andrea Guzmán Páez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de tesis

Miembros del comité

Dra. Jimena Carrillo Tripp

Dr. Thomas Gunter Kretzschmar

Dr. Iván Córdova Guerrero



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Andrea Guzmán Páez © 2020

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Andrea Guzmán Páez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular.

Identificación de sideróforos y ácido oxálico producidos por *Lasiodiplodia* spp.

Resumen aprobado por:

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de tesis

El género *Lasiodiplodia* es uno de los agentes causales de enfermedades de la madera en gran número de plantas hospederas. Las especies de este género pueden producir distintas moléculas bioactivas, denominadas metabolitos secundarios, derivados de vías metabólicas centrales y aminoácidos. Los sideróforos son moléculas de bajo peso con gran afinidad por el hierro, reportados como un factor de virulencia en hongos fitopatógenos. Estudios previos indicaron que algunas especies de *Lasiodiplodia* producen sideróforos, pero, se desconocían los tipos. Un ensayo universal CAS reveló la producción de más de un tipo de sideróforo en *L. brasiliense* y una cantidad significativamente mayor de unidades de sideróforos (46%) comparado con *Lasiodiplodia gilanensis* (32%). Usando la cepa de *L. brasiliense*, se hicieron extracciones preliminares de moléculas de naturaleza hidroxamato y catecolato, encontrándose toxicidad de los extractos crudos, principalmente de los de naturaleza catecolato, en discos de hojas de vid. Por otro lado, uno de los compuestos que producen algunos hongos fitopatógenos para iniciar la despolimerización de la pared celular del hospedero, es el ácido oxálico. Este compuesto está involucrado en la supresión de la generación de especies reactivas de oxígeno comprometiendo la acción de los mecanismos de defensa del hospedero, pero, su síntesis en el género *Lasiodiplodia* no había sido estudiada. Por ello, se evaluó la capacidad de *Lasiodiplodia brasiliense* y *L. gilanensis* para producir cristales de oxalato de calcio. Los análisis de microscopía óptica y SEM-EDS, evidenciaron la presencia de cristales mayormente tetragonales, compuestos de carbono, hidrógeno y oxígeno. La titulación con permanganato de potasio confirmó la presencia del ion oxalato en los cristales recuperados. Adicionalmente, se encontró que la producción de ácido oxálico es común en miembros de familia Botryosphaeriaceae. Este trabajo contribuye con el análisis de metabolitos secundarios de *Lasiodiplodia* spp. y el papel que podrían jugar en la patogénesis como un paso inicial para el diseño de estrategias para contender los daños causados por los hongos de la madera.

Palabras clave: metabolitos secundarios, sideróforos, ácido oxálico, *Lasiodiplodia* spp.

Abstract of the thesis presented by **Andrea Guzmán Páez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Cellular and Molecular Microbiology

Identification of siderophores and oxalic acid produced by *Lasiodiplodia* spp.

Abstract approved by:

PhD. Rufina Hernández Martínez
Thesis Director

The genus *Lasiodiplodia* is one of the causal agents of trunk diseases in a wide range of host plants. Species of this genus produce different bioactive molecules, called secondary metabolites, derived from central metabolic pathways, and amino acids. Siderophores are low weight molecules with high affinity for iron that have been reported as virulence factor in some phytopathogenic fungi. Previous studies showed that some *Lasiodiplodia* species produce siderophores, but the types were unknown. A universal CAS test revealed the production of more than one type of siderophore in *Lasiodiplodia brasiliense* MXBCL28 and a significantly higher number of siderophore units (46%) than *Lasiodiplodia gilanensis* UCD256Ma (32%). Using the *L. brasiliense* strain, preliminary extractions of hydroxamate and catecholate molecules were made, and toxicity of the crude extracts, mainly those of a catecholate nature, in vine leaf discs were found. On the other hand, one of the compounds produced by some phytopathogenic fungi to initiate the depolymerization of the host cell wall is oxalic acid. This compound is involved in the suppression of the generation of reactive oxygen species, compromising the action of the host defense mechanisms, but its synthesis in the *Lasiodiplodia* genus had not been studied. Therefore, the ability of *L. brasiliense* and *L. gilanensis* to produce calcium oxalate crystals was evaluated. Optical microscopy and SEM-EDS analyzes showed the presence of mostly tetragonal crystals, composed of carbon, hydrogen and oxygen. Titration with potassium permanganate confirmed the presence of the oxalate in recovered crystals. Additionally, oxalic acid production was found to be common in members of the Botryosphaeriaceae family. This work contributes to the analysis of secondary metabolites of *Lasiodiplodia* spp. and the role they could play in the pathogenesis, as an initial step for the design of strategies to control the damage caused by wood fungi.

Keywords: secondary metabolites, siderophores, oxalic acid, *Lasiodiplodia* spp.

Dedicatoria

A Dios por permitirme cerrar un ciclo maravilloso en mi vida y por acompañarme en cada uno de mis pasos, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte.

A mi familia, a mi madre por su amor incondicional y apoyo, por ser pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, y por inculcar en mí el sabio don de la responsabilidad. A mi hermano por su confianza, apoyo, amor, palabras de ánimo, por ser mi compañero, mi ejemplo y el mejor amigo que la vida me regaló.

A las personas que se fueron sin poder decir adiós y me permitieron romperme para poder crecer más fuerte, con su partida me hicieron ver la vida de manera distinta y se convirtieron en una motivación para seguir adelante. Va por ustedes.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por la beca de manutención (No. 893470) otorgada para realizar mis estudios de posgrado. Al Centro de Educación Científica y de Educación Superior de Ensenada (**CICESE**) por abrirme sus puertas para continuar formándome profesionalmente y, en conjunto con el **Posgrado en Ciencias de la Vida**, por el apoyo económico otorgado para concluir satisfactoriamente con este proyecto a pesar de las circunstancias.

Al **Departamento de Microbiología** y, especialmente, al **Laboratorio de Fitopatología** por tener a disposición de sus estudiantes equipos e instalaciones de primera para la realización de proyectos de investigación de calidad, así como a todas las personas que los componen, investigadores, técnicos y compañeros, por sus comentarios y aportaciones durante el desarrollo de este trabajo, así como los ratos de convivencia en simposios, congresos y comidas de festejos de fechas importantes.

A la **Dra. Rufina Hernández**, por responder en 2016 aquel correo de una estudiante de licenciatura con ganas de aprender de usted y por darme la oportunidad de conocer el mundo de la ciencia y permitirme creer que había un lugar para mí en el, por siempre confiar en mi trabajo y por emocionarse, incluso más que yo, cuando algo salía bien.

A mi comité de tesis, a la **Dra. Jimena Carrillo**, **Dr. Thomas Kretzschmar** y al **Dr. Iván Córdova**, por su tiempo, sus aportaciones y por poner a disposición del trabajo sus conocimientos, su trabajo y sus laboratorios.

Al **M. I. Humberto Fabian Alonso**, técnico titular del Microscopio Electrónico de Barrido del departamento de Óptica de la División de Física Aplicada, y al **Ing. Luis Carlos Gradilla**, técnico titular responsable Microscopio Electrónico de Barrido acoplado a la sonda EDS del departamento de Geología de la División de Ciencias de la Tierra, ambos en CICESE, por dirigirme al momento de realizar la evaluación de los cristales de oxalato de calcio.

A la **Dra. Laura Díaz**, gracias por todo tu trabajo, por siempre estar dispuesta a aprender y a ayudar, por tu invaluable asesoría en toda la parte química del trabajo, por compartir experiencias y maneras distintas de trabajar, pero sobre todo por hacer las últimas (y más complicadas) semanas de trabajo en laboratorio más amenas con tu personalidad, pláticas y compañía.

A **Edel** por ser un ejemplo de trabajo, fortaleza e inteligencia. Por estar siempre con la disposición de ayudar, por tus comentarios, consejos y aportaciones siempre acertadas. Por ser la mejor amiga, compañera y segunda jefa con la que pudimos encontrarnos

A mi mejor amiga **Carmen**, por estar en las buenas, en las malas, en las peores y en cuarentena, por las tardes en la oficina, por el excelente equipo que supimos hacer, por en dos años regalarme la amistad más bonita de todas.

A ti **Lluvia** por aquel “son de Sinaloa cáiganse bien” que al final se logró, no sé ni como, ni desde cuando, pero gracias por convertirte en guía, amiga, ejemplo y sin duda de los regalos más bonitos que me llevo para toda la vida.

A la **Generación CdIV 2018**, porque si en aquel caótico fin del primer cuatrimestre nos hubiéramos imaginado todo lo que se nos venía encima no lo hubiéramos creído, gracias por ser un grupo maravilloso, empático, lleno de fortaleza y siempre dispuestos a ayudar. Me quedo con lo mejor de cada uno y #LQMYLQVT.

A todos aquellos con los que pude coincidir en el **Fitopatolab**, investigadores y compañeros, especialmente a **Sharo** y **Marisela** por darme la oportunidad de aprender de ustedes, guiarlas y acompañarlas en sus prácticas.

A los micros, **Leobardo, Fausto, Ariane, Lucia, Scarlett, José Luis, Alex** y **Lolis**, por prepararme para lo que no te cuentan del posgrado y como sobrevivir a él. Por adoptarnos e incluirnos en sus tradicionales comidas y viernes de pláticas en la casita.

A mis amigos: **Molly**, gracias por permitirme vivir a tu lado momentos felices y tomar tu mano cuando fue necesario, por las pláticas en el laboratorio, por tu alegría y por ser un ejemplo para ser mejor siempre; **Verónica**, por escucharme, acompañarme en los momentos felices, de risas y por estar en los peores; **Diana**, por ser tú, por tantas risas, por hacerme madurar y ver las cosas desde una perspectiva distinta; **José Luis**, por la peculiar amistad, y por el apoyo siempre; **Isaí**, gracias por una amistad llena de memes y del dramatismo musical que le hacía falta a mi vida; **Alison**, porque contigo todo fueron risas y ganas de ser mejor ser humano; **Marylin**, por ser un ejemplo de responsabilidad y superación, por todos los exámenes, clases y trabajos juntas; **Monse**, por siempre motivarnos, por las risas y por los días que el dinosaurio se apoderaba de nuestro salón; **Juan**, gracias por tu ayuda en los primeros cuatrimestres, por compartir tu conocimiento e inteligencia con quienes lo necesitamos; **Tonancy**, por la sonrisa con la que me recibías al llegar al laboratorio; **Salvador**, gracias por ser un ejemplo de que no importa que tan complicadas parezcan las cosas siempre se puede salir adelante, por compartir tu laboratorio y por tus visitas al nuestro. A ti **Roberto** por convertirte en una inspiración para cumplir mis metas.

A **Fer, Andrea, Monica, María de la Luz** y **Sharon** por estar y acompañarme aún en la distancia, por tratar de entenderme y animarme siempre.

A mi familia, por su apoyo, consejos, ánimo, respaldo, confianza y amor que siempre me han brindado, especialmente a mis tíos, **Alberto** y **María Andrea**, a mis primas, **Thalia, Pamela** y **Denisse**, por recibirme y adoptarme. A las tres bendiciones, **Gael, Jaime** y **Elisa** por hacerme reír y por dejarme verlos crecer.

A mi **madre** y **hermano**, por sus palabras de aliento, por ser mi mayor inspiración, por confiar en mí, incluso más que yo misma, y ser mi apoyo incondicional. Gracias por acompañarme en los momentos difíciles y recordarme mi misión.

Tabla de contenido

| | Página |
|---|--------|
| Resumen en español..... | i |
| Resumen en inglés | ii |
| Dedicatorias..... | iii |
| Agradecimientos..... | iv |
| Lista de figuras..... | viii |
| Lista de tablas..... | ix |
| | |
| Capítulo 1. Introducción | |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1 Antecedentes..... | 3 |
| 1.1.1 El género <i>Lasiodiplodia</i> | 3 |
| 1.1.2 Metabolitos secundarios..... | 4 |
| 1.1.3 Producción de sideróforos..... | 4 |
| 1.1.3.1 Características estructurales de los sideróforos..... | 5 |
| 1.1.3.2 Efectos y aplicaciones de los sideróforos..... | 6 |
| 1.1.4 Ácido Oxálico..... | 7 |
| 1.1.4.1 Síntesis del Ácido Oxálico..... | 7 |
| 1.1.4.2 Funciones del Ácido Oxálico..... | 8 |
| 1.2. Justificación..... | 8 |
| 1.3 Hipótesis..... | 9 |
| 1.4. Objetivos..... | 9 |
| 1.4.1 Objetivo general..... | 9 |
| 1.4.2 Objetivos específicos..... | 9 |
| | |
| Capítulo 2. Metodología | |
| 2.1 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento..... | 10 |
| 2.2 Sideróforos..... | 11 |
| 2.2.1 Evaluación de unidades de sideróforos..... | 11 |
| 2.2.2 Cuantificación de unidades de Sideróforos..... | 12 |
| 2.2.3 Análisis estadístico..... | 13 |
| 2.2.4 Extracción de sideróforos..... | 13 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.4.1 Hidroxamatos..... | 13 |
| 2.2.4.2 Catecolatos..... | 14 |
| 2.2.5 Bioensayo en hojas de vid..... | 14 |
| 2.3 Producción de cristales de Oxalato de Calcio..... | 14 |
| 2.3.1 Microscopía de campo claro/DIC..... | 15 |
| 2.3.2 Recuperación de cristales para evaluación microscópica..... | 15 |
| 2.3.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)..... | 16 |
| 2.3.4 Identificación del ion oxalato mediante prueba de permanganato..... | 16 |
| Capítulo 3. Resultados | |
| 3.1 Producción de sideróforos..... | 18 |
| 3.1.1 Análisis cualitativo de la producción de sideróforos..... | 18 |
| 3.1.2 Cuantificación de unidades de sideróforos..... | 18 |
| 3.1.3 Extracción de Sideróforos..... | 19 |
| 3.1.4 Bioensayo en hojas de vid..... | 20 |
| 3.2 Producción de cristales de Oxalato de Calcio..... | 21 |
| 3.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)..... | 23 |
| 3.2.2 Identificación del ion oxalato mediante prueba de permanganato..... | 26 |
| Capítulo 4. Discusión..... | 27 |
| Capítulo 5. Conclusiones | 31 |
| Capítulo 6. Recomendaciones | 32 |
| Literatura Citada..... | 33 |
| Anexos | 43 |
| Anexo A. Unidades de sideróforos producidas por <i>Lasiodiplodia</i> spp..... | 43 |
| Anexo B. Transcripción de valores obtenidos en el análisis elemental SEM-EDS..... | 44 |

Lista de figuras

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Características macro y microscópicas de <i>Lasiodiplodia brasiliense</i> MXBCL28 y <i>Lasiodiplodia gilanensis</i> UCD256Ma..... | 10 |
| 2 | Evaluación de producción de sideróforos en cepas de <i>Lasiodiplodia</i> en medio CAS después de tres días de incubación..... | 18 |
| 3 | Cuantificación de unidades de sideróforos producidas por cepas de <i>Lasiodiplodia</i> spp..... | 19 |
| 4 | Separación de compuestos tipo sideróforos producidos por <i>Lasiodiplodia brasiliense</i> MXBCL28 por cromatografía de capa fina (CCF)..... | 20 |
| 5 | Evaluación de la toxicidad de extractos orgánicos de tipo sideróforo producidos por <i>Lasiodiplodia brasiliense</i> MXBCL28 en tejido foliar de vid variedad Merlot..... | 21 |
| 6 | Micrografía de los cristales de oxalato de calcio producidos por cepas del género <i>Lasiodiplodia</i> al microscopio óptico..... | 22 |
| 7 | Micrografía de los cristales de oxalato de calcio producidos por cepas del género <i>Lasiodiplodia</i> en SEM..... | 24 |
| 8 | Análisis micro-elemental SEM-EDS..... | 25 |
| 9 | Prueba de permanganato para la detección del ion oxalato..... | 26 |

Lista de tablas

| Tabla | | Página |
|-------|--|--------|
| 1 | Análisis de la producción de cristales en cepas de la familia Botryosphaeriaceae..... | 23 |
| 2 | Análisis del porcentaje de unidades de sideróforos producidas por <i>Lasiodiplodia</i> spp..... | 43 |
| 3 | Transcripción de valores obtenidos en los microanálisis de <i>Lasiodiplodia gilanensis</i> (UCD256Ma)..... | 44 |
| 4 | Transcripción de valores obtenidos en los microanálisis de <i>Lasiodiplodia brasiliense</i> (MXBCL28)..... | 45 |
| 5 | Transcripción de valores obtenidos en los microanálisis de la muestra control..... | 46 |

Capítulo 1. Introducción

Las enfermedades de la madera de vid están mundialmente distribuidas en cultivos tanto de uva de mesa como las destinadas a la elaboración de vino y son consideradas como uno de los principales factores que limitan el desarrollo y la productividad de los viñedos. Estas enfermedades son principalmente causadas por hongos ascomicetos y basidiomicetos que infectan las vides a través de heridas, provocando decaimiento como resultado de la colonización vascular y/o la producción de toxinas (Gramaje et al., 2018).

Los hongos de la familia Botryosphaeriaceae son ascomicetos con una distribución cosmopolita, considerados agentes patógenos de enfermedades degenerativas en un amplio rango de plantas leñosas incluyendo la vid (Phillips et al., 2013). Los principales síntomas que causan son: manchas en hojas, pudrición de la fruta, muerte regresiva, necrosis del brote, decoloración vascular y canchales perennes (Úrbez-Torres, 2011).

Dentro de las Botryosphaeriaceae se encuentra el género *Lasiodiplodia*. Las principales características que distinguen a este género de otros estrechamente relacionados son la presencia de paráfisis en picnidios y estriaciones longitudinales en conidias maduras. Hasta ahora se han descrito 20 especies que se diferencian en función de la morfología conidial (Sutton, 1980) y por el análisis de su ADN (Phillips et al., 2013). *Lasiodiplodia theobromae*, especie tipo del género, se ha reportado como agente causal de numerosas enfermedades que afectan árboles frutales, hortalizas y plantas ornamentales alrededor del mundo, incluida la vid, en donde es uno de los patógenos más virulentos (Úrbez-Torres y Gubler, 2009). Este hongo se caracteriza por propagarse rápidamente dentro de la planta (Úrbez-Torres et al., 2008). Además, se ha descrito su capacidad de producir una gran cantidad de metabolitos secundarios, que se cree podrían estar involucrados en la patogénesis (Aldridge et al., 1971; Keller, 2019).

Los hongos son fuente de moléculas bioactivas, denominadas metabolitos secundarios, producidas por taxa fúngicos específicos que pueden tener efectos nocivos o beneficiosos (Nesbitt et al., 1962; Quinn, 2013; Krause et al., 2018). Estos metabolitos secundarios se derivan de las vías metabólicas centrales y las reservas de metabolitos primarios, y son actores cruciales en el desarrollo de hongos y sus interacciones con otros organismos (Keller, 2019).

Uno de los compuestos metabólicos que producen algunos hongos, específicamente descomponedores de madera, para iniciar la despolimerización de la pared celular previo a la acción enzimática, es el ácido oxálico (Machuca et al., 2001; Goodell, 2003). En algunos hongos, este compuesto está involucrado en la supresión de la generación activa de oxígeno, comprometiendo la acción de mecanismos de defensa del hospedero (Cessna et al., 2000).

El ácido oxálico posee tres propiedades principales, es fuente de electrones, fuente de protones y es un importante quelante metálico (Cessna et al., 2000). Debido a sus múltiples características químicas y ecológicas ha recibido bastante atención. Entre sus características, destacan su uso para la biorremediación de distintos contaminantes orgánicos, el daño a cultivos causado por organismos fitopatógenos productores de ácido oxálico y como fuente de electrones para la fijación de nitrógeno en plantas (Maxwell y Bateman, 1968; Magro et al., 1984; Barr y Aust, 1994; Trinchant et al., 1994). Siendo *Lasiodiplodia* un patógeno altamente virulento, es muy probable que produzca ácido oxálico en etapas tempranas de su proceso de infección, por ello, uno de los objetivos de este trabajo fue probar la capacidad de *Lasiodiplodia* spp. de producir ácido oxálico.

Por otra parte, los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular, péptidos no ribosomales, con alto grado de afinidad por el hierro, secretados por bacterias, hongos y plantas en condiciones de deficiencia de hierro en el entorno (Kashinath y Demkowicz, 2011). Actúan como agentes quelantes para secuestrar y transportar hierro insoluble y reducirlo a un estado aprovechable para todos los seres vivos, por ello juegan un papel esencial en el metabolismo de casi todas las formas de vida (Aguado-Santacruz et al., 2012). Hay evidencia previa que indica que los sideróforos actúan como factor de virulencia en hongos. Un ejemplo de ello se encontró al estudiar la interacción planta-patógeno de *Microbotryum violaceum* con *Silene latifolia*, un hongo fitopatógeno cuyas mutantes experimentales deficientes en la capacidad de acumular ácido rodotorúlico, perdieron la patogenicidad comparadas con el tipo silvestre (Ruddat et al., 1991). Estudios previos indican que especies del género *Lasiodiplodia* producen sideróforos, pero su naturaleza química no ha sido elucidada. Por ello, en este trabajo se propuso identificar la producción y la naturaleza química de los sideróforos producidos por cepas de *Lasiodiplodia*.

1.1 Antecedentes

1.1.1 El género *Lasiodiplodia*

Las especies de hongos del género *Lasiodiplodia* se clasifican dentro de los Ascomycetos en el orden de los Botryosphaerales. Este género es uno de los 29 que conforman la familia Botryosphaeriaceae (Liu et al., 2012). Son hongos cosmopolitas encontrados principalmente en los trópicos y subtrópicos, conocidos por provocar numerosas enfermedades que se han encontrado en alrededor de 500 plantas hospederas (Ismail et al., 2012), incluyendo monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas (Picos-Muñoz et al., 2015).

Lasiodiplodia spp. pueden presentar una etapa de crecimiento saprófita o endófito, por lo que se les considera patógenos latentes. Se encuentran como endófitos en tejidos sanos de la planta, pero cuando el hospedero está debilitado o bajo algún tipo de estrés, pueden entrar en una fase de crecimiento patogénico (Rubini et al., 2005; Mohali et al., 2005; Picos-Muñoz et al., 2015). También se les considera hongos patógenos oportunistas en humanos, causando lasiodiplodiasis, keratitis, onicomicosis y úlceras de la córnea y piel (Rebell y Forster, 1976; Maslen et al., 1996; Summerbell et al., 2004; Woo et al., 2008).

La principal característica que distingue al género *Lasiodiplodia* de otros géneros cercanos es la presencia de conidios de forma ovalada, generalmente hialinos y aseptados, pero que con el tiempo se pigmentan y se observa la formación de un septo (Phillips et al., 2013). *Lasiodiplodia theobromae* es la especie tipo del género, y fue descrita por primera vez alrededor de 1890 por Saccardo, afectando frutos de cacao (*Theobromae cacao*) en Ecuador (Crous y Palm, 1999). Anteriormente la mayoría de las cepas reportadas de *Lasiodiplodia* estaban agrupadas dentro de *L. theobromae*. Sin embargo, recientemente se ha descrito como una especie críptica, y a partir de la secuenciación de las regiones espaciadoras transcritas del rDNA (ITS) y el factor de elongación 1 alfa (EF-1) se han descrito alrededor de 35 especies dentro de este género (Dissanayake et al., 2016; Mehl et al., 2017; de Silva et al., 2019).

En diferentes partes del mundo se ha reportado que *L. theobromae* es el agente causal de numerosas enfermedades que prosperan en climas tropicales y que pueden afectar árboles frutales, hortalizas y plantas ornamentales con alto interés económico tales como: mango (Johnson et al., 1992), aguacate (Pegg et al., 2002), papaya (Netto et al., 2014), plátano (Alves et al., 2008), litchi (Liu et al., 2003), vid (van Niekerk et al., 2004), cítricos y duraznos (Damm et al., 2007), entre otros.

En México, *L. theobromae* se describió por primera vez en 1976, y desde entonces se ha asociado con la muerte regresiva y pudrición de frutos en cultivos de interés como el durazno (Picos-Muñoz et al., 2015), mango (Becerra, 1995), vid (Úrbez-Torres et al., 2008), papaya (*Carica papaya*) (Mosqueda et al., 1996; Rojo, 2013), rambután (Picos-Muñoz et al., 2015), caña de azúcar (Picos-Muñoz et al., 2015), aguacate (Ochoa-Ascencio et al., 2007) y cítricos (Alvidrez-Villareal et al., 2012; Varela et al., 2013).

1.1.2 Metabolitos secundarios

Los hongos pueden ser fuente tanto de compuestos beneficiosos como de compuestos dañinos para el ser humano. Los metabolitos secundarios son moléculas bioactivas, producidas naturalmente por plantas, bacterias y distintos taxa fúngicos, principalmente Ascomycetos y Basidiomycetos. Estos metabolitos derivan de rutas metabólicas centrales y reservorios metabólicos primarios (Keller, 2019).

La síntesis de metabolitos secundarios ocurre a través de varias rutas metabólicas. Entre éstas, la ruta mediada por las sintasas de policétidos, cuya función básica consiste en la condensación de moléculas de acetil-CoA o malonil-CoA, derivados de la glucólisis y la modificación del piruvato en la mitocondria. El otro tipo de metabolitos secundarios son los péptidos no-ribosomales, los cuales se sintetizan a partir de ciertos aminoácidos; su síntesis no requiere de ARN mensajero, sino de módulos enzimáticos que se encargan de unir aminoácidos (Walsh et al., 2013).

Distintas especies de *Lasiodiplodia*, producen metabolitos en diferentes condiciones ambientales, que se cree están involucrados con la capacidad del hongo para colonizar distintos hospederos, y por ende en el establecimiento de la enfermedad (Félix et al., 2018). Estudios previos reconocen a *Lasiodiplodia* spp. como excelente productor de ácido jasmónico, cuya obtención involucra la síntesis de distintos metabolitos con actividad biológica como lasiodiplodina, meleína y ácido indol acético, entre otros (Aldridge, 1971; Pandi et al., 2011; Shen et al., 2014).

1.1.3 Producción de sideróforos

Los sideróforos (del griego *sideros phoros* “portadores o acarreadores de hierro”), son pequeñas moléculas de bajo peso molecular (300-2,000 Da) con alta afinidad por el hierro (Dybas et al., 1995; Neilands, 1995).

Son sintetizados y secretados por diferentes microorganismos como bacterias y hongos, así como por algunas plantas (fitosideróforos), en condiciones deficientes de hierro (Drechsel y Jung, 1998; Ratledge y Dover, 2000). Su principal función es la quelación y transporte de hierro insoluble al interior de la célula donde es reducido a Fe^{2+} (Neilands, 1995).

El hierro es uno de los elementos más importantes para los seres vivos, juega un papel muy importante en los procesos metabólicos esenciales como: la síntesis y reparación de ácidos nucleicos, respiración, transporte fotosintético, reducción de nitratos, fijación de nitrógeno y desintoxicación de radicales libres (Liu et al., 2007; Narrillos-Rodríguez, 2014). Además, el hierro es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre (Cornell y Schwertmann, 2003), pero su biodisponibilidad se ve limitada por su baja solubilidad.

Los sideróforos se encargan de quelar los iones Fe^{3+} dando lugar a complejos metálicos denominados ferrisideróforos, los cuales son transportados mediante un sistema de transporte activo de alta afinidad dependiente del ATP, a través de proteínas y receptores de membrana específicos (Narrillos-Rodríguez, 2014). Una vez en el interior de la célula, el hierro es liberado del complejo con el sideróforo mediante un proceso redox, mediado por ferri-reductasas citoplasmáticas que intervienen en la formación del complejo Fe^{+2} -sideróforo a partir de la reducción del complejo Fe^{+3} -sideróforo. Dado que la afinidad del sideróforo hacia el Fe^{2+} es mucho menor que hacia el Fe^{3+} , la disociación se ve facilitada, lográndose introducir el metal en el interior del organismo (Ratledge y Dover, 2000; Narrillos-Rodríguez, 2014).

El hierro liberado es incorporado a proteínas o almacenado intracelularmente. Algunos sideróforos tras este proceso pueden ser secretados otra vez al medio para capturar una nueva molécula de hierro (Narrillos-Rodríguez, 2014).

1.1.3.1 Características estructurales de los sideróforos

Las principales características estructurales que determinan la selectividad de un sideróforo por el ion férrico son: el tipo, número de átomos en un solo ligando que se unen al metal (denticidad) y distribución espacial de los grupos de unión a metal (Boukhalfa y Crumbliss, 2002). A pesar de los más de 500 sideróforos identificados hasta la fecha, la diversidad de los grupos funcionales que coordinan el ion férrico es escasa. La mayoría de sideróforos se pueden agrupar en hidroxamatos, catecolatos, ácidos α -

hidroxicarboxílicos y sideróforos mixtos. Los hidroxamatos son sideróforos que se caracterizan por utilizar un grupo hidroxamato para unirse al hierro; se pueden clasificar en ferricromos, ferrioxaminas, coprogenos y fusarininas. Dentro de este grupo el sideróforo más representativo es la aerobactina (Narrillos-Rodríguez, 2014). Por otro lado, en los catecolatos el centro de unión deriva del corismato y se pueden clasificar en catecoles *sensu stricto*, formados por ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA) o fenolatos, compuestos por ácido salicílico (Crosa y Walsh, 2002). Finalmente, los ácidos α -hidroxicarboxílicos son sideróforos con un grupo similar al de un hidroxamato, en el que se sustituye uno de los radicales por un doble enlace con oxígeno y un nitrógeno del esqueleto por un carbono (Narrillos-Rodríguez, 2014).

1.1.3.2 Efectos y aplicaciones de los sideróforos

Los sideróforos son ampliamente aplicados en diversos campos, por ejemplo, en la agricultura, donde la inoculación del suelo con microorganismos productores de sideróforos aumenta el crecimiento y el rendimiento de varias plantas (Kloepper et al., 1980). Los sideróforos de tipo hidroxamato están presentes en varios suelos, cumpliendo la función de reducir la acumulación de metales pesados, que resulta tóxica para la mayoría de las plantas y contamina el suelo, derivando en la disminución de la actividad microbiana y por ende la fertilidad del suelo (Powell et al., 1980; McGrath et al., 1995).

Los sideróforos se han reportado también como inhibidores del crecimiento de diversos hongos fitopatógenos, como *Phytophthora parasitica* (Seuk et al., 1988), *Phythium ultimum* (Hamdan et al., 1991), *Fusarium oxysporum* *vari* *dianthi* (Buysens et al., 1996) y *Sclerotinia sclerotiorum* (McLoughlin et al., 1992). La capacidad de un microorganismo de usar sideróforos le confiere una ventaja competitiva sobre otros organismos, pues le permite obtener el hierro disponible, mejorando su crecimiento, al mismo tiempo que limita la disponibilidad de hierro a otros microorganismos presentes en el ambiente.

Algunas especies no patógenas de *Fusarium* producen sideróforos más eficaces y en mayor cantidad que las especies patógenas, lo que les permite inhibir el crecimiento de otros hongos (Lemanceau et al., 1986). *Aspergillus ochraceous* produce distintos tipos de sideróforos, algunos de los cuales restringen el crecimiento de organismos competidores por la inhibición activa del transporte de sus sideróforos (Jalal et al., 1984).

El transporte de hierro mediado por sideróforos también influye en la patogenicidad de los microorganismos. Los patógenos microbianos deben adquirir hierro para sobrevivir en su hospedero (Weinberg, 1999a) y uno de los mecanismos de defensa utilizados por la planta hospedante, es restringir su disponibilidad (Weinberg, 1999b). Hay evidencia de que los sideróforos actúan como factores de virulencia. Por ejemplo, las cepas mutantes del hongo fitopatógeno, *Microbotryum violaceum*, deficientes en la producción de ácido rodotorúlico, un tipo de sideróforo, muestran una importante reducción o ausencia de patogenicidad comparadas con el hongo silvestre (Ruddat et al., 1991).

1.1.4 Ácido Oxálico

El ácido oxálico es otro agente quelante ampliamente estudiado debido a su capacidad para disolver diferentes minerales. Algunos hongos fitopatógenos y descomponedores de madera secretan ácido oxálico, lo que sugiere que está involucrado en la degradación no enzimática de la pared celular del hospedero, por la producción de radicales libres en etapas tempranas de la degradación de celulosa y lignina (Machuca et al., 2001; Goodell, 2003). Por ejemplo, en *Sclerotinia* spp., la principal función del oxalato en la patogénesis es la supresión de la generación de especies reactivas de oxígeno, comprometiendo la defensa del hospedero. Por otra parte, la sobresecreción de oxalato en *Beauveria basiana*, probablemente facilita la penetración del patógeno en la cutícula del insecto hospedero (Wagner y Lewis, 2000; Fomina et al., 2005).

Por otro lado, el oxalato tiene un impacto en la competencia entre especies de hongos, afectando el equilibrio ecológico en la microflora del suelo y la relación planta-patógeno, además mejora la disponibilidad de nutrientes por la vegetación asociada (Dutton y Evans, 1996).

1.1.4.1 Síntesis del Ácido Oxálico

La síntesis de ácido oxálico está ampliamente descrita en hongos y se han propuesto varias vías para su biosíntesis (Foster, 1949). Las vías más probables implican el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) o el ciclo del glioxilato en la biosíntesis de oxalato (Cleland y Johnson, 1956; Jakoby y Bhat, 1958; Hodgkinson, 1977),

que involucra la escisión hidrolítica del oxaloacetato a oxalato y acetato (Nord y Vitucci, 1947), o la oxidación del glioxilato a oxalato (Maxwell y Bateman, 1968; Müller y Frosch, 1975; Müller, 1986).

1.1.4.2 Funciones del Ácido Oxálico en la patogénesis

Los patógenos de plantas pueden generar y segregar en su entorno concentraciones milimolares de oxalato (Cessna et al., 2000; Rollins y Dickman, 2001), y esta producción durante la infección de la planta se ha implicado como un determinante principal de la patogenicidad. Las evidencias de la participación del ácido oxálico en la patogénesis, se basan en su recuperación del hospedero y en la reproducción de los síntomas de la enfermedad al inyectarlo en plantas sanas (Dutton y Evans, 1996). Al principio de la patogénesis, el ácido oxálico se acumula en los tejidos infectados, aumentando su concentración a medida que el patógeno coloniza el tejido del hospedero; al mismo tiempo que disminuye el pH a 4.5 (McCarroll y Thor 1978; Noyes y Hancock 1981). Dado que el pH óptimo de las enzimas extracelulares producidas por hongos fitopatógenos generalmente está por debajo del pH 5.0, esta disminución favorece su actividad (Bateman y Beer, 1965; Magro et al., 1984; Maxwell y Lumsden, 1970).

1.2 Justificación

El género *Lasiodiplodia* es uno de los agentes causales de enfermedades de la madera en un gran número de plantas hospederas. Los hongos pertenecientes a este género tienen la capacidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios con distintas actividades biológicas. No obstante, la relación entre la síntesis de éstos con los mecanismos de patogenicidad del hongo ha sido poco estudiada. Se sabe que *Lasiodiplodia* spp. producen sideróforos, pero falta conocer el tipo y estructura química de éstos para continuar con el estudio de su papel en la patogénesis. Por otro lado, el ácido oxálico ha sido reportado como un factor de virulencia en distintos hongos fitopatógenos, pero su síntesis en el género *Lasiodiplodia* no ha sido estudiada. Además, estos metabolitos resultan de interés biotecnológico, entre otras cosas, por su potencial para el control biológico de microorganismos fitopatógenos.

1.3. Hipótesis

Lasiodiplodia spp. produce ácido oxálico y más de un tipo de sideróforo.

1.4. Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Caracterizar los metabolitos secundarios, sideróforos y ácido oxálico, producidos por *Lasiodiplodia* spp.

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la producción de sideróforos en *Lasiodiplodia* spp. en ensayos *in vitro*.
- Identificar el tipo de sideróforo(s) producido por *Lasiodiplodia* sp. usando técnicas bioquímicas.
- Evaluar la producción de ácido oxálico en *Lasiodiplodia* spp. mediante técnicas de microscopía.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento

Para la realización de este trabajo, se seleccionaron dos cepas del género *Lasiodiplodia*. *Lasiodiplodia brasiliense* MXBCL28 aislada del cancro de una planta de vid del Valle de Guadalupe, Ensenada, Baja California, previamente aislada e identificada molecularmente en el laboratorio de fitopatología de CICESE (Paolinelli-Alfonso et al., 2016), y *L. gilanensis* UCD256Ma, aislada de una planta de vid de Madera County en California con presencia de cancos (Úrbez-Torres et al., 2006) y donada al laboratorio por el Dr. Douglas Gubler de la Universidad de California, Davis. Ambas cepas fueron recuperadas de resguardos de glicerol al 20% a 4°C. Una vez recuperadas, las cepas se mantuvieron para su uso rutinario en medio agar papa dextrosa (PDA) a 30±2°C.

Ambas cepas se caracterizan por la presencia de micelio aéreo de apariencia algodonosa, colonias inicialmente blancas tornándose grisáceas y crecimiento acelerado comparado con otras especies fúngicas. Específicamente, las colonias de *L. brasiliense* se caracterizan por la presencia de micelio aéreo denso color gris claro que se va intensificando en la zona cercana al punto de inoculación (Figura 1). Las colonias de *L. gilanensis* tienen aspecto algodonoso con abundante micelio aéreo que se vuelve gris humo después de exponerse a la luz o de una incubación larga (Figura 1).

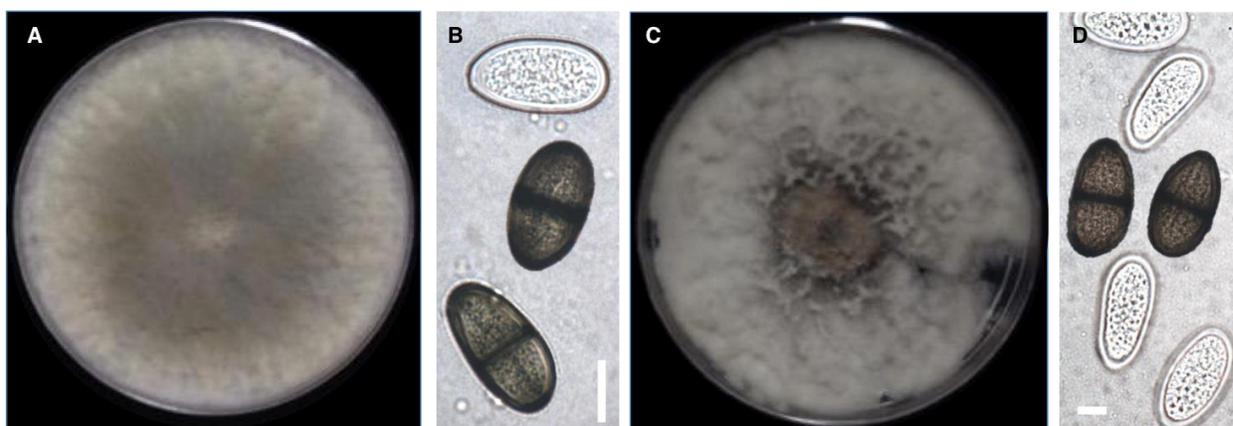


Figura 1. Características macro y microscópicas de *Lasiodiplodia brasiliense* MXBCL28 (A y B) y *Lasiodiplodia gilanensis* UCD256Ma (C y D). A y C, morfología de la colonia en agar PDA; B y D, morfología de esporas en diferentes estados de maduración, esporas hialinas aseptada y esporas pigmentadas septadas (100X). Barra de escala 10 μ m.

Para los ensayos de producción de ácido oxálico en la familia Botryosphaeriaceae se analizaron distintas especies de la familia (Tabla 1).

2.2 Sideróforos

2.2.1. Evaluación de la producción de sideróforos

La capacidad de producir sideróforos se evaluó mediante el ensayo Universal CAS (cromo azurol s) en medio sólido (Schwyn y Neilands, 1987). Este método, es el más utilizado para la detección de sideróforos debido al complejo ferricromogénico que cambia de color como consecuencia de la pérdida de hierro.

Todo el material utilizado para la preparación de medios de cultivo y soluciones fue lavado con potasa alcohólica (0.5 N) para eliminar residuos orgánicos y evitar contaminaciones. El medio CAS-agar se preparó partiendo de las soluciones A y B. La solución A se preparó añadiendo 60.5 mg de cromo azurol s (CAS; Sigma-Aldrich 199532), 10 mL de una solución férrica de HCl 10 mM con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM y 72.9 mg de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA; Sigma-Aldrich H6269) disueltos en un volumen final de 100 mL de agua destilada. El CAS se disolvió en aproximadamente 40 mL de agua destilada para posteriormente agregar la solución férrica con lo que se observó un viraje de anaranjado rojizo a rojo oscuro, después se adicionó el H.D.T.M.A. obteniendo una solución púrpura. Finalmente, la solución se aforó a un volumen final de 100 mL con agua destilada. Por separado, como solución B, se preparó el medio mínimo 9 (MM9) sólido (10 g/L de glucosa, 0.5 g/L de NaCl, 0.3 g/L de K_2PO_4 , 0.1 g/L de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$, 5.0 g/L de Soytona, 30 g/L de MES) se ajustó el pH del medio a 6.8 y se agregaron 15 g/L de agar para aforarse a 900 mL con agua destilada.

Ambas soluciones fueron esterilizadas por separado a 120°C y 15 lb de presión durante 15 minutos. Una vez estériles las soluciones A y B se dejaron enfriar hasta aproximadamente los 40°C y se mezclaron los 100 mL de la solución CAS con los 900 mL de MM9 para obtener 1L de CAS-agar, adquiriendo la característica coloración azul del medio.

El medio se vació en cajas Petri, una vez solidificado se inoculó en el centro un disco micelial de 5 mm de diámetro de un cultivo de 3 días de crecimiento de cada una de las cepas. Los cultivos se mantuvieron en observación de 3 a 5 días incubados a 30°C. La producción de sideróforos se consideró positiva al observar un viraje de azul a amarillo, anaranjado o púrpura dependiendo del tipo de sideróforo presente (Pérez-Miranda et al., 2007). Como controles se usaron cajas con medio CAS-agar sólido sin inocular. Los ensayos se realizaron por triplicado.

2.2.2. Cuantificación de unidades de sideróforos

Nuevamente, todo el material utilizado para la preparación de medios de cultivo y soluciones se lavó con potasa alcohólica (0.5N) para eliminar residuos orgánicos y evitar contaminaciones.

Para cuantificar las unidades de sideróforos producidas, se utilizó como medio de cultivo el MM9 líquido (10 g/L glucosa 1%, 5 g/L de acetato de amonio, 1.5 g/L de KH_2PO_4 , 2.5 g/L de NaCl) ajustado a pH 5.8. Se transfirieron 100 mL de medio a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, los cuales fueron esterilizados a 120°C y 15 lb de presión durante 15 minutos. Una vez fríos, cada matraz se inoculó con tres discos miceliares de 5 mm de diámetro de un cultivo de 3 días de alguna de las cepas. Cada una se inoculó por triplicado. Como control se usaron matraces con medio MM9 sin inocular. Los matraces se incubaron a $30\pm 2^\circ\text{C}$ en agitación a 100 rpm durante 15 días, recuperando alícuotas de 1 ml de sobrenadante cada tercer día durante 15 días. Al final, los cultivos se filtraron y el sobrenadante libre de células se utilizó para los ensayos de identificación y cuantificación de unidades de sideróforos producidos.

La cuantificación de los sideróforos se realizó mediante el ensayo CAS líquido (Schwyn y Neilands, 1987). Para esto, se preparó la solución Fe-CAS con 7.5 mL de CAS 2 mM, 1.5 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, 21.9 mg de HDTMA y 9.76 g de MES en 100 mL y se ajustó el pH a 5.6. Se tomaron 100 μL de sobrenadante libre de células, y se les agregó 100 μL de la solución CAS-Fe en una microplaca de 96 pozos. Para cada cepa se hicieron dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de cada replica biológica. El medio MM9 sin inocular fue utilizado como control. La absorbancia de las muestras se midió en un lector de placas Multiskan sky a 630 nm. Finalmente, las unidades de sideróforos producidos por cada cepa se determinaron de acuerdo a la ecuación propuesta por Sayyed y colaboradores (2005):

$$\% \text{ unidades de sideróforos} = \left\{ \frac{[Ar-As]}{Ar} \right\} \times 100 \quad (1)$$

Dónde:

Ar: Absorbancia de referencia (blanco)

As: Absorbancia de la muestra

2.2.3 Análisis estadístico

Para determinar diferencias significativas en la producción de sideróforos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$) utilizando el paquete STATISTICA 8.0.

2.2.4 Extracción de sideróforos

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó la cepa *L. brasiliense* MXBCL28 para continuar con la extracción selectiva de los distintos tipos de sideróforos producidos y recuperados en el sobrenadante filtrado.

2.2.4.1 Hidroxamatos

Un volumen de 500 mL de sobrenadante de medio MM9 inoculado con *L. brasiliense* (MXBCL28) se transfirió a un embudo de separación y se le realizaron seis extracciones con 25 mL de alcohol bencílico para formar un total de 150 mL de fase orgánica (FO), la cual fue lavada con 50 mL de una solución saturada de sulfato de amonio (fase acuosa) y secada con sal anhidra.

Una vez seca la fase orgánica, se adicionaron 1.5 L de cloruro de metileno y enseguida se realizaron 10 extracciones con 50 mL de agua destilada cada una. Esta nueva fase acuosa fue lavada con 100 mL de cloruro de metileno, los cuales fueron separados y descartados. Finalmente, el extracto acuoso fue evaporado a presión reducida en un rotaevaporador, para permitir la obtención del extracto de sideróforos de tipo hidroxamato.

La presencia de moléculas tipo sideróforo se evaluó por medio de cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), empleando sílica gel como fase estacionaria y de *n*-butanol/agua/ácido acético en proporción 60:15:25 como fase eluyente. Finalmente, la CCF se visualizó con luz ultravioleta y posteriormente fue revelada con una solución de FeCl_3 3%.

2.2.4.2 Catecolatos

Para la extracción de sideróforos del tipo catecolatos, se analizó un volumen de 250 mL de sobrenadante de medio MM9 que se acidificó con una solución de HCl 6 M hasta pH de 2-3, para disminuir la afinidad de los catecolatos hacia el hierro. Enseguida se transfirió a un embudo de separación y se realizaron tres extracciones con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua destilada, se secó con sal anhidra y se concentró a presión reducida para la obtención del extracto.

Se realizó un monitoreo de la presencia de moléculas tipo sideróforo por medio de CCF, empleando sílica gel como fase estacionaria y diclorometano/metanol en distintas proporciones como fase eluyente. Finalmente, la CCF se visualizó con luz ultravioleta y posteriormente fue revelada con una solución de FeCl₃ 3%.

2.2.5. Bioensayo en hojas de vid

Los extractos orgánicos crudos, así como los parcialmente purificados de las moléculas de tipo catecolato e hidroxamato producidos por *L. brasiliense* MXBCL28, se evaluaron en hojas de vid como posibles factores de virulencia del hongo. Para ello, se tomaron muestras de tejido foliar de aspecto saludable de vid cv. Merlot, y se cortaron fragmentos circulares de 5 mm de diámetro con ayuda de un sacabocados estéril. Los fragmentos obtenidos se sumergieron en 150 µL de cada una de las soluciones a evaluar, las cuales fueron el sobrenadante filtrado libre de células, y 0.05 g/mL de los extractos parcialmente purificados de naturaleza catecolato e hidroxamato resuspendidos en H₂O destilada estéril. Para el tratamiento control se utilizó H₂O destilada estéril. Cada fragmento foliar se colocó en un pocillo en una placa de 96 pozos con fondo blanco para favorecer el contraste. El aspecto del tejido foliar se evaluó después de 24 horas de incubación a temperatura ambiente.

2.3 Producción de cristales de Oxalato de Calcio

Para evaluar la producción de cristales de oxalato de calcio en las cepas, *L. brasiliense* MXBCL28 y *L. gilanensis* UCD256Ma, se utilizó el medio Agar Extracto de Malta (MEA). Este es un medio de cultivo

complejo, debido a la cantidad variable de calcio procedente del grano de cebada que puede contener (Guggiari et al., 2011).

El medio MEA se preparó utilizando 33.9 g de medio de cultivo MEA comercial (Conda, cat. 1038.00) por litro. Para inducir la producción de cristales de oxalato de calcio, se adicionaron 5 g/L de CaCO_3 (MEA+ CaCO_3). Una vez preparado el medio fue esterilizado a 120°C y 15 lb de presión durante 15 minutos. El medio se vació en cajas Petri de 6 cm de diámetro. Una vez solidificado, se colocó una membrana de celofán estéril sobre el medio, para remover la mayor parte del tejido fúngico previo al análisis microscópico y favorecer la observación de los cristales producidos. Las cajas se inocularon con un disco micelial de 5 mm de diámetro de alguna de las cepas, *L. brasiliense* MXBCL28 o *L. gilanensis* UCD256Ma. Los cultivos se incubaron a 30°C durante 3 días, con fotoperiodos de 12 hrs de luz por 12 hrs de oscuridad y en observación constante. Como control se usaron cajas con medio MEA. El ensayo se realizó por triplicado.

2.3.1 Microscopía de campo claro/DIC

La evaluación preliminar de la presencia de cristales de CaC_2O_4 en los cultivos fúngicos de 3 días de incubación se realizó mediante microscopía óptica. Se tomó un trozo de agar de distintas zonas del cultivo, de aproximadamente 0.5 cm² cada uno y se observó en un microscopio óptico invertido Zeiss Axiovert 200 empleando la técnica de bloque de agar invertido (Hickey et al., 2004). Las imágenes fueron capturadas con una cámara AxioCam 200 y se analizaron con el software Zeiss AxioVision SE64, Rel. 4.9.1.

Adicionalmente se realizó el análisis de la producción de cristales de oxalato de calcio en varias cepas de la familia Botryosphaeriaceae (Tabla 1) siguiendo el mismo protocolo.

2.3.2 Recuperación de cristales para evaluación microscópica

Una vez transcurridos tres días de incubación, se retiró la membrana de celofán sobre la cual se inoculó el hongo. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se recuperaron los cristales formados tomando pequeños trozos de agar inoculado con el hongo. Se les agregó etanol (70%) para favorecer la precipitación de los

cristales y se recuperaron por pipeteo. Para eliminar el recubrimiento de agar que persistía en la superficie, los cristales se lavaron con agua destilada caliente cinco veces, removiendo el líquido con una micropipeta.

2.3.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para analizar a detalle la superficie y la geometría de los cristales producidos, se tomaron 3 μL de los cristales suspendidos en agua y se montaron en un botón de aluminio portamuestras para microscopía electrónica de barrido (SEM) de 10 mm de diámetro. Como controles se usaron CaCO_3 y CaC_2O_4 . En cada botón se colocó una muestra de cristales de oxalato biogénicos, CaCO_3 y CaC_2O_4 . Una vez montadas las muestras, los botones se resguardaron en un horno a 65°C para favorecer la evaporación del agua y proteger las muestras hasta su observación por microscopía electrónica de barrido (SEM). Finalmente, se observaron con un microscopio electrónico de barrido (SEM Hitachi SU-3500) en condiciones de bajo vacío, con la finalidad de preservar las características superficiales de las muestras.

Para conocer la composición química de los cristales observados (Do Rio et al., 2008), se realizaron ensayos micro-elementales con el microscopio electrónico de barrido acoplado a un detector EDS (ZEISS-EVO® MA 15 Analytical SEM).

2.3.4 Identificación del ion oxalato mediante prueba de permanganato

La identificación del ion oxalato se realizó mediante la reacción con permanganato de potasio (KMnO_4), siguiendo la metodología propuesta por Kalbus y colaboradores (2004). La reacción es colorimétrica, puesto que la solución inicial del permanganato es color rosa intenso, mientras que la forma que adopta al reducirse (Mn^{2+}) en presencia del ion oxalato es incolora. La reacción redox se basa en la reducción del ion permanganato en medio ácido según la reacción global:



Para realizar la prueba, en un tubo de ensayo de fondo redondo de 75 x 10 mm, se adicionaron 100 μL de una solución de cristales de oxalato obtenidos de las cepas *L. brasiliense* MXBCL28 y *L. gilanensis* UCD256Ma como se describió arriba. Como control positivo se usaron tubos conteniendo una solución

de oxalato de calcio (8 g/L), y como controles negativos H₂O estéril y una solución de carbonato de calcio (8 g/L) añadidos en exceso al medio MEA. A todos los tubos se agregaron 200 µL de una solución de permanganato de potasio 0.4 mM. Para completar la reacción se agregaron 2 gotas de una solución de ácido sulfúrico 1.5 M. El cambio de color de rosa intenso a incoloro indicó la presencia de oxalato de calcio.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Producción de sideróforos

3.1.1 Análisis cualitativo de la producción de sideróforos

La producción de sideróforos en medio CAS en las cepas *L. brasiliense* MXBCL28 y *L. gilanensis* UCD256Ma se observó a los tres días de incubación. El cambio de coloración en el medio CAS a anaranjado indica la producción de sideróforos alcalinos, mientras la formación de un halo rojizo-morado indica la naturaleza ácida de los sideróforos que se están secretando al medio. Considerando lo propuesto por Pérez-Miranda y colaboradores (2007), en *L. brasiliense* MXBCL28 se infirió la producción de moléculas de sideróforos de tipo catecolato e hidroxamato (Figura 2a). Mientras en *L. gilanensis* UCD256Ma se observó el viraje a anaranjado indicando la producción únicamente de hidroxamatos (Figura 2b).

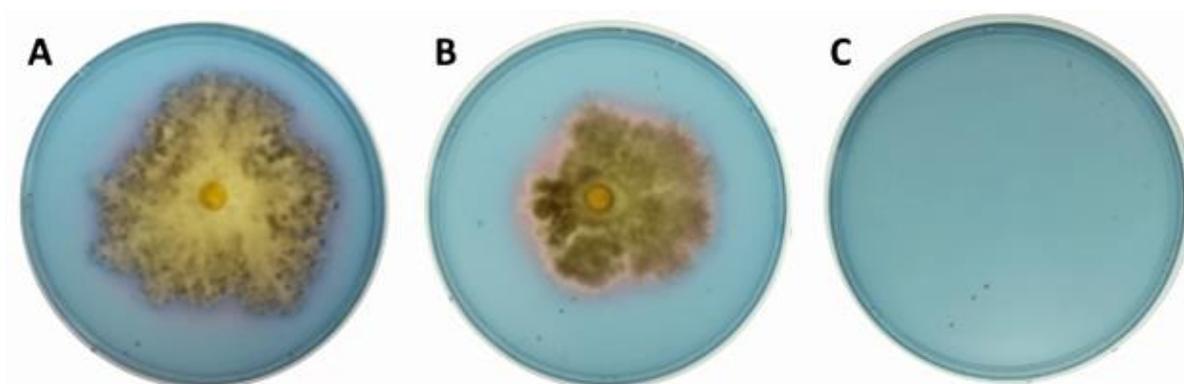


Figura 2. Evaluación de producción de sideróforos en cepas de *Lasiodiplodia* en medio CAS después de tres días de incubación. A, *Lasiodiplodia brasiliense* MXBCL28; B, *Lasiodiplodia gilanensis* UCD256Ma; C, medio sin inocular como control. La presencia de un halo de color amarillo en carboxilatos, naranja-rojizo para hidroxamatos, o morado para catecolatos, alrededor de la colonia indica la secreción de sideróforos al medio. En *L. brasiliense* MXBCL28 se infirió la producción de moléculas de sideróforos de tipo catecolato e hidroxamato; mientras en *L. gilanensis* UCD256Ma únicamente de hidroxamatos.

3.1.2. Cuantificación de sideróforos

El porcentaje de unidades de sideróforos en la cepa *L. gilanensis* UCD256Ma fue mayor que el de *L. brasiliense* MXBCL28 al día 3, pero posteriormente solo tuvo un incremento discreto con un máximo de $32.82 \pm 3.92\%$ unidades de sideróforos al día 15 de incubación. En la cepa *L. brasiliense* MXBCL28, las unidades de sideróforos incrementaron con el tiempo, alcanzando la mayor producción de sideróforos en el día 15 con $46.43 \pm 3.76\%$ (Figura 3; Anexo A). Los resultados del análisis estadístico (ANOVA), indicaron

diferencias significativas en el porcentaje de unidades de sideróforos producidas por ambas cepas durante los últimos días del ensayo (Figura 3). Por lo tanto, se consideró el día 15 como el óptimo para la producción de sideróforos y se seleccionó la cepa *Lasiodiplodia brasiliense* MXBCL28 para la posterior caracterización.

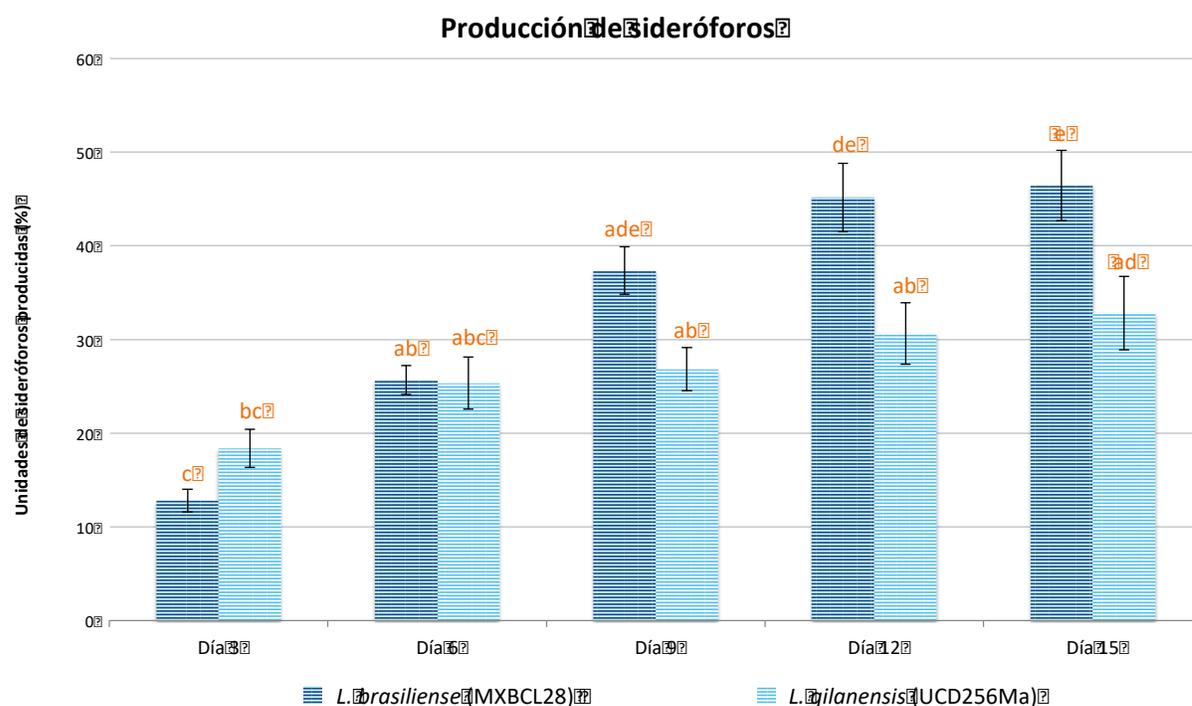


Figura 3. Cuantificación de unidades de sideróforos producidas por cepas de *Lasiodiplodia* spp. Barras indican el error estándar. Barras acompañadas con letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

3.1.3 Extracción de sideróforos

En el proceso de extracción de sideróforos realizado con sobrenadante de la cepa *Lasiodiplodia brasiliense* MXBCL28, se obtuvieron 186.4 mg de extracto seco de moléculas de tipo catecolato a partir de 250 mL de medio de cultivo. Para el extracto de hidroxamatos se obtuvieron 263.1 mg. El análisis por cromatografía de capa fina (CCF), una vez revelada con la solución de FeCl_3 , mostró zonas oscuras (Figura 4), indicando la presencia de moléculas de tipo sideróforo.

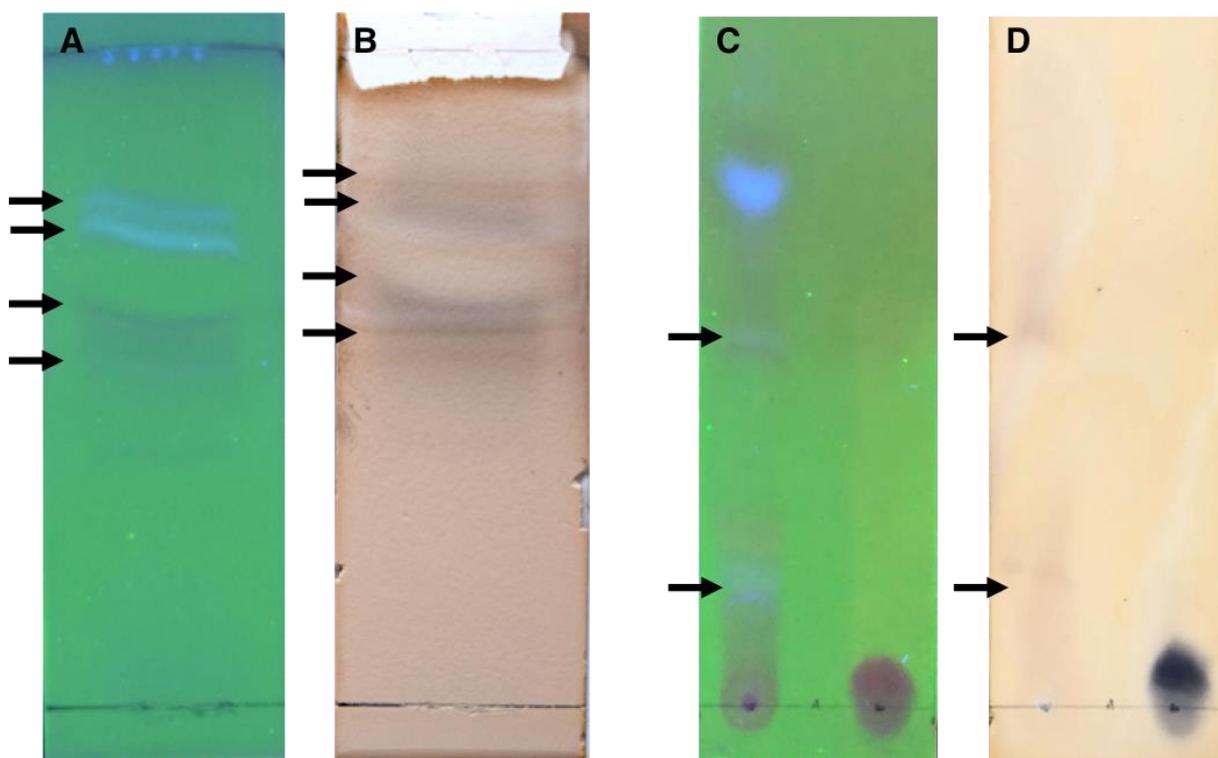


Figura 4. Separación de compuestos tipo sideróforos producidos por *Lasiodiplodia brasiliense* MXBCL28 por cromatografía de capa fina (CCF). A-B, evaluación de extractos de tipo hidroxamato. A, placa revelada con luz UV. B, placa con revelador químico, FeCl₃. C-D, evaluación de extractos de tipo catecolato comparado con ácido gálico como molécula de tipo catecol (derecha). C, placa revelada con luz UV. D, placa con revelador químico, FeCl₃. Las flechas negras señalan las fracciones coloreadas al contacto con el revelador químico.

3.1.4 Bioensayo en hojas de vid

Al evaluar el efecto de los extractos orgánicos crudos, así como los parcialmente purificados, de las moléculas de tipo catecolato e hidroxamato producidos por *L. brasiliense* MXBCL28, en hojas de vid, después de 24 horas de iniciado el ensayo, en el tratamiento control no se observó daño del tejido foliar. En los discos de hojas inoculadas con el extracto de naturaleza hidroxamato se observó una ligera necrosis en las nervaduras. En los discos inoculados con el extracto de naturaleza catecolatos se observaron lesiones necróticas, que tornaron obscuro el tejido. Con el sobrenadante filtrado, solo se observaron pequeñas lesiones en el centro del disco de hoja (Figura 5).

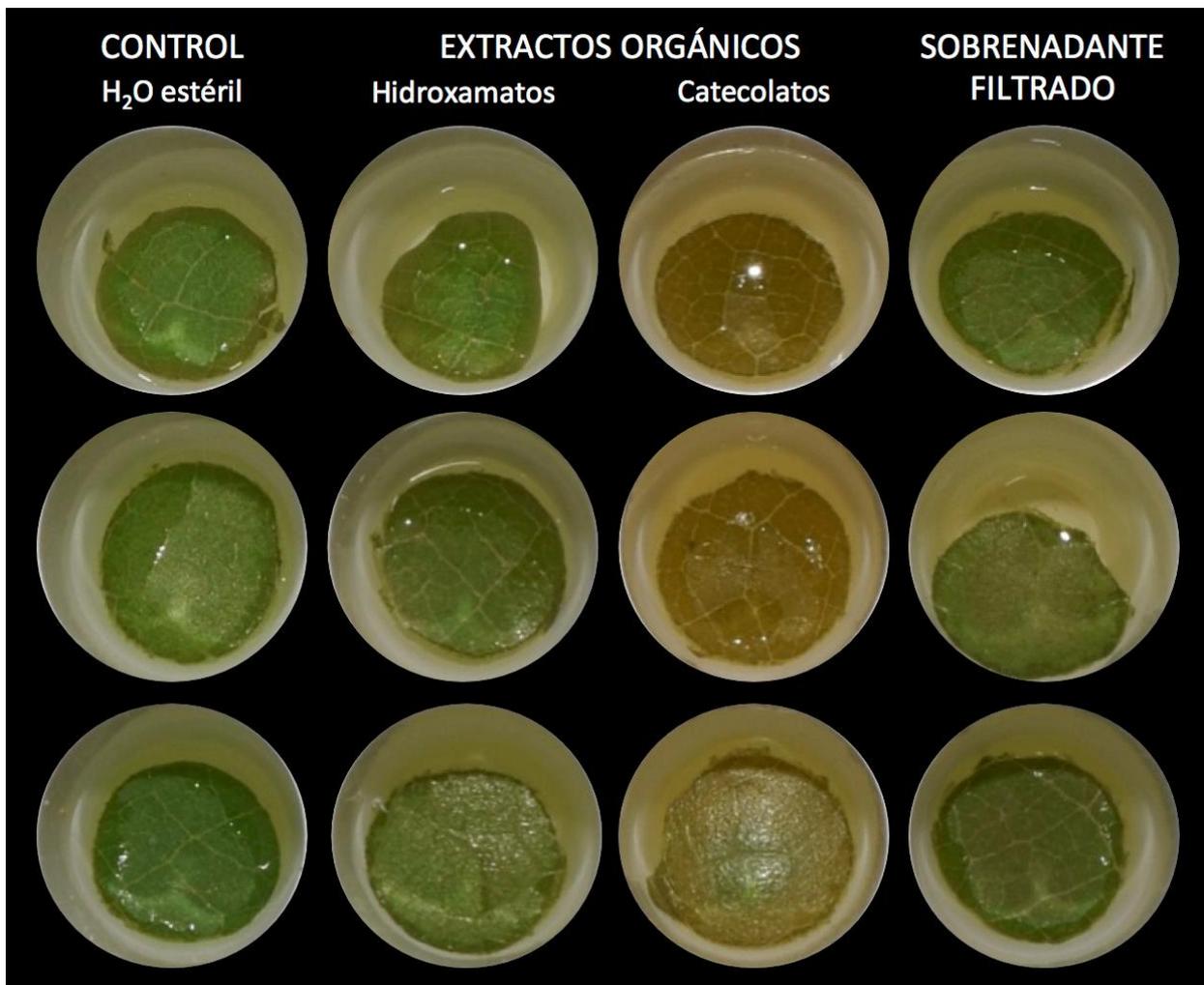


Figura 5. Evaluación de la toxicidad de extractos orgánicos de tipo sideróforo producidos por *Lasiodiplodia brasiliense* MXBCL28 en tejido foliar de vid variedad Merlot. No se observaron síntomas en el tratamiento control después de 24 hrs en contacto con el H₂O estéril. En el extracto orgánico de naturaleza hidroxamato se observó una ligera necrosis en las nervaduras. En los discos de hojas con el extracto de naturaleza catecolato se observaron síntomas de necrosis en el tejido tratado. Aunque en menor medida en las hojas suspendidas en el sobrenadante filtrado también se observaron síntomas de necrosis.

3.2 Producción de cristales de Oxalato de Calcio

Las cepas *L. brasiliense* MXBCL28 y *L. gilanensis* UCD256Ma produjeron cristales de oxalato de calcio putativos al suplementar el agar extracto de malta (MEA) con carbonato de calcio (CaCO₃).

Usando microscopía óptica, se observaron cristales mayormente cúbicos, de distintos volúmenes presentes en los fragmentos de agar. Los cristales más pequeños se agrupan con algunos más grandes, favoreciendo su observación (Figura 6).

En todas las cepas de la familia Botryosphaeriaceae analizadas, se observó la producción de cristales de oxalato de calcio, evidenciando que la formación de cristales a partir de carbonato de calcio es una característica conservada entre las especies de esta familia (Tabla 1).

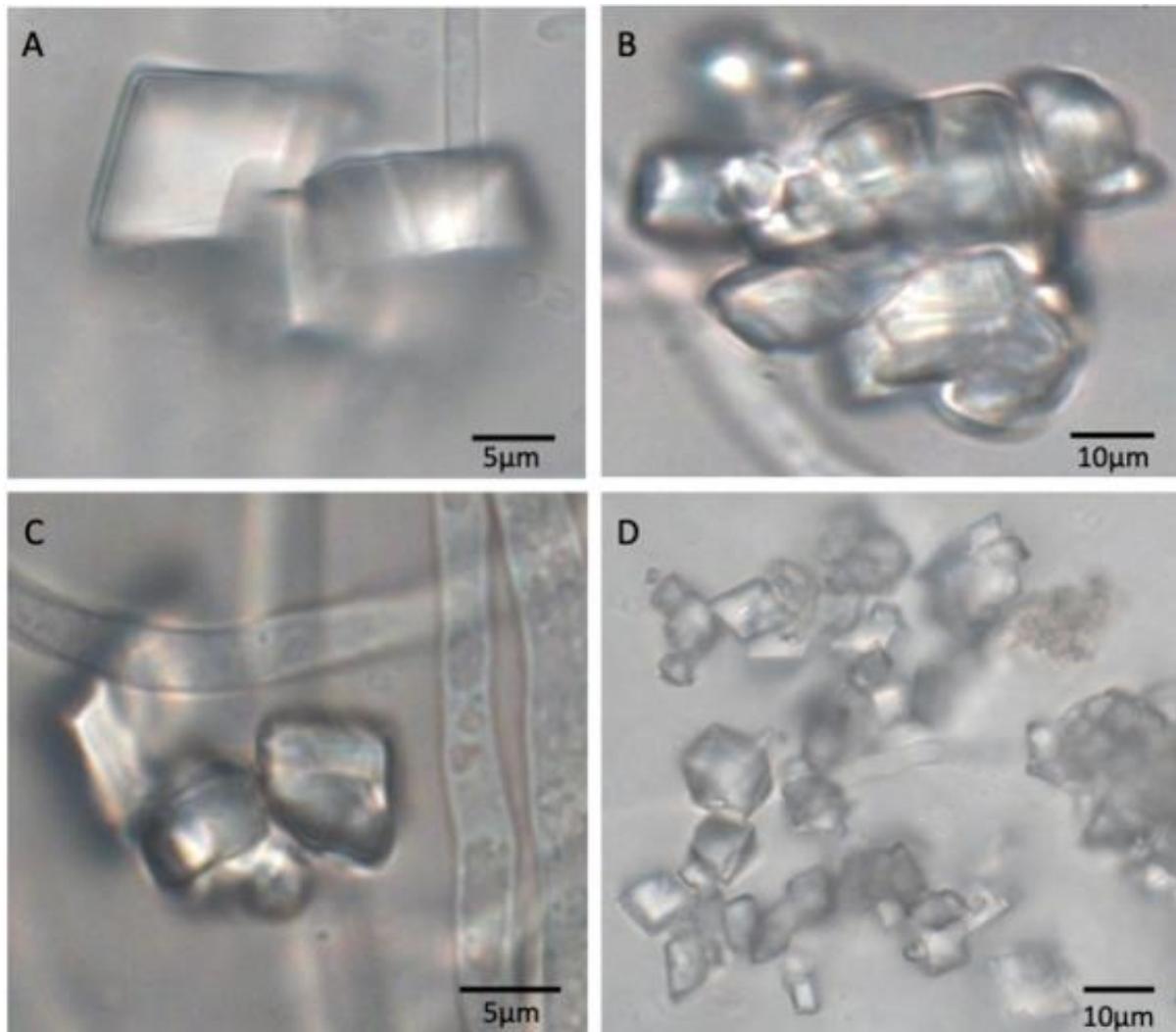


Figura 6. Micrografía de cristales de oxalato de calcio producidos por cepas del género *Lasiodiplodia*. A-B, *Lasiodiplodia brasiliense*; C-D, *Lasiodiplodia gilanensis*. Microscopio óptico invertido Zeiss Axiovert 200, capturadas con la cámara AxioCam 200 y analizadas con el software Zeiss AxioVision SE64, Rel. 4.9.1., Laboratorio de Fitopatología, CICESE.

Tabla 1. Análisis de la producción de cristales en cepas de la familia Botryosphaeriaceae.

| CEPA | | ORIGEN | REFERENCIA | Formación de cristales MEA+ CaCO ₃ |
|------------|------------------------------------|---|---------------------------|---|
| UCD2324Mar | <i>Botryosphaeria dothidea</i> | Condado de Marin, CA | Úrbez-Torres et al., 2006 | + |
| UCD1125Na | <i>Neofusicoccum parvum</i> | Condado de Napa, CA | Úrbez-Torres et al., 2006 | + |
| UCD1314So | <i>Neofusicoccum australe</i> | Condado de Sonoma, CA | Úrbez-Torres et al., 2006 | + |
| UCD1965SB | <i>Diplodia mutila</i> | Condado de Santa Bárbara, CA | Úrbez-Torres et al., 2006 | + |
| UCD2098Te | <i>Neofusicoccum luteum</i> | Valle de Temécula, Condado de Riverside, CA | Úrbez-Torres et al., 2006 | + |
| SACH19-3 | <i>Diplodia seriata</i> | San Antonio de las Minas, Ensenada, Baja California | Candolfi-Arballo, 2009 | + |
| SACH23 | <i>Neofusicoccum vitifusiforme</i> | San Antonio de las Minas, Ensenada, Baja California | Candolfi-Arballo, 2009 | + |
| SASI12-3 | <i>Diplodia corticola</i> | San Antonio de las Minas, Ensenada, Baja California | Candolfi-Arballo, 2009 | + |
| MXBCV5 | <i>Lasiodiplodia crassispora</i> | Valle de Guadalupe, Ensenada, Baja California | SR | + |
| MXVS16a | <i>Lasiodiplodia brasiliensis</i> | Hermosillo, Sonora | SR | + |

NOTA: SR, sin referencia; MEA + CaCO₃, Agar extracto de malta adicionado con carbonato de calcio; +, indica la presencia de cristales en el cultivo analizado.

3.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En las primeras micrografías de los cristales de oxalato de calcio, se observó un recubrimiento de la superficie con agar, lo cual dificultó su evaluación micro-elemental por SEM-EDS (Figura 7).

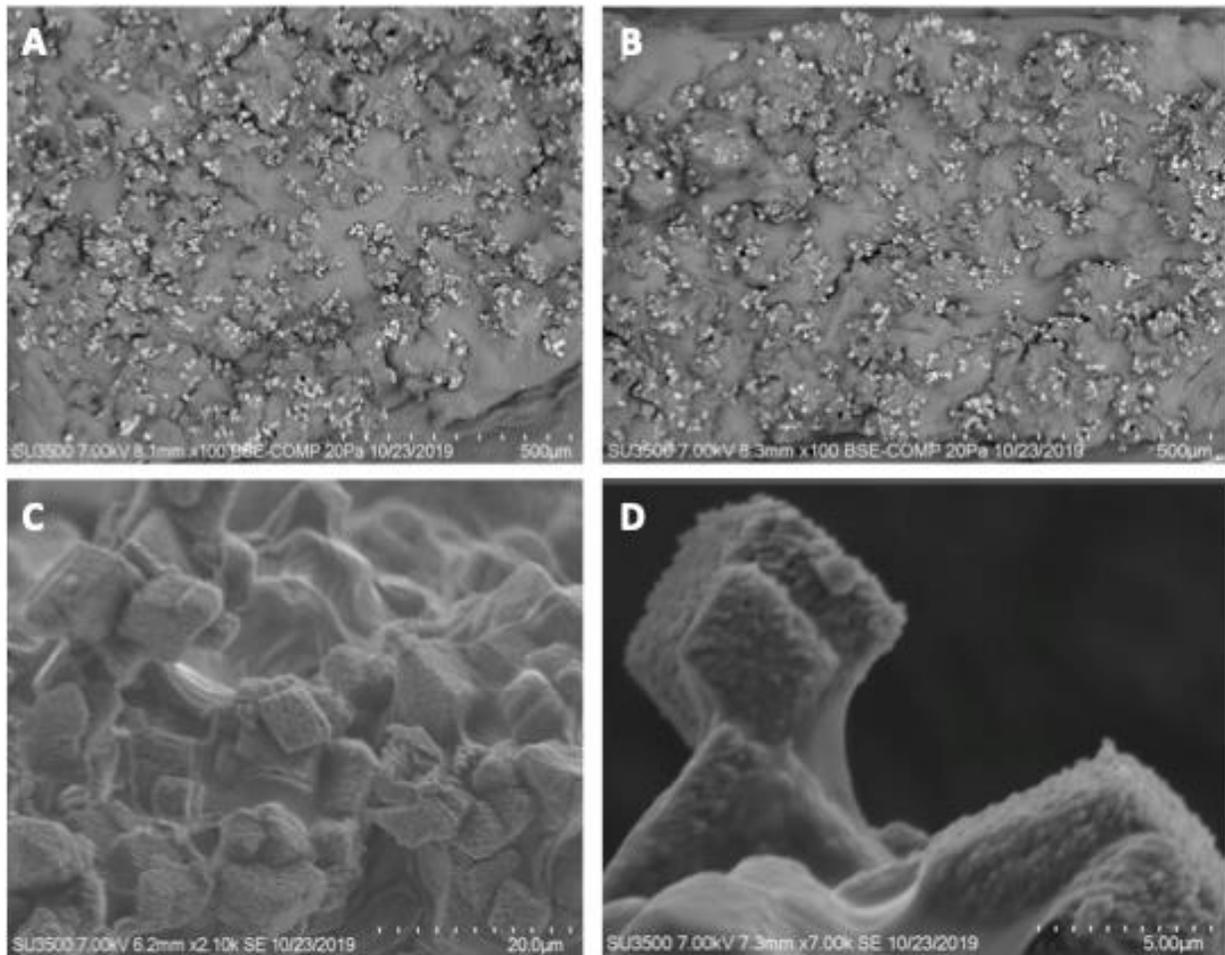


Figura 7. Micrografía de los cristales de oxalato de calcio producidos por cepas del género *Lasiodiplodia*. A-C, *Lasiodiplodia brasiliense* (MXBCL28). B-D, *Lasiodiplodia gilansensis* (UCD256Ma). Microscopio electrónico de barrido (SEM) Hitachi, División Física aplicada CICESE.

Una vez realizada la limpieza de la muestra, se observaron cristales mayormente tetragonales, mientras los de menor tamaño mostraron forma de placa, lo que les permite agruparse formando cúmulos de cristales de distintas formas y tamaño (Figura 8). Con la limpieza también se tuvieron las condiciones óptimas para los análisis micro-elementales de los cristales recuperados. En cada espectro se detectaron las señales emitidas por el carbono (C), el calcio (Ca) y el oxígeno (O); así como la presencia de la emisión de la energía dispersada por el aluminio, que compone la platina que soporta las muestras (Figura 8). En el Anexo B se muestran los valores obtenidos en cada caso. Estos resultados no confirmaron la naturaleza de los cristales obtenidos, debido a la similitud en la composición química del carbonato de calcio con el oxalato de calcio.

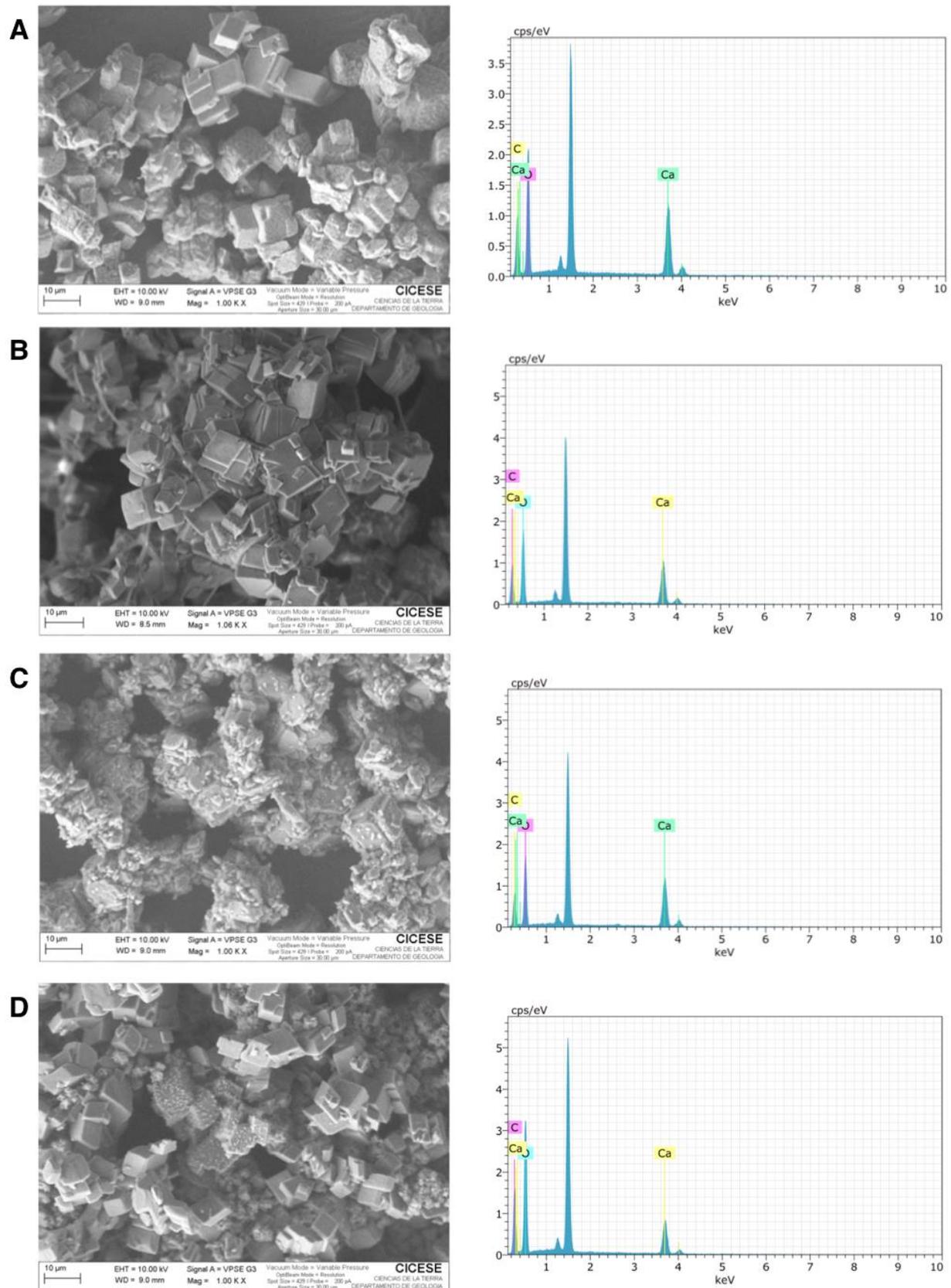


Figura 8. Análisis micro-elemental SEM-EDS. Micrografía y espectro de absorción de cristales producidos por A, *Lasiodiplodia brasiliense* (MXBCL28); B, *Lasiodiplodia gilansensis* (UCD256Ma); C, control de los cristales de oxalato de calcio (CaC_2O_4); D control de los cristales de carbonato de calcio (CaCO_3).

3.2.2 Identificación del ion oxalato mediante prueba de permanganato

El análisis de la presencia del ion oxalato en ambas cepas confirmó la naturaleza química de los cristales recuperados, dado que, en la prueba colorimétrica, se observó la pérdida de color rosado de la solución inicial de permanganato a incoloro, segundos posteriores de completar la reacción. Los controles negativos, la solución de reacción de KMnO_4 y el CaCO_3 , mantuvieron la coloración rosada; mientras que, en el control positivo, con CaC_2O_4 , como se esperaba, cambió a incoloro (Figura 9).

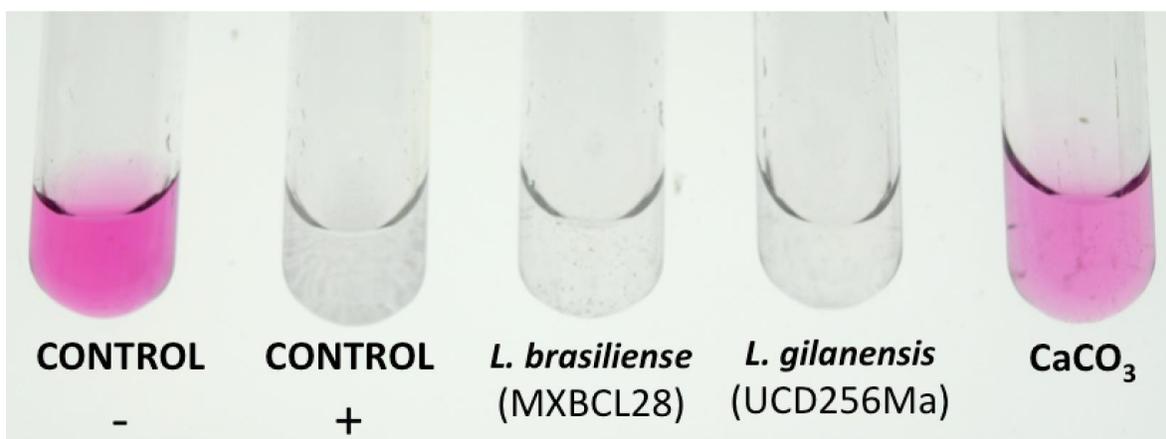


Figura 9. Prueba de permanganato para la detección del ion oxalato. CONTROL -, KMnO_4 ; CONTROL +, KMnO_4 + CaC_2O_4 (8g/L); *L. brasiliense* (MXBCL28), KMnO_4 + cristales de CaC_2O_4 a identificar; *L. gilanensis* (UCD256Ma), KMnO_4 + cristales de CaC_2O_4 a identificar; CaCO_3 , KMnO_4 + CaCO_3 .

Capítulo 4. Discusión

Las cepas de *Lasiodiplodia* producen sideróforos de distinta naturaleza química. En *L. gilanensis* UCD25Ma se observó la producción de compuestos de tipo hidroxamato, mientras que en *L. brasiliense* MXBCL28, adicionales a hidroxamatos, se encontraron compuestos de tipo catecolato. Adicionalmente, la presencia de cuatro bandas en las cromatografías de capa fina de sideróforos tipo hidroxamato y de dos bandas para catecolatos, indica la producción de más de un compuesto de tipo sideróforo en *L. brasiliense* MXBCL28. La producción de diferentes tipos de sideróforos por una misma especie de hongos se ha reportado en *Boletus edulis* (Szanislo et al., 1981), *Neurospora crassa* (Van der Helm y Winkelmann, 1994), *Aspergillus nidulans* (Charlang et al., 1981), *Penicillium chrysogenum* (Charlang et al., 1981), *Ustilago sphaerogena* (Ecker et al., 1983) y algunas especies del género *Trichoderma* (Anke et al., 1991). Esta característica puede considerarse como una adaptación a las distintas condiciones ambientales a las que están expuestos los microorganismos. Por ejemplo, los sideróforos de naturaleza hidrofílica ayudan a los hongos a colonizar superficies sólidas, permitiéndoles difundirse movilizándolo una mayor cantidad de hierro. Por otra parte, en hongos que colonizan ambientes acuosos, los sideróforos de naturaleza lipofílica, tienen la capacidad de contrarrestar la desventaja que representa la difusión en el medio (Riquelme, 1996). Los sideróforos de tipo hidroxamato y catecolato, tienen naturaleza principalmente hidrofílica, por lo que se infiere que, en las cepas de *Lasiodiplodia*, podrían favorecer la colonización de las plantas y la captura del hierro disponible en el medio.

Los sideróforos se han descrito como un importante factor de virulencia en microorganismos patógenos de animales, debido a su capacidad de captar el hierro presente en las proteínas de defensa de su hospedero (Payne, 1988). Considerando esto, se ha asignado una función ecológica similar a los sideróforos producidos por organismos fitopatógenos (Neilands y Leong, 1986). Por ejemplo, la bacteria fitopatógena *Erwinia chrysanthemi*, agente causal de pudrición blanda en distintas plantas hospederas, produce el sideróforo chrysoactin, al cual se le atribuye la capacidad patogénica de la cepa (Enard et al., 1988). En el hongo fitopatógeno *Colletotricum musae*, una especie asociada a antracnosis en banano, se observó que conidias producidas en condiciones limitadas de hierro, para inducir la producción de sideróforos, produjeron lesiones en el hospedero con mayor rapidez respecto a las conidias producidas en condiciones normales de hierro (Brown y Swinburne, 1981). Aunque se requiere mucho trabajo para determinar el papel de los sideróforos en especies de *Lasiodiplodia*, la presencia de dos tipos de sideróforos en *L. brasiliense* MXBCL28, no parece influir en la patogenia del hongo, dado que en estudios hechos en el laboratorio de fitopatología del CICESE, las dos cepas usadas aquí, produjeron lesiones

similares en plantas de vid (Rangel-Montoya, no publicado). Tampoco se puede descartar la producción de otros tipos de sideróforos en ambas cepas que no hayan sido producidos y detectados en el medio CAS.

A pesar de que los sideróforos se consideran cruciales para el crecimiento de la mayoría de las especies de hongos en condiciones limitadas de hierro, no todos los hongos tienen la capacidad de sintetizarlos. *Geotrichum candidum*, *Mucor* spp., *Phycomyces* spp., *Rhizopus* spp., entre otros ascomicetos, basidiomicetos y levaduras, en su lugar captan el hierro mediante distintos mecanismos alternativos dependientes de energía, temperatura y acidificación del medio para favorecer su biodisponibilidad (Dancis et al., 1990; Mor et al., 1992). Aunque no se descarta la posibilidad de que las especies de *Lasiodiplodia* capturen el hierro haciendo uso de distintas maquinarias que impliquen la relación directa con proteínas del hospedero, la presencia de compuestos de distinta naturaleza química y de más de un tipo, indica que, en estos hongos los sideróforos son los responsables de la captación del hierro usado para el crecimiento.

Mucho del conocimiento que se tiene de la producción de sideróforos está basado en observaciones *in vitro*, donde las condiciones tanto bióticas como abióticas pueden diferir de las encontradas en el ambiente en donde se desarrolla el microorganismo. Entre estas variaciones se encuentran las distintas fuentes de elementos fundamentales para el desarrollo, principalmente de carbono y nitrógeno, el pH y la temperatura del medio. Estas condiciones, derivan en el incremento o la disminución de la producción de diferentes sideróforos o incluso en el tipo de sideróforo producido, y, por ende, en un cambio en la afinidad por el hierro (Teintze y Leong, 1981). Por ello, no se descarta que las cepas analizadas en este trabajo produzcan compuestos tipo sideróforo de distintas naturalezas que no se hayan podido detectar bajo las condiciones en las que se realizó el experimento. Para determinar esto y el rol de los sideróforos en especies de *Lasiodiplodia* en la patogenicidad, en trabajos posteriores se pretende evaluar su producción durante el proceso de infección de plantas de vid.

Además de los sideróforos, con la finalidad de inmovilizar o acomplejar metales que se encuentren en exceso en el medio, algunos microorganismos producen metabolitos extracelulares como polisacáridos, pigmentos, o bien ácidos orgánicos. Los ácidos cítrico y oxálico son los ácidos orgánicos más comúnmente liberados al medio por hongos (Glasauer et al., 2005). Estos son importantes en la producción de energía como intermediarios en el ciclo tricarboxílico (TCA) y la homeostasis del pH celular, incluso se cree que los ácidos orgánicos tienen un papel esencial en la adquisición de nutrientes como resultado de sus propiedades de acidificación y unión a metales.

El presente trabajo demostró que la producción de cristales de oxalato de calcio, bajo condiciones saturadas de CaCO_3 , es un fenómeno conservado en distintas especies de la familia Botryosphaeriaceae. La producción *in vitro* de oxalato de calcio se ha reportado en líquenes, hongos micorrízicos y descomponedores (Graustein et al., 1977; Verrecchia, 1990; Arnott, 1995; Kolo y Claeys, 2005; Do Rio et al., 2008). También existen reportes de la producción de cristales de oxalato de calcio en hongos descomponedores de madera (Dutton et al., 1993; Schilling y Jellison, 2005; Hatakka y Hammel, 2010). En plantas superiores, la presencia de cantidades significativas de cristales de oxalato de calcio demuestra que su formación es un proceso fisiológico de gran importancia, en estos casos los cristales se forman a partir de ácido oxálico producido endógenamente y el calcio que la planta logra captar del suelo (Franceschi y Nakata, 2005; Costa et al., 2009). El oxalato de calcio es la forma de oxalato que se asocia más comúnmente a los suelos y hongos de vida libre, patógenos o simbioses de plantas (Glasauer et al., 2005).

En cuanto a la morfología de los cristales, se han reportado cristales romboédricos o prismáticos en forma de bloque que suelen encontrarse de manera individual y aislada, en conglomerados angulares o drusas, mientras en bacterias es común la formación de cristales cuya forma se asemeja a agujas llamados cristales aciculares (Costa et al., 2009; Glasauer et al., 2013). Costa y colaboradores (2009) indican que la geometría del cristal está determinada por la hidratación del cristal, la relación calcio-oxalato y la presencia de distintas sustancias contaminantes (Ryall et al., 2000; Guo et al., 2002; Ouyang et al., 2003; Touryan et al., 2004). El proceso de biomineralización del oxalato de calcio en hongos puede originar distintas geometrías de los cristales: tetragonal, bipiramidal, en forma de placa, romboédrica o agujas, incluso se ha reportado su asociación a la superficie de las hifas, lo que se suele denominar recubrimiento de hifa. En el caso de las especies del género *Lasiodiplodia* y en las especies de la familia Botryosphaeriaceae analizadas, se observó la formación de cristales de apariencia tetragonal, generalmente agrupados.

Debido a que no se encontraron diferencias en la morfología del cristal biogénico con los cristales de grado reactivo de CaCO_3 , La geometría de los cristales en las cepas de *Lasiodiplodia* observados en SEM y el análisis micro-elemental SEM-EDS no fueron contundentes para confirmar la naturaleza química de los cristales, es decir, si estos realmente correspondían a oxalato de calcio. En el trabajo de Guggiari y colaboradores (2011) con *Pycnoporus cinnabarinus* se concluyó que los cristales producidos eran de oxalato de calcio, sin realizar algún análisis adicional de su composición; sin embargo, se sabe que una sola especie puede formar más de un tipo de cristales, por ejemplo, en *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus niger* (Gadd et al., 2014), *Polyporus ciliatus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, o *Trametes versicolor* (Guggiari et al., 2011). Por otro lado, en *Codiaeum variegatum* los cristales biogénicos del oxalato de calcio fueron más

grandes con formas claramente definidas semejantes a una flor (Costa et al., 2009). Por estas razones, en este trabajo resultó necesaria la identificación química; esto se hizo con un ensayo de solubilidad del permanganato por acción del ion oxalato que confirmó la transformación del CaCO_3 . De esta forma probamos que las cepas de *Lasiodiplodia* producen ácido oxálico muy probablemente como parte de su proceso de patogenicidad.

Si bien este trabajo contribuye con información valiosa respecto a la producción de metabolitos secundarios en especies del género *Lasiodiplodia*, trabajos posteriores ayudarán a conocer el papel de los sideróforos y del ácido oxálico en la relación planta-patógeno, así como el rol de los sideróforos en el desarrollo del hongo. Para ello, se propone realizar ensayos en planta, así como el análisis de genes clave en la producción de estos metabolitos. Esto permitirá la generación de mutantes deficientes en la producción de sideróforos para evaluar su impacto en la patogenicidad del hongo.

Capítulo 5. Conclusiones

- Las cepas de *Lasiodiplodia brasiliense* MXBCL28 y *Lasiodiplodia gilanensis* UCD256Ma produjeron sideróforos. En *L. brasiliense* MXBCL28 se identificó la producción de una cantidad significativamente mayor de unidades de estos compuestos (46%), de tipo catecolato e hidroxamato, respecto a los sideróforos de tipo hidroxamato producidos por *L. gilanensis* UCD256Ma (32%).
- Los extractos crudos de moléculas de tipo hidroxamato y catecolato obtenidos de *L. brasiliense* MXBCL28, provocaron lesiones necróticas en hojas de vid cv. Merlot, indicando su posible implicación en la patogénesis. Las lesiones observadas fueron mayores con el extracto de tipo catecolato.
- En todas las cepas evaluadas se observó la formación de cristales principalmente tetragonales compuestos de carbono, hidrógeno y oxígeno. La presencia del ion oxalato en cristales producidos por *L. brasiliense* MXBCL28 y *L. gilanensis* UCD256Ma se confirmó empleando la titulación con permanganato.
- Este trabajo contribuye con la identificación de metabolitos secundarios de *Lasiodiplodia* spp. y acerca al entendimiento de su posible papel en la patogénesis.

Capítulo 6. Recomendaciones

A futuros estudiantes que muestren interés en el proyecto se les sugiere:

- Concluir con la identificación química de los compuestos tipo sideróforo, para conocer sus estructuras químicas, purificarlos y buscarles una aplicación biotecnológica.
- Ampliar el análisis de la producción de ácido oxálico y de sideróforos en otras especies de hongos asociadas a enfermedades de la madera.
- Para el estudio de la producción de sideróforos es importante utilizar exclusivamente material de cristal y lavarlo con potasa alcohólica, ya que trazas de metal comprometen la cantidad de unidades producidas.
- Evaluar la producción de ácido oxálico *in planta* y confirmar su producción en etapas tempranas de la patogénesis.
- Determinar el rol de los sideróforos en el proceso de patogenia.

Literatura citada

- Aguado-Santacruz, G., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., Preciado-Ortiz, R. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: Una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35 (1): 9 – 21.
- Aldridge, D. C., Galt, S., Giles, D., Turner, W. B. 1971. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 1623-1627. doi: 10.1039/J39710001623
- Alves, A., Crous, P. W., Correia, A., Phillips, A. J. L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal diversity*, 28, 1-13.
- Alvidrez-Villarreal, R., Hernández-Castillo, F. D., Garcia-Martínez, O., Mendoza-Villarreal, R., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C. N. 2012. Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. *Agricultural Sciences*, 3(3):405-416. doi: 10.4236/as.2012.33048
- Anke, H., Kinn, J., Bergquist, K. E., Sterner, O. 1991. Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma*. *Biology of metals*, 4(3), 176-180.
- Arnott, H., 1995. Calcium oxalate in fungi. En: Saeed, K. (Ed.), *Calcium oxalate in biological systems*. CRC, New York. pp. 73-111.
- Barr, D. P., Aust, S. D. 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental science & technology*, 28(2), 78A-87A. doi: 10.1021/es00051a002
- Bateman, D. F., Beer, S. V. 1965. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 55(11), 204-11.
- Boukhalfa, H., Crumbliss, A. L. 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals*, 15(4), 325-339. doi: 10.1023/A:1020218608266
- Brown, A. E., Swinburne, T. R. 1981. Influence of iron and iron chelators on formation of progressive lesions by *Colletotrichum musae* on banana fruits. *Transactions of the British Mycological Society*, 77(1), 119-124. doi: 10.1016/S0007-1536(81)80185-4
- Buydens, S., Heungens, K., Poppe, J., Hofte, M. 1996. Involvement of Pyochelin and pioverdin in suppression of *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Applied and Environmental Microbiology* 62(3), 865- 871.
- 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. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 98 pp.
- Cessna, S. G., Sears, V. E., Dickman, M. B., Low, P. S. 2000. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *The Plant Cell*, 12(11), 2191-2199. doi: 10.1105/tpc.12.11.2191

- Charlang, G., Ng, B., Horowitz, N. H., Horowitz, R. M. 1981. Cellular and extracellular siderophores of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. *Molecular and cellular biology*, 1(2), 94-100. doi: 10.1128/MCB.1.2.94
- Cleland, W. W., Johnson, M. J. 1956. Studies on the formation of oxalic acid by *Aspergillus niger*. *Journal of Biological Chemistry*, 220(2), 595-606.
- Cornell, R. M., Schwertmann, U. 2003. *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. (2da Ed.) John Wiley & Sons, Weinheim.
- Costa, L. M., Tronto, J., Constantino, V. R., Fonseca, M. K. A., Oliveira, A. P., Costa, M. R. 2009. Extraction and concentration of biogenic calcium oxalate from plant leaves. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33(3), 729-733. doi: 10.1590/S0100-06832009000300025
- Crosa, J. H., Walsh, C. T. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), 223-249. doi: 10.1128/MMBR.66.2.223-249.2002
- Crous, P. W., Palm, M. E. 1999. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. *Sydowia*, 51(2), 167-175.
- Damm, U., Crous, P. W., Fourie, P. H. 2007. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia*, 99(5), 664-680. doi: 10.1080/15572536.2007.11832531
- Dancis, A., Klausner, R. D., Hinnebusch, A. G., Barriocanal, J. G. 1990. Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 10(5), 2294-2301. doi: 10.1128/MCB.10.5.2294
- de Silva, N. I., Phillips, A. J., Liu, J. K., Lumyong, S., Hyde, K. D. 2019. Phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with *Magnolia* forest plants. *Scientific reports*, 9(1), 1-11. doi: 10.1038/s41598-019-50804-x
- Dissanayake, A. J., Phillips, A. J. L., Li, X. H., Hyde, K. D. 2016. Botryosphaeriaceae: Current status of genera and species. *Mycosphere*, 7(7), 1001-1073. doi: 10.5943/mycosphere/si/1b/13
- Do Rio, M. C. S., de Oliveira, B. V., de Tomazella, D. P., Da Silva, J. A. F., Pereira, G. A. 2008. Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao. *Current microbiology*, 56(4), 363. doi: 10.1007/s00284-007-9091-7
- Drechsel, H., Jung, G. 1998. Peptide siderophores. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, 4(3), 147-181. doi: 10.1002/(SICI)1099-1387(199805)4:3<147::AID-PSC136>3.0.CO;2-C
- Dutton, M.V., Evans, C.S., Atkey, P.T., Wood, D.A., 1993. Oxalate production by basidiomycetes, including the white-rot species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39, 5-10. doi: 10.1007/BF00166839
- Dutton, M. V., Evans, C. S. 1996. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian journal of microbiology*, 42(9), 881-895. doi: 10.1139/m96-114

- Dybas, M. J., Tataru, G. M., Criddle, C. S. 1995. Localization and Characterization of the Carbon Tetrachloride Transformation Activity of *Pseudomonas* sp. Strain KC. Applied and Environmental Microbiology, 61(2), 758-762.
- Ecker, D. J., Passavant, C. W., Emery, T. 1982. Role of two siderophores in *Ustilago sphaerogena*: Regulation of biosynthesis and uptake mechanisms. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 720(3), 242-249. doi: 10.1016/0167-4889(82)90047-7
- Enard, C., Dioloz, A., Expert, D. 1988. Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. Journal of bacteriology, 170(6), 2419-2426. doi: 10.1128/jb.170.6.2419-2426.1988
- Félix, C., Salvatore, M. M., DellaGreca, M., Meneses, R., Duarte, A. S., Salvatore, F., Naviglio, D., Gallo, M., Jorrín-Novo, J., Alves, A., Andolfi, A., Esteves, A. 2018. Production of toxic metabolites by two strains of *Lasiodiplodia theobromae*, isolated from a coconut tree and a human patient. Mycologia, 110(4), 642-653. doi: 10.1080/00275514.2018.1478597
- Fomina, M., Hillier, S., Charnock, J. M., Melville, K., Alexander, I. J., Gadd, G. M. 2005. Role of oxalic acid over excretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. Applied and Environmental Microbiology, 71(1), 371-381. doi: 10.1128/AEM.71.1.371-381.2005
- Foster, J. W. 1949. Chemical activities of fungi. Academic Press Inc., New York.
- Franceschi, V. R., Nakata, P. A. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. Annual Review of Plant Biology, 56, 41-71. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106
- Gadd, G. M., Bahri-Esfahani, J., Li, Q., Rhee, Y. J., Wei, Z., Fomina, M., Liang, X. 2014. Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. Fungal Biology Reviews, 28(2-3), 36-55. doi: 10.1016/j.fbr.2014.05.001
- Glasauer, S. M., Beveridge, T. J., Burford, E. P., Harper, F. A., Gadd, G. M. 2013. Metals and metalloids, transformation by microorganisms. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, 438-447. doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.05217-9
- Goodell, B. 2003. Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view. En: Goodell, B., Nicholas, D., Schultz, T. (Eds.) Wood deterioration and preservation. American Chemical Society. 845: 97-118. doi: 10.1021/bk-2003-0845
- Gramaje, D., Úrbez-Torres, J. R., Sosnowski, M. R. 2018. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. Plant disease, 102(1), 12-39. doi: 10.1094/PDIS-04-17-0512-FE
- Graustein, W., Cromack, K., Sollins, P. 1977. Calcium oxalate: occurrence in soils and effect on nutrient and geochemical cycles. Science, 198(4323), 1252-1254. doi: 10.1126/science.198.4323.1252
- Guggiari, M., Bloque, R., Aragno, M., Verrecchia, E., Job, D., Junier, P. 2011. Experimental calcium-oxalate crystal production and dissolution by selected wood-rot fungi. International biodeterioration & biodegradation, 65(6), 803-809. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.02.012

- Guo, S., Ward, M. D., Wesson, J. A. 2002. Direct visualization of calcium oxalate monohydrate crystallization and dissolution with atomic force microscopy and the role of polymeric additives. *Langmuir*, 18(11), 4284-4291. doi: 10.1021/la011754+
- Hamdan, H., Weller, D. M., Thomashow, L. S. 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3270-3277.
- Hatakka, A., Hammel, K.E., 2010. Fungal biodegradation of lignocelluloses. *The Mycota*, 10, 319-340. doi: 10.1007/978-3-642-11458-8_15
- Hickey, P. C., Swift, S. R., Roca, M. G., Read, N. D. 2004. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods in Microbiology*, 34, 63-87. doi: 10.1016/S0580-9517(04)34003-1
- Hodgkinson, A. (1977). *Oxalic acid in biology and medicine*. Academic Press, New York.
- Ismail, A. M., Cirvilleri, G., Polizzi, G., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Lombard, L. 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australasian Plant Pathology*, 41(6), 649-660. doi: 10.1007/s13313-012-0163-1
- Jakoby, W.B., Bhat, J.V. 1958. Microbial metabolism of oxalic acid. *Bacteriological Reviews*. 22(2), 75-80.
- Jalal, M. A., Mocharla, R., Barnes, C. L., Hossain, M. B., Powell, D. R., Eng-Wilmot, D. L., Grayson, S. L., Benson, B. A., Van der Helm, D. 1984. Extracellular siderophores from *Aspergillus ochraceus*. *Journal of bacteriology*, 158(2), 683-688.
- Johnson, G. I., Mead, A. J., Cooke, A. W., Dean, J. R. 1992. Mango stem end rot pathogens-Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology*, 120(2), 225-234. doi: 10.1111/j.1744-7348.1992.tb03420.x
- Kalbus, G. E., Lieu, V. T., Kalbus, L. H. 2004. A spectrophotometric study of the permanganate-oxalate reaction: An analytical laboratory experiment. *Journal of Chemical Education*, 81(1), 100. doi: 10.1021/ed081p100
- Kashinath, A., Demkowicz, M. J. 2011. A predictive interatomic potential for He in Cu and Nb. *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering*, 19(3), 1-8. doi: 10.1088/0965-0393/19/3/035007
- Keller, N. P. 2019. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 167-180. doi: 10.1038/s41579-018-0121-1
- Kolo, K., Claeys, P., 2005. In vitro formation of Ca-oxalates and the mineral glushinskite by fungal interaction with carbonate substrates and seawater. *Biogeosciences Discussions, European Geosciences Union*, 2(2), 451-497.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286 (5776), 885-886. doi: 10.1038/286885a0

- Krause, D. J., Kominek, J., Oplente, D. A., Shen, X. X., Zhou, X., Langdon, Q. K., DeVirgilio, J., Hulfachor, A. B., Kurtzman, C. P., Rokas, A., Hittinger, C. T. 2018. Functional and evolutionary characterization of a secondary metabolite gene cluster in budding yeasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 115(43), 11030-11035. doi: 10.1073/pnas.1806268115
- Lemanceau, P., Alabouvette, C., Meyer, J. M. 1986. Production of fusarinine and iron assimilation by pathogenic and non-pathogenic *Fusarium*. En: Swinburne, T. R. (Ed.), *Iron, Siderophores, and Plant Diseases*. Springer, Boston. 251-259
- Liu, A., Chen, W., Li, X. 2003. Changes in the postharvest physiology and lychee fruits latently infected by anthracnose fungus and the biological characteristic of the pathogenic fungus of the disease. En: II International Symposium on Lychee, Longan, Rambutan and other Sapindaceae Plants. International Society for Horticultural Science. 665, 365-372. doi: 10.17660/ActaHortic.2005.665.45
- Liu, G., Greenshields, D. L., Sammynaiken, R., Hirji, R. N., Selvaraj, G., Wei, Y. 2007. Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses. *Journal of Cell Science*, 120(4), 596-605. doi: 10.1242/jcs.001362
- Liu, J., Phookamsak, R., Doilom, M., Wikee, S., Li, Y., Ariyawansa, H., Boonme, S., Chomnunti, P., Dai, D., Bhat, J., Romero, A., Zhuang, W., Monkai, J., Jones, E., Chukeatirote, E., Ko, K., Zhao, Y., Wang, Y., Hyde, K. 2012. Towards a natural classification of Botryosphaeriales. *Fungal Diversity* 57:149-210. doi: 10.1007/s13225-012-0207-4
- Machuca, A., Napoleao, D., Milagres, A. M. F. 2001. Detection of metal-chelating compounds from wood-rotting fungi *Trametes versicolor* and *Wolfiporia cocos*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(7), 687-690. doi: 10.1023/A:1012929112523
- Magro, P., Marciano, P., Di Lenna, P. 1984. Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters*, 24(1), 9-12. doi: 10.1111/j.1574-6968.1984.tb01234.x
- Maslen, M. M., Collis, T., Stuart, R. 1996. *Lasiodiplodia theobromae* isolated from a subcutaneous abscess in a Cambodian immigrant to Australia. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 34(4), 279-283. doi: 10.1080/02681219680000471
- Maxwell, D. P., Bateman, D. F. 1968. Influence of carbon source and pH on oxalate accumulation in culture filtrates of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 58(10), 1351-1355.
- Maxwell, D. P., Lumsden, R. D. 1970. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. *Phytopathology*, 60, 1395-8. doi: 10.1094/Phyto-60-1395
- McCarroll, D. B., Thor, E. 1978. The role of oxalic acid in the pathogenesis of *Endothia parasitica*. En *Proceedings of the American Chestnut Symposium* 4, 60-63.
- McGrath, S. P., Chaudri, A. M., Giller, K. E. 1995. Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *Journal of industrial microbiology*, 14(2), 94-104. doi:10.1007/BF01569890
- McLoughlin, T., Quinn, J., Bettermann, A., Bookland, R. 1992. *Pseudomonas cepacia* suppression of

- sunflower wilt fungus and role of anti-fungal compounds in controlling the disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1760-1763.
- Mehl, J., Wingfield, M. J., Roux, J., Slippers, B. 2017. Invasive everywhere? Phylogeographic analysis of the globally distributed tree pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. *Forests*, 8(5), 145. doi: 10.3390/f8050145
- Mohali, S., Burgess, T. I., Wingfield, M. J. 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology*, 35(6), 385-396. doi: 10.1111/j.1439-0329.2005.00418.x
- Mor, H., Kashman, Y., Winkelmann, G., Barash, I. 1992. Characterization of siderophores produced by different species of the dermatophytic fungi *Microsporum* and *Trichophyton*. *BioMetals*, 5(4), 213-216.
- Mosqueda, V.R., De los Santos, R.F., Becerra, L.E.N., Cabrera, M., Ortega, Z.D.A., del Angel, P.A.L. 1996. Manual para cultivar mango en la planicie costera del Golfo de México. Campo Experimental Cotaxtla. INIFAP-CIRGOC. Folleto Técnico No. 15. Veracruz, México. 130 p.
- Müller, H. M., Frosch, S. 1975. Oxalate accumulation from citrate by *Aspergillus niger*. *Archives of Microbiology*, 104(1), 159-162. doi: 10.1007/bf00447318
- Müller, H. M. 1986. Utilization of gluconate by *Aspergillus niger*: II Enzymes of degradation pathways and main end products. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 141(6), 461-469. doi: 10.1016/S0232-4393(86)80036-1
- Narrillos Rodríguez, E. 2014. Estudio de sideróforos procedentes de bacterias patógenas de peces de acuicultura. Tesis de licenciatura en Química. Universidade da Coruña. 76 pp.
- Neilands, J. B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26723-26726. doi: 10.1074/jbc.270.45.26723
- Neilands, J. B., Leong, S. A. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annual Review of Plant Physiology*, 37(1), 187-208. doi: 10.1146/annurev.pp.37.060186.001155
- Nesbitt, B. F., O'Kelly, J., Sargeant, K., Sheridan, A. N. N. 1962. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature, London*, 195(4846), 1062-1063.
- Netto, M. S., Assunção, I. P., Lima, G. S., Marques, M. W., Lima, W. G., Monteiro, J. H., de Queiroz, Balbino, V., Michereff, S. J., Phillips, A. J., Câmara, M. P. 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity*, 67(1), 127-141. doi: 10.1007/s13225-014-0279-4
- Nord, F.F., Vitucci, J.C. 1947. On the mechanism of enzyme action; The acetate metabolism of certain wood-destroying molds and the mechanism of wood decay. *Archives Biochemistry*, 14 (1-2), 229-241.
- Noyes, R. D., Hancock, J. G. 1981. Role of oxalic acid in the Sclerotinia wilt of sunflower. *Physiological Plant Pathology*, 18(2), 123-132. doi: 10.1016/S0048-4059(81)80033-1
- Ochoa-Ascencio, S., Vázquez, M., Farías, R. 2007. Identificación genético molecular de hongos asociados a la pudrición peduncular del fruto de aguacate en Michoacán, México. En: *Memorias X Congreso*

Internacional/ XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología.

- Ouyang, J. M., Duan, L., Tieke, B. 2003. Effects of carboxylic acids on the crystal growth of calcium oxalate nanoparticles in lecithin–water liposome systems. *Langmuir*, 19(21), 8980-8985. doi: 10.1021/la0208777
- 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 Journal of Biotechnology*, 10(8), 1428-1435. doi: 10.5897/AJB10.950
- Paolinelli-Alfonso, M., Villalobos-Escobedo, J. M., Rolshausen, P., Herrera-Estrella, A., Galindo-Sánchez, C., López-Hernández, J. F., Hernandez-Martinez, R. 2016. Global transcriptional analysis suggests *Lasiodiplodia theobromae* pathogenicity factors involved in modulation of grapevine defensive response. *BMC genomics*, 17(1), 615. doi: 10.1186/s12864-016-2952-3
- Payne, S. M., Neilands, I. B. 1988. Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae. *CRC Critical reviews in microbiology*, 16(2), 81-111. doi: 10.3109/10408418809104468
- Pegg, K. G., Coates, L. M., Korsten, L., Harding, R. M. 2002. Foliar, fruit and soilborne diseases. En: Whiley, A. W., Schaffer, B., Wolstenholme, B. N. (Eds.) *The avocado: botany, production and uses*, CAB International, Croydon. pp 380-422.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., Fernández, F. J. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of microbiological methods*, 70(1), 127-131. doi: 10.1016/j.mimet.2007.03.023
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51-167. doi: 10.3114/sim0021
- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., Allende-Molar, R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(1), 54-74.
- Powell, P. E., Cline, G. R., Reid, C. P. P., Szaniszló, P. J. 1980. Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature*, 287(5785), 833-834. doi: <https://doi.org/10.1038/287833a0>
- Quinn, R. 2013. Rethinking antibiotic research and development: World War II and the penicillin collaborative. *American Journal of Public Health*, 103(3), 426-434. doi: 10.2105/AJPH.2012.300693
- Ratledge, C., Dover, L. G. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 881-941. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.881
- Rebell, G., Forster, R. K. 1976. *Lasiodiplodia theobromae* as a cause of keratomycoses. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 14(2), 155-170.
- Riquelme, M. 1996. Fungal siderophores in plant-microbe interactions. *Microbiología*, 12(4), 537-546.
- Rajo, B. I. 2013. *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum capsici*

- asociadas a pudrición del pedúnculo y antracnosis en papaya (*Carica papaya* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Culiacán, Culiacán, Sinaloa. 69 p.
- Rollins, J. A., Dickman, M. B. 2001. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 75-81. doi: 10.1128/AEM.67.1.75-81.2001
- Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W., Maki, C. S., Araújo, W. L., Dos Santos, D. R., Azevedo, J. L. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1(1), 24. doi: 10.7150/ijbs.1.24
- Ruddat, M., Kokontis, J., Birch, L., Garber, E. D., Chiang, K. S., Campanella, J., Dai, H. 1991. Interactions of *Microbotryum violaceum* (*Ustilago violacea*) with its host plant *Silene alba*. *Plant Science*, 80(1-2), 157-165. doi: 10.1016/0168-9452(91)90280-L
- Ryall, R. L., Fleming, D. E., Grover, P. K., Chauvet, M., Dean, C. J., Marshall, V. R. 2000. The hole truth: intracrystalline proteins and calcium oxalate kidney stones. *Molecular Urology*, 4(4), 391-402.
- Sayed, R. Z., Badgujar, M. D., Sonawane, H. M., Mhaske, M. M., Chincholkar, S. B. 2005. Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent *Pseudomonas*. *Indian Journal of Biotechnology*, 4(4), 484-490.
- Schilling, J.S., Jellison, J., 2005. Oxalate regulation by two brown rot fungi decaying oxalate-amended and non-amended wood. *Holzforschung*, 59(6), 681-688. doi: 10.1515/HF.2005.109
- Schwyn, B., Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9
- Seuk, C., Paulita, T., Baker, R. 1988. Attributes associated with increased bio-control activity of fluorescent *Pseudomonas*. *Journal of Plant Pathology*, 4(3), 218- 225.
- Shen, W., Mao, H., Huang, Q., Dong, J. 2014. Benzenediol lactones: a class of fungal metabolites with diverse structural features and biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 97, 747-777. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.11.067
- Summerbell, R. C., Kraiden, S., Levine, R., Fuksa, M. 2004. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. *Medical Mycology*, 42(6), 543-547. doi: 10.1080/13693780400005916
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Szanişzlo, P. J., Powell, P. E., Reid, C. P. P., Cline, G. R. 1981. Production of hydroxamate siderophore iron chelators by ectomycorrhizal fungi. *Mycologia*, 73(6), 1158-1174. doi: 10.1080/00275514.1981.12021450
- Teintze, M., Hossain, M. B., Barnes, C. L., Leong, J., Van der Helm, D. 1981. Structure of ferric pseudobactin: a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochemistry*, 20(22), 6446-6457. doi: 10.1021/bi00525a025

- Trinchant, J. C., Guerin, V., Rigaud, J. 1994. Acetylene reduction by symbiosomes and free bacteroids from broad bean (*Vicia faba* L.) nodules (role of oxalate). *Plant Physiology*, 105(2), 555-561. doi: 10.1104/pp.105.2.555
- Touryan, L. A., Lochhead, M. J., Marquardt, B. J., Vogel, V. 2004. Sequential switch of biomineral crystal morphology using trivalent ions. *Nature materials*, 3(4), 239-243. doi: 10.1038/nmat1096
- 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 Disease*, 90(12), 1490-1503. doi: 10.1094/PD-90-1490
- 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 Disease*, 92(4), 519-529. doi: 10.1094/PDIS-92-4-0519
- Úrbez-Torres, J. R., Gubler, W. D. 2009. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 93(6), 584-592. doi: 10.1094/PDIS-93-6-0584
- Úrbez-Torres, J. R. 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. En *Phytopathologia Mediterranea*, Special issue from the 7th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, 50, S5-S45.
- Van der Helm, D., Winkelmann, G. 1994. Hydroxamates and polycarboxylates as iron transport agents (Siderophores) in fungi. En: Winkelmann, G., Winge, D. (eds), *Metal ions in fungi*, (2da ed.) Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 11-39.
- van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H., Halleen, F. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, 96(4), 781-798. doi: 10.1080/15572536.2005.11832926
- Varela, F.S.E., Orozco, S.M., Torres, A.R.I., Silva, A.G.L. 2013. Guía técnica para la identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos. Universidad Autónoma de Tamaulipas. 428p.
- Verrecchia, E.P., 1990. Litho-diagenetic implications of the calcium oxalate-carbonate biogeochemical cycle in semiarid calcretes, Nazareth, Israel. *Geomicrobiology Journal*, 8, 87-99. doi: 10.1080/01490459009377882
- Walsh, C. T., O'Brien, R. V., Khosla, C. 2013. Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(28), 7098-7124. doi: 10.1002/anie.201208344
- Wagner, B. L., Lewis, L. C. 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3468-3473. doi: 10.1128/AEM.66.8.3468-3473.2000
- Weinberg, E. D. (1999a). Iron loading and disease surveillance. *Emerging infectious diseases*, 5(3), 346-352. doi: 10.3201/eid0503.990305
- Weinberg, E. D. (1999b). The role of iron in protozoan and fungal infectious diseases. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(3), 231-238. doi: 10.1111/j.1550-7408.1999.tb05119.x

Woo, P. C., Lau, S. K., Ngan, A. H., Tse, H., Tung, E. T., Yuen, K. Y. 2008. *Lasiodiplodia theobromae* pneumonia in a liver transplant recipient. *Journal of clinical microbiology*, 46(1), 380-384. doi: 10.1128/JCM.01137-07

Anexos

Anexo A. Unidades de sideróforos producidas por *Lasiodiplodia* spp.

Tabla 2. Análisis del porcentaje de unidades de sideróforos producidas por *Lasiodiplodia* spp.

| Tiempo de incubación | UNIDADES DE SIDERÓFOROS PRODUCIDAS (%) | |
|----------------------|---|---|
| | <i>Lasiodiplodia brasiliense</i> (MXBCL28) | <i>Lasiodiplodia gilensis</i> (UCD256Ma) |
| Día 3 | 12.79 ± 1.21 <i>c</i> | 18.39 ± 2.05 <i>bc</i> |
| Día 6 | 25.67 ± 1.55 <i>ab</i> | 25.33 ± 2.78 <i>abc</i> |
| Día 9 | 37.35 ± 2.53 <i>ade</i> | 26.83 ± 2.322 <i>ab</i> |
| Día 12 | 45.15 ± 3.64 <i>de</i> | 30.63 ± 3.273 <i>ab</i> |
| Día 15 | 46.43 ± 3.76 <i>e</i> | 32.82 ± 3.93 <i>ad</i> |

Porcentaje de unidades de sideróforos producidas ± error estándar. Valores acompañados con letras diferente indican diferencias significativas ($\alpha < 0.05$). Valores de absorbancia test CAS-líquido medición de absorbancia a 630nm. SkanIt Software 6.0.1 for Microplate Readers RE, ver. 6.0.1.6.

Anexo B. Transcripción de valores obtenidos en el análisis elemental SEM-EDS

Tabla 3. Transcripción de valores obtenidos en los microanálisis de *Lasiodiplodia gilanensis* (UCD256Ma).

| MUESTRA | NORM C. (wt.%) | | | C. ATOM (at.%) | | |
|---|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| | C | O | Ca | C | O | Ca |
| <i>Lasiodiplodia gilanensis</i> (UCD256Ma) | 12.65 | 53.17 | 34.18 | 20.14 | 63.55 | 16.31 |
| | 13.06 | 54.94 | 31.99 | 20.44 | 64.55 | 15.01 |
| | 13.59 | 55.08 | 31.33 | 21.13 | 64.28 | 14.6 |
| | 13.21 | 54.17 | 32.62 | 20.76 | 63.88 | 15.36 |
| | 12.48 | 48.06 | 39.45 | 20.67 | 59.75 | 19.58 |
| PROMEDIO | 12.998 | 53.084 | 33.914 | 20.628 | 63.202 | 16.172 |
| OXALATO | 13.93 | 51.31 | 34.76 | 22.16 | 61.67 | 16.57 |
| | 10.42 | 46.89 | 42.69 | 17.84 | 60.26 | 21.9 |
| | 11.03 | 50.04 | 38.94 | 18.3 | 62.34 | 19.36 |
| | 8.34 | 44.07 | 47.59 | 14.98 | 59.41 | 25.61 |
| | 12.35 | 56.15 | 31.5 | 19.31 | 65.93 | 14.76 |
| PROMEDIO | 11.214 | 49.692 | 39.096 | 18.518 | 61.922 | 19.64 |
| CARBONATO | 11.99 | 53.31 | 34.7 | 19.21 | 64.12 | 16.67 |
| | 11.47 | 50.3 | 38.24 | 18.89 | 62.22 | 18.88 |
| | 11.8 | 53.72 | 34.48 | 18.89 | 64.56 | 16.55 |
| | 11.74 | 52.41 | 35.84 | 18.99 | 63.64 | 17.37 |
| | 9.75 | 46.27 | 43.98 | 16.91 | 60.24 | 22.85 |
| PROMEDIO | 11.35 | 51.202 | 37.448 | 18.578 | 62.956 | 18.464 |

NOTA: NORM. C [wt.%] = concentración normalizada en porcentaje en peso del elemento;
C ATOM. [at.%] = porcentaje en peso atómico

Tabla 4. Transcripción de valores obtenidos en los microanálisis de *Lasiodiplodia brasiliense* (MXBCL28)

| MUESTRA | NORM C. (wt.%) | | | C. ATOM (at.%) | | |
|--|----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|----------------|
| | C | O | Ca | C | O | Ca |
| <i>Lasiodiplodia brasiliense (MXBCL28)</i> | 11.23 | 48.98 | 39.79 | 18.74 | 61.36 | 19.9 |
| | 9.76 | 40.19 | 50.05 | 17.77 | 54.92 | 27.31 |
| | 11.59 | 49.15 | 39.26 | 19.23 | 61.24 | 19.53 |
| | 12.89 | 56.76 | 30.36 | 19.95 | 65.96 | 14.08 |
| | 12.51 | 55.23 | 32.26 | 19.66 | 65.15 | 15.19 |
| | 12.7 | 52.84 | 34.46 | 20.25 | 63.28 | 16.47 |
| | 9.82 | 44.88 | 45.3 | 17.2 | 59.02 | 23.78 |
| PROMEDIO | 11.5 | 49.71857 | 38.782857 | 18.971429 | 61.561429 | 19.4657 |
| OXALATO | 14.24 | 57.01 | 28.75 | 21.69 | 65.18 | 13.12 |
| | 14.72 | 54.27 | 31.01 | 22.73 | 62.92 | 14.35 |
| | 13.38 | 53.08 | 33.55 | 21.14 | 62.97 | 15.89 |
| | 9.3 | 45.56 | 45.14 | 16.31 | 59.97 | 23.72 |
| | 11.5 | 53.18 | 35.32 | 18.54 | 64.39 | 17.07 |
| PROMEDIO | 12.628 | 52.62 | 34.754 | 20.082 | 63.086 | 16.83 |
| CARBONATO | 11.99 | 53.63 | 34.38 | 19.16 | 64.37 | 16.47 |
| | 12.16 | 53.66 | 34.19 | 19.4 | 64.26 | 16.34 |
| | 10.92 | 49.86 | 39.22 | 18.18 | 62.27 | 19.55 |
| | 10.69 | 48.06 | 41.25 | 18.07 | 61.02 | 20.91 |
| | 9.53 | 44.48 | 45.99 | 16.8 | 58.89 | 24.31 |
| PROMEDIO | 11.058 | 49.938 | 39.006 | 18.322 | 62.162 | 19.516 |

NOTA: NORM. C [wt.%] = concentración normalizada en porcentaje en peso del elemento;
C ATOM. [at.%] = porcentaje en peso atómico

Tabla 5. Transcripción de valores obtenidos en los microanálisis de la muestra control.

| MUESTRA | NORM C. (wt.%) | | | C. ATOM (at.%) | | |
|-----------------|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| | C | O | Ca | C | O | Ca |
| CONTROL | 10.96 | 52.29 | 36.75 | 17.9 | 64.11 | 17.99 |
| | 6.95 | 39.17 | 53.88 | 13.23 | 56.01 | 30.76 |
| | 10.16 | 51.65 | 38.2 | 16.82 | 64.22 | 18.96 |
| | 10.09 | 51.93 | 37.99 | 16.68 | 64.49 | 18.83 |
| | 7.95 | 43.67 | 48.38 | 14.39 | 59.36 | 26.25 |
| PROMEDIO | 9.222 | 47.742 | 43.04 | 15.804 | 61.638 | 22.558 |
| OXALATO | 16.24 | 57.88 | 25.87 | 24.08 | 64.42 | 11.5 |
| | 14.8 | 55.63 | 29.57 | 22.62 | 63.83 | 13.54 |
| | 12.72 | 49.73 | 37.55 | 20.75 | 60.9 | 18.35 |
| | 13.37 | 51.64 | 34.99 | 21.35 | 61.91 | 16.74 |
| | 12.81 | 55.63 | 31.56 | 20 | 65.23 | 14.77 |
| PROMEDIO | 13.988 | 54.102 | 31.908 | 21.76 | 63.258 | 14.98 |
| CARBONATO | 9.53 | 48.49 | 41.98 | 16.28 | 62.21 | 21.5 |
| | 11.04 | 54.47 | 34.48 | 17.73 | 65.67 | 16.6 |
| | 10.27 | 53.05 | 36.68 | 16.81 | 65.2 | 17.99 |
| | 10.83 | 53.22 | 35.94 | 17.6 | 64.91 | 17.5 |
| | 8.04 | 43.91 | 48.05 | 14.5 | 59.5 | 25.99 |
| PROMEDIO | 9.942 | 50.628 | 39.426 | 16.584 | 63.498 | 19.916 |

NOTA: NORM. C [wt.%] = concentración normalizada en porcentaje en peso del elemento;
 ATOM. [at.%] = porcentaje en peso atómico