

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



**Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida con
Orientación en Microbiología**

**Respuesta a inhibidores de melanina y condiciones de estrés
en el hongo *Lasiodiplodia theobromae***

Tesis

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

Presenta:

Edelweiss Airam Rangel Montoya

Ensenada, Baja California, México

2016

Tesis defendida por
Edelweiss Airam Rangel Montoya
y aprobada por el siguiente comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Dr. Marcos Paolinelli Alfonso

Dr. Thomas Gunter Kretzschmar



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad

Julio Verne

La solución de un problema no siempre es la que imaginamos; a veces la solución es absurda, es hablar de otra cosa; a veces, es ser infantil, a veces, es recurrir a la primera imagen que nos viene a la mente

Gustavo Cerati

Resumen de la tesis que presenta **Edelweiss Airam Rangel Montoya** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Respuesta a inhibidores de melanina y condiciones de estrés en el hongo *Lasiodiplodia theobromae*

Resumen aprobado por:

Dra. Rufina Hernández Martínez
Director de Tesis

Lasiodiplodia theobromae es un hongo de la familia Botryosphaeriaceae, reportado como uno de los patógenos más agresivos en vid (*Vitis vinifera*), causante de la muerte regresiva por botriosferia. Se ha reportado que en diferentes hongos fitopatógenos, la melanina es un compuesto esencial para el desarrollo de la patogénesis. La melanina es un pigmento derivado de la oxidación de compuestos fenólicos e indólicos y dependiendo del precursor, se clasifica en diferentes tipos. En *L. theobromae*, la melanina se deposita en la superficie interna de la pared celular, sin embargo, se desconoce su papel en el proceso de infección a la vid y los tipos de melanina que produce. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la melanina producida por *L. theobromae* y determinar su papel en la protección al estrés ambiental. Por ello se estudió la respuesta *in vitro* de la cepa UCD256Ma de *L. theobromae* en presencia de inhibidores de melanina, bajo diferentes condiciones de lisis enzimática, estrés oxidativo y radiación UV; y el uso de tirosina como fuente de nutrientes. Los inhibidores utilizados fueron triciclazol y *phthalide* para DHN-melanina; *tropolone* y ácido kójico para DOPA-melanina; y nitisinone para piomelanina. Se encontró que *L. theobromae* tiene la capacidad de producir los tres tipos de melanina, siendo DOPA-melanina el principal, el cual es sintetizado mediante la polimerización de tirosina. Este aminoácido también puede ser utilizado como fuente de nutrientes. La melanina protege al hongo de la lisis enzimática y del estrés oxidativo. También le brinda resistencia a las esporas pigmentadas en la exposición a UV. El micelio del hongo se melaniza en plantas de vid durante su proceso de colonización, especialmente al encontrarse en los tejidos del cambium vascular, parénquima, haces vasculares y médula. Este trabajo contribuye en la búsqueda de factores de patogenia de los hongos causantes de enfermedades de la madera de vid, lo cual es importante para entender sus interacciones con sus hospederos y eventualmente proponer estrategias de control.

Palabras clave: melanina, inhibidores de melanina, *Lasiodiplodia theobromae*, tirosina, vid.

Abstract of the thesis presented by **Edelweiss Airam Rangel Montoya** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Science Life with orientation in Microbiology

Response to melanin inhibitors and stress conditions in the fungus *Lasiodiplodia theobromae*

Abstract approved by:

Ph.D. Rufina Hernández Martínez
Thesis Director

Lasiodiplodia theobromae is a fungus from Botryosphaeriaceae family, reported as one of the most aggressive pathogens in grapevine (*Vitis vinifera*), causing Botryosphaeria dieback disease. It has been reported that in different phytopathogenic fungi, melanin is an essential compound for the development of pathogenesis. Melanin is a pigment derive of the oxidation of phenolic and indole compounds and depending of the precursor, it is classified it in different types. In *L. theobromae*, melanin is deposited in the inner surface of cell wall, however, is unknown its role in the infection process to vid and the types of melanin that produce. The aim of this work was to characterize the melanin produced by *L. theobromae* and to determine its role in the protection against environmental stress. Thus, it was studied the response *in vitro* of isolate UCD256Ma of *L. theobromae* in presence of melanin inhibitors, under different conditions of enzymatic lysis, oxidative stress and UV radiation; and the use of tyrosine as nutrients source. The inhibitors used were tricyclazole and phthalide to DHN-melanin; tropolone and kojic acid to DOPA-melanin; and nitisinone to piomelanina. It was found that *L. theobromae* has the capacity to produce the three melanin types, DOPA-melanin being the main, which is synthesized by polymerizing tyrosine. This amino acid also could be used as nutrients source. The melanin protects the fungus to enzymatic lysis, oxidative stress. It also provides resistance to pigmented spore to UV exposure. The mycelium of the fungus is melanized in grapevine plants during the colonization process, especially found in the vascular cambium, parenchyma, vascular bundles, and pith tissues. This work contributes in the search of factors involved in pathogenicity in fungi causing grapevine trunk diseases, which is important to understand its interactions with their hosts and eventually propose control strategies.

Key words: melanin, inhibitors melanin, *L. theobromae*, tyrosine, grapevine.

Dedicatoria

A Dios, por tantas bendiciones y por las personas que ha puesto en mi camino en diferentes etapas, personas increíbles que han enriquecido mi vida impulsándome a ser siempre alguien mejor.

A mis padres porque son las personas más importantes de mi vida y me han impulsado a seguir mis sueños. Gracias por su amor infinito, por creer en mí y apoyarme en todas mis decisiones.

A mi familia, mi hermana Roxangel, mi cuñado Guillermo, mis sobrinos Ángel y Osmar, y Tía Aleja por todo su apoyo, motivación y confianza.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por la oportunidad de continuar mi formación profesional. A CONACyT por la beca que me otorgó para realizar mis estudios de maestría y a UC Mexus-CICESE por el apoyo económico para realizar la estancia en la Universidad de California, Riverside.

A la Dra. Rufina por aceptarme en su laboratorio primeramente en el verano de 2011, permitiéndome de tener un primer acercamiento con mundo real de la ciencia y luego darme la oportunidad de volver para seguir creciendo profesionalmente. Muchas gracias por su confianza y enseñanzas.

A los miembros del comité de tesis, gracias Dra. Clara, Dr. Thomas por su disponibilidad en todo momento y comentarios hacia el proyecto, gracias Dr. Marcos por tu ayuda, tus consejos en cada etapa, y esas pláticas intentando descifrar la melanina de la *Lasi*.

Al Dr. Philippe por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y dejar la puerta abierta para continuar trabajando en colaboración; y al Dr. *Jérôme* por su apoyo en el trabajo de microscopía realizado durante la estancia en la UC Riverside.

A los Rufianes-Tacuaches, por convertirse en mi segunda familia. Lupita, Sara, Carla, Gaby M., Gaby Q., Marcos, Montana, Guimel, Habib, gracias por su apoyo cuando recién llegué al laboratorio y hacerme sentir pronto parte de éste. A Fernada, Saam, Eduardo, gracias por su amistad y compañerismo. A Claudia, gracias por tu amistad, consejos y tantos momentos compartidos que hacen más divertido el trabajo. Un gusto ser parte de este laboratorio y tener grandes compañeros como ustedes.

A Guillermo, a Adriana y Melissa, por su apoyo durante la estancia en CICESE.

A mi Teacher Vero, por todo su apoyo, por estar siempre cerca, y ayudarme a mejorar mi inglés, herramienta importante para mi desempeño profesional.

A mis grandes amigos, mi comadre Mayra, Oralia y Héctor, que siempre están presentes y de una u otra forma fueron parte de esta aventura acompañándome en el camino y manteniéndome cuerda en la locura, y liberándome del estrés con sus pláticas y momentos vividos.

Tabla de contenido

	<i>Página</i>
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas.....	xi
Capítulo I	
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Familia Botryosphaeriaceae	3
2.2. Definición y tipos de melanina	6
2.3. Funciones de la melanina	8
2.4. Melanina en la patogenia de hongos	8
2.5. Biosíntesis de melanina	10
2.5.1. Biosíntesis de DHN-melanina	10
2.5.2. Biosíntesis de DOPA-melanina	11
2.5.3. Biosíntesis de piomelanina	12
2.6. Metabolismo de aminoácidos aromáticos	13
2.7. Inhibidores de la melanina	14
3. Justificación	15
4. Hipótesis.....	15
5. Objetivos	15
5.1 Objetivo general.....	15
5.2. Objetivos específicos.....	15
Capítulo II	
6. Materiales y Métodos	16

6.1. Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento	16
6.2. Producción de esporas de <i>L. theobromae</i>	16
6.3. Evaluación del crecimiento micelial y morfología de <i>L. theobromae</i>	17
6.4. Evaluación del comportamiento de <i>L. theobromae</i> usando inhibidores de melanina.....	17
6.5. Evaluación del efecto de <i>tropolone</i> en el crecimiento de hongos con micelio hialino	17
6.6. Evaluación de la utilización de tirosina por <i>L. theobromae</i>	18
6.7. Evaluación de la utilización de DL-DOPA y fenilalanina como precursores de melanina..	18
6.8. Evaluación del papel de la melanina en <i>L. theobromae</i> frente a estrés abiótico.....	19
6.8.1. Lisis enzimática	19
6.8.2. Estrés oxidativo.....	19
6.8.3. Radiación UV.....	19
6.9. Microscopía de <i>L. theobromae</i> durante la colonización de plantas de vid	20

Capítulo III

7. Resultados	22
7.1. Pigmentación de esporas en picnidios	22
7.2. Crecimiento y morfología micelial de <i>L. theobromae</i> frente a diferentes inhibidores de melanina	23
7.3. Efecto del <i>tropolone</i> en hongos con micelio hialino	29
7.4. Utilización de tirosina como fuente de carbono y nitrógeno en <i>L. theobromae</i>	30
7.5. Utilización de DL-DOPA y L-fenilalanina como precursores de melanina	34
7.6. La melanina en la resistencia a lisis enzimática.....	36
7.7. La melanina en la resistencia a estrés oxidativo	38
7.8. La melanina en la resistencia a radiación UV	40
7.8.1. Porcentaje de germinación de esporas expuestas a radiación UV	41
7.9. Colonización de <i>L. theobromae</i> en plantas de vid.....	42

Capítulo IV

8. Discusión	45
--------------------	----

Capítulo V

9. Conclusiones	51
-----------------------	----

Lista de referencias	52
Anexos	59
Anexo I: Lista de abreviaciones	59
Anexo II: Preparación de soluciones stock.....	60

Lista de figuras

Figura	Página
1. Ciclo de vida de Botryosphaeriaceae spp.....	5
2. Vía de síntesis de DHN-melanina (modificado de Pihet <i>et al.</i> , 2009).....	10
3. Vía de síntesis de DOPA-melanina (modificado de Lagfelder <i>et al.</i> , 2003)	11
4. Vía de síntesis Piomelanina (modificado de Schmalzer-Ripcke <i>et al.</i> , 2009)	12
5. Plantas de Cabernet Sauvignon utilizadas	21
6. Picnidio de UCD256Ma con presencia de cirros (90X)	22
7. Morfología de esporas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> en diferentes estados de maduración.....	23
8. Morfología del crecimiento de UCD256Ma en presencia de inhibidores de DOPA-melanina y DHN-melanina.....	24
9. Crecimiento de UCD256Ma en presencia de inhibidores de DOPA-melanina y DHN-melanina.....	25
10. Morfología del crecimiento de UCD256Ma en presencia de inhibidores de DOPA-melanina, DHN-melanina y piomelanina	26
11. Crecimiento de UCD256Ma en presencia de inhibidores de piomelanina, DOPA-melanina y DHN-melanina.....	26
12. Desarrollo de las hifas de UCD256 en presencia de inhibidores de melanina	27
13. Diámetro de las hifas de <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en presencia de inhibidores de melanina y condiciones de estrés oxidativo y lisis enzimática	29
14. Efecto de <i>tropolone</i> en el crecimiento de <i>T. asperellum</i> y <i>F. oxysporum</i>	29
15. Uso de tirosina en el crecimiento de UCD256Ma	30
16. Desarrollo de las hifas de UCD256 en presencia de tirosina como fuente de nutrientes.....	31
17. Diámetro de la hifas de <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en los diferentes tratamientos con tirosina, DL-DOPA, fenilalanina y en presencia de inhibidores de melanina.....	32
18. Crecimiento de UCD256Ma en medio en presencia de tirosina e inhibidores de melanina	33
19. Crecimiento de UCD256Ma con tirosina como fuente de carbono y nitrógeno en presencia de diferentes inhibidores de melanina	33
20. Desarrollo de las hifas de UCD256 en presencia de tirosina como fuente de nutrientes e inhibidores de melanina.....	34
21. Crecimiento de UCD256Ma en MM9 con diferentes precursores de melanina	35
22. Crecimiento de UCD256Ma en MM9 con DL-DOPA, fenilalanina e inhibidores de melanina	35
23. Crecimiento de UCD256Ma en presencia del extracto enzimático (EE) de <i>T. asperellum</i> al 30%	36
24. Crecimiento de UCD256Ma bajo lisis enzimática en presencia del extracto de <i>T. asperellum</i> 30% e inhibidores de melanina.....	37
25. Desarrollo de las hifas de UCD256Ma en presencia del extracto enzimático (EE) de <i>T. asperellum</i>	37

26. Crecimiento de UCD256Ma en presencia del extracto enzimático (EE) de <i>T. asperellum</i> al 30% y el inhibidor de piomelanina	38
27. Crecimiento de UCD256Ma en condiciones de estrés oxidativo e inhibidores de melanina.....	38
28. Desarrollo de las hifas de UCD256Ma en la exposición a H ₂ O ₂ e inhibidores de melanina	39
29. Crecimiento de UCD256Ma en condiciones de estrés oxidativo e inhibidor de piomelanina	39
30. Crecimiento de UCD256Ma bajo estrés oxidativo en presencia de peróxido de hidrógeno 5% e inhibidores de melanina.....	40
31. Germinación de esporas de UCD256Ma a 96 h de incubación expuestas a radiación UV.....	41
32. Porcentaje de germinación de las esporas hialinas y pigmentadas de UCD256Ma expuestas a diferentes tiempos de radiación UV.....	42
33. Respuesta de la <i>V. vinifera</i> cv. Cabernet Sauvignon 28 dpi	43
34. Microscopía electrónica de barrido de <i>L. theobromae</i> in planta	43
35. Tinción de melanina en el hongo <i>L. theobromae</i> usando el método de Masson-Fontana	44
36. Relación de la biosíntesis de los diferentes tipos melanina en <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , sitios de acción de los inhibidores de melanina y la respuesta de <i>L. theobromae</i> al uso de los inhibidores de melanina.....	49

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Genes involucrados en la síntesis de melanina en <i>L. theobromae</i> UCD256Ma (adaptado de Paolinelli-Alfonso <i>et al.</i> , 2016)	6
2. Clasificación de la melanina	7
3. Tamaño de las esporas de la cepa UCD256Ma	23
4. Efecto de los inhibidores de melanina sobre el crecimiento de <i>L. theobromae</i>	28
5. Comportamiento de UCD256Ma bajo exposición UV	40

Capítulo I.

1. Introducción

La familia de ascomicetos Botryosphaeriaceae abarca una gran diversidad de hongos, los cuales han sido reportados como agentes patógenos, endófitos o saprófitos de plantas (Slippers y Wingfield, 2007). Presentan una distribución cosmopolita y generalmente se asocian a enfermedades degenerativas y muerte regresiva en un amplio rango de plantas leñosas de interés económico (Damm et al., 2007; Phillips et al., 2013).

En México, en la región de Baja California, el cultivo de la vid es de gran importancia. En esta zona se producen alrededor del 90% de los vinos de todo el país (González, 2014). El cultivo de la vid se ha visto afectado por varias especies de hongos, incluidos varios miembros de la familia Botryosphaeriaceae. Entre los síntomas que estos hongos causan en la vid se encuentran: manchas en hojas, pudrición de la fruta, muerte regresiva, necrosis del brote, decoloración vascular y canchros perennes (Úrbez-Torres, 2011). *Lasiodiplodia theobromae* es una especie de la familia Botryosphaeriaceae que se ha reportado como una de las más agresiva para la vid (Úrbez-Torres et al., 2008). *L. theobromae* se ha reportado en más de 500 especies hospederas (Punithalingam, 1976), y se caracteriza por tener células conidiógenas hialinas, lisas, y con una forma de cilíndrica a cónica. Presenta tanto esporas hialinas sin septos, como esporas pigmentadas de color marrón oscuro con septos, en las cuales la melanina se deposita en rayas regulares en la superficie interna de la pared de la espora dando una apariencia estriada (Phillips et al., 2013).

La melanina ha sido reportada como un factor importante en el desarrollo de la patogenicidad en algunos hongos (Bell y Wheeler, 1986; Nosanchuk y Casadevall, 2003; Plonka y Grabacka, 2006); dado que ésta les confiere la habilidad de resistir condiciones adversas del ambiente.

Dentro del reino fungi se han reportado tres diferentes vías de síntesis de melanina, dentro de las cuales, la que se produce a partir de 1,8-DHN es la más estudiada, y da lugar al tipo DHN-melanina (Butler y Day, 1998). Además los hongos pueden sintetizar melanina a partir L-DOPA, la cual se conoce como DOPA-melanina. (Bell y Wheeler, 1986; Butler y Day, 1998; Langfelder et al., 2003; Eisenman y Casadevall, 2012). Un tercer tipo de melanina, llamada piomelanina, se produce a partir de la acumulación de homogentisato (Carreira et al., 2001; Schmalzer-Ripcke et al., 2009;).

Aunque en algunos hongos, la melanina se considera un factor de patogenicidad (Nosanchuk y Casadevall, 2003), es importante investigar en cada hongo si funciona como tal, ya que cada uno presenta diferentes mecanismos de infección en su hospedero (Narayananamy, 2008). El estudio de los factores de patogenicidad de los hongos, también permite la comprensión de las enfermedades que causan y la interacción que establecen con la planta hospedera, y esto puede ayudar en el desarrollo de nuevas estrategias en el manejo y tratamiento de las enfermedades que ocasionan.

Por ello, con el fin de identificar el tipo de melanina producido por *L. theobromae*, y el papel en la protección a estrés abiótico, en el presente trabajo, se investigó el efecto de la utilización de compuestos inhibidores de la melanina bajo diferentes condiciones de estrés ambiental, y uso de tirosina como fuente de nutrientes.

2. Antecedentes

2.1. Familia Botryosphaeriaceae

Las especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae se presentan en un amplio rango de hospederos y se encuentran en todas las zonas geográficas con excepción de las regiones polares. Son principalmente patógenos en hospederos leñosos, aunque pueden tener una fase de crecimiento endofítica (van Niekerk *et al.*, 2006; Slippers y Wingfield, 2007; Phillips *et al.*, 2013).

El género *Botryosphaeria* fue descrito por Cesati y De Notaris en 1863 y posteriormente en 1877 fue modificado por Saccardo (Crous *et al.*, 2006; van Niekerk *et al.*, 2006). Desde entonces se ha sometido a diversos cambios taxonómicos tanto a nivel de familia como de género y especie. Por su parte el término Botryosphaeriaceae fue introducido por Theissen y Sydow en 1918 como una sub-familia en los Pseudosphaeriaceae (Phillips *et al.*, 2013). Sin embargo, actualmente la familia Botryosphaeriaceae es el único representante del orden Botryosphaeriales, de acuerdo a análisis filogenéticos de secuencias de ITS y rRNA (Denman *et al.*, 2000; Schoch *et al.*, 2006; Úrbez-Torres, 2011; Phillips *et al.*, 2013).

La identificación y descripción morfológica se basa principalmente en las características del anamorfo, ya que las especies teleomorfas se encuentran rara vez en la naturaleza y su diversidad es escasa para permitir la diferenciación clara entre especies (Denman *et al.*, 2000; van Niekerk *et al.*, 2006). En 2013, Phillips *et al.* (2013) describieron las características morfológicas de los 17 géneros reconocidos filogenéticamente, así como de 110 especies pertenecientes a la familia.

Dentro de las especies de Botryosphaeriaceae se han reportado 21 como patógenas en vid en todo el mundo en los géneros anamórficos *Diplodia*, *Dothiorella*, *Fusicoccum*, *Guignardia*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* y *Phaeobotryosphaeria* (Úrbez-Torres, 2011). Algunas de las especies que causan daños en plantas de vid en regiones vitivinícolas son: *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum australe*, *Neofusicoccum luteum*, *Neofusicoccum ribis*, *Botryosphaeria dothidea*, *Dothiorella viticola* y *Dothiorella ibérica* (Kotze *et al.*, 2011; Wunderlich *et al.*, 2011).

Estos hongos se asocian con enfermedades degenerativas causando canchros y decaimiento o muerte regresiva en un gran número de plantas leñosas (Damm *et al.*, 2007; Burruano *et al.*, 2008; Úrbez-Torres

y Gubler, 2009; Úrbez-Torres, 2011; Phillips *et al.*, 2013). Estas enfermedades afectan el vigor y el rendimiento de las plantas (Phillips, 1998), por lo que se consideran dentro de las más graves en la vid. Dentro de los síntomas asociados a la muerte regresiva por botriosferia se encuentran el retraso en el crecimiento, la presencia de canchales, lesiones necróticas en los haces vasculares, brazos muertos, y cañas decoloradas (Phillips, 1998; van Niekerk *et al.*, 2006; Wunderlich *et al.*, 2011).

Se conoce poco sobre cómo los miembros de la familia Botryosphaeriaceae interactúan con la planta de vid, aunque generalmente las respuestas de las plantas ante ataques de patógenos o a heridas mecánicas son similares, es decir, acumulación de fenoles en el lugar de la infección o la herida, la producción de fitoalexinas, la síntesis de enzimas hidrolíticas, y el refuerzo de la pared celular mediante polímeros fenólicos como suberina y lignina (Hawkins y Boudet, 1996).

El ciclo de vida de los hongos Botryosphaeriaceae en vid (Figura. 1) inicia a partir de las infecciones generadas por esporas asexuales. Estas esporas se encuentran dentro de estructuras de resistencia llamadas picnidios, que se forman durante el invierno sobre la superficie de la madera. A lo largo de la temporada, en su interior, se producen esporas que posteriormente se liberan al ambiente y son dispersadas bajo condiciones de humedad y corrientes de viento, penetrando a las plantas sanas principalmente a través de las heridas de poda (Bertsch *et al.*, 2013; Spagnolo *et al.*, 2014). Una vez dentro, las esporas germinan y colonizan el sistema vascular a través de los haces vasculares del xilema de la vid. Esto da como resultado la aparición de lesiones a los pocos días o semanas posteriores a la infección, aunque en ocasiones pueden presentarse períodos cortos de incubación. El daño al sistema vascular se ve reflejado en la necrosis y muerte regresiva de la planta (van Niekerk *et al.*, 2006; Úrbez-Torres *et al.*, 2010; Al-Saadoon *et al.*, 2012).

En México Úrbez-Torres *et al.* (2008) reportaron en viñedos de Sonora y Baja California la incidencia de *Lasiodiplodia theobromae* y *Diplodia seriata* principalmente como agentes causales de canchales perenes y muerte regresiva de la vid. *L. theobromae* (teleomorfo *Botryosphaeria rhodina*) se ha reportado en más de 500 especies hospedadoras (Punithalingam, 1976). Es un hongo pleomórfico y plurívoro, mayormente prevalente en regiones de clima tropical y subtropical (Úrbez-Torres, 2008). En vid, *L. theobromae* se ha reportado como uno de los patógenos más agresivos causante de la muerte regresiva por botriosferia (Úrbez-Torres y Gubler, 2009). Las células conidiógenas de *L. theobromae* son hialinas, lisas, de cilíndricas a cónicas, y holoblásticas. Presenta esporas hialinas y pigmentadas de color marrón oscuro, y septadas. La

melanina se deposita en rayas regulares en la superficie interna de la pared de la espora dando una apariencia estriada (Phillips *et al.*, 2013).



Figura 1. Ciclo de vida de Botryosphaeriaceae spp.

En un estudio reciente, Paolinelli-Alfonso *et al.* (2016), mediante el análisis del transcriptoma de *L. theobromae* identificaron por primera vez genes involucrados en más de una vía de síntesis de melanina en este hongo (Tabla 1). Además observaron que la expresión de los genes relacionados a la vía de DHN-melanina y piomelanina se expresan diferencialmente en condiciones de estrés por calor y presencia de madera; mientras que los genes relacionados a la vía de DOPA-melanina se expresan sólo en presencia de madera sin estrés por calor. Esto nos indica que posiblemente *L. theobromae* tiene la capacidad de sintetizar más de un tipo de melanina dependiendo de las condiciones en las que se encuentre expuesto.

Tabla 1. Genes involucrados en la síntesis de melanina en *L. theobromae* UCD256Ma (adaptado de Paolinelli-Alfonso *et al.*, 2016)

Gen	Vía de síntesis de melanina	Condición en la que se expresó
Putativa policétido sintasa	DHN-melanina	Madera de vid y estrés por calor
Putativa policétido sintasa		
Putativa policétido sintasa		
Putativa policétido sintasa		
deshidrogenasa de cadena corta reductasa		
4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD)	Piomelanina	
4- hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD)		
aspartato aminotransferasa		
12-homogentisato dioxigenasa (HGD)		
Tirosinasa (TYR)	DOPA-melanina	
Tirosinasa (TYR)		
Oxidasa		
Precursor lacasa-1		
Multicobre oxidasa (MCO)		

2.2. Definición y tipos de melanina

Las melaninas son macromoléculas biológicas de alto peso molecular derivados de la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos e indólicos (Jacobson, 2000). Son pigmentos generalmente de color oscuro, que se encuentran distribuidas en todos los reinos biológicos (Butler y Day, 1998; Eisenman y Casadevall, 2012; Solano, 2014). Existen diferentes tipos de melaninas presentes en diferentes reinos, lo cual puede indicar que existió una evolución de la melanogénesis, que puede ayudar a los organismos a adaptarse a las condiciones variables de la Tierra (Plonka y Grabacka, 2006). La síntesis de melanina se ha descrito en una gran variedad de bacterias, protozoarios, hongos, plantas y animales. En hongos fitopatógenos se ha propuesto como un factor de patogenicidad (Nosanchuk y Casadevall, 2003). De acuerdo a sus propiedades bioquímicas a la melanina se le considera como un biopolímero estable, insoluble y resistente (Solano, 2014).

La caracterización de la estructura química de este pigmento no ha sido fácil debido a que es insoluble en los disolventes habituales. Sólo ha sido posible identificar su estructura mediante el uso de resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés *Nuclear Magnetic Resonance*) o de espectroscopia de infrarrojo (IR) en algunas especies (Bell y Wheeler, 1986; Paim *et al.*, 1990; Nosanchuk *et al.*, 2015).

De manera general, la melanina se ha clasificado en tres tipos principales (Tabla 2): eumelanina, feomelanina y alomelanina. La eumelanina (negro o café), contiene nitrógeno y se produce DOPA-melanina por oxidación de la tirosina (o por oxidación de la fenilalanina) a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-

DOPA, por sus siglas en inglés *L-3,4-dihydroxyphenylalanine*) o directamente a partir de L-DOPA. El ejemplo más común es la DOPA-melanina. La feomelanina (amarilla o roja), puede contener azufre, además de nitrógeno y de igual manera que la eumelanina, tiene como precursor tirosina y/o L-DOPA, sólo que incluye un paso de cisteinilación de manera directa o a través de glutatión. La alomelanina no contiene nitrógeno, en su estructura y es el grupo más heterogéneo de melanina, y puede ser sintetizada a partir de tetrahidronaftaleno (THN, por sus siglas en inglés *tetrahydronaphthalene*) que por una serie de reacciones de deshidratación y reducción da lugar a 1,8-dihidroxinaftaleno (DHN, por sus siglas en inglés *dihydroxynaphthalene*) que posteriormente es polimerizado a melanina (DHN-melanina); otro tipo de alomelanina se sintetiza a partir de ácido homogentísico y da lugar a la piomelanina. (Kobayashi *et al.*, 1995; Funa *et al.*, 1999; Langfelder *et al.*, 2003; Plonka y Grabacka, 2006; Eisenman y Casadevall, 2012).

Tabla 2. Clasificación de la melanina de acuerdo a su precursor.

Clasificación	Precursor	Tipo	Características
Eumelanina	Tirosina/L-DOPA (-cisteína)	DOPA-melanina	Negra/café Contiene nitrógeno
Feomelanina	Tirosina/L-DOPA (+cisteína)	DOPA-melanina	Amarilla/roja Contiene nitrógeno y azufre
Alomelanina	DHN	DHN-melanina	No contienen nitrógeno
	Homogentisato	Piomelanina	

En hongos se han reportado diferentes vías metabólicas mediante las cuales se sintetiza melanina (Bell y Wheeler, 1986; Butler y Day, 1998). Las diferentes vías de síntesis varían dependiendo del precursor; por ejemplo, hongos pertenecientes al filo Basidiomycota, sintetizan melanina principalmente a través de la vía DOPA (Bell y Wheeler, 1986; Pal *et al.*, 2014). En este filo también se ha reportado la síntesis a partir de los precursores γ -glutaminil-3,4-dihidroxibenzeno (GDHB, por sus siglas en inglés *gamma-Glutaminyl-3,4-dihydroxybenzene*) o de catecol. Diferentemente, los hongos pertenecientes al filo Ascomycota, en su mayoría, sintetizan la melanina mediante la vía pentacétida, DHN) como precursor del polímero (Bell y Wheeler, 1986; Butler y Day, 1998; Henson *et al.*, 1999); aunque, también se ha descrito la síntesis del tipo DOPA-melanina en el género *Aspergillus* (Pal, *et al.*, 2014).

Por otro lado, la vía de piomelanina se ha descrito principalmente en las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* (Yabuuchi y Ohyama, 1972) y *Shewanella colwelliana* (Coon *et al.*, 1994); aunque también ha sido descrita en algunos hongos como *Yarrowia lipolytica* (Carreira *et al.*, 2001), *Madurella mycetomatis* (van de Sande *et al.*, 2007), *Aspergillus fumigatus* (Schmaler-Ripcke *et al.*, 2009), *Sporothrix* spp. (Almeida-Paes *et al.*, 2012), y recientemente en *Penicillium chrysogenum* (Vasanthakumar *et al.*, 2015).

2.3. Funciones de la melanina

La melanina no se considera un factor esencial para el crecimiento de los hongos, pero si interviene en un amplio espectro de funciones biológicas (Wu et al., 2008). La principal función de la melanina es brindar protección a las células de la radiación UV, así como de agentes oxidantes. Esto se debe a que la melanina interactúa con radicales libres y otras especies reactivas gracias a la presencia de electrones desapareados en sus moléculas (Butler y Day, 1998; Shcherba et al., 2000). De esta manera, la melanina contribuye a la supervivencia de las células bajo estrés ambiental (Jacobson y Tinnell, 1993; Wu et al., 2008).

Además, en los hongos se han descrito con frecuencia otros papeles funcionales, aunque no todos se han probado experimentalmente (Fernandez y Koide, 2013). Entre éstos se encuentra la protección contra lisis enzimática, temperaturas extremas, desecación y resistencia a fungicidas. Se ha reportado que cepas melanizadas de *Aspergillus phoenicis* (Bloomfield y Alexander, 1967) y *Aspergillus nidulans* (Kuo y Alexander, 1967) son resistentes a tratamientos de glucanasa y quitinasa, pero cepas sin melanina fueron susceptibles a la lisis enzimática. También se ha descrito como factor de virulencia en hongos (Butler y Day, 1998; Langfelder et al., 2003; Solano, 2014).

2.4. Melanina en la patogenicidad de hongos

En diferentes hongos fitopatógenos, se ha reportado que la melanina es esencial para el desarrollo de la patogénesis. La producción de DHN-melanina es importante durante la formación de apresorios, estructuras que permiten la penetración del tejido de la planta; así como en el crecimiento micelial estacionario del hongo (Nosanchuk y Casadevall, 2003; Eisenman y Casadevall, 2012). Es por esto, que dentro de las melaninas, la DHN-melanina ha sido la más estudiada en hongos.

El apresorio se forma a partir del tubo germinal de una espora asexual como una sola célula, éste se melaniza por completo, excepto en el poro donde el hongo está en contacto directo con la célula de la planta hospedera, lo que le ayuda principalmente a liberar enzimas degradadoras de la pared celular que debilitan la barrera estructural de la planta y le permite absorber nutrientes a través del poro (Butler et al., 2005).

Por ejemplo, en los hongos *Magnaporthe grisea* (Howard y Valent, 1996), *Colletotrichum lindemuthianum* (Wolkow et al., 1983) y *Colletotrichum lagenarium* (Kubo et al., 1982), la biosíntesis de DHN-melanina

es esencial en la formación de apresorio durante la infección de arroz, frijol y pepino, respectivamente. Por otro lado, muchos hongos oportunistas y patógenos de plantas, mutados en vías metabólicas involucradas en la pigmentación, son menos virulentos o incapaces de producir la enfermedad. También, la inhibición de la melanización de *Colletotrichum kahawae* en frutos de café, disminuye la presión de turgencia del apresorio y por ende la virulencia del hongo (Chen *et al.*, 2004; Eisenman y Casadevall, 2012).

También se han reportado metabolitos intermediarios de la biosíntesis de melanina en hongos, relacionados con su actividad fitopatógena. Por ejemplo, en la enfermedad del complejo de yesca en madera de vid, los hongos *Phaeoaniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* producen *scytalone* y naftoquinonas (Evidente *et al.*, 2000; Andolfi *et al.*, 2011). Las naftoquinonas son citotóxicas y pueden estar ligadas con las propiedades oxidantes. Mientras que los niveles de *scytalone*, pueden estar relacionados con la intensidad del color marrón-negro de la madera de la vid infectada y la aparición de material oscuro en los vasos del xilema (Bürki *et al.*, 2003; Andolfi *et al.*, 2011). Evidente *et al.* (2000) expusieron hojas de vid a una solución 0.05 mg·mL⁻¹ de *scytalone* purificado de *P. aleophilum* y observaron síntomas cloróticos que posteriormente se volvieron necróticos hasta secar el tejido infectado y provocar la separación de la hoja del peciolo.

Se considera que la melanina contribuye a la virulencia al reducir la susceptibilidad de los patógenos hacia los mecanismos de defensa del hospedero, debido a que promueve la supervivencia del patógeno causando la enfermedad (Nosanchuk y Casadevall, 2003). Una de las manifestaciones tempranas de defensa de las plantas es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Torres *et al.*, 2006) y la presencia de melanina aumenta la síntesis de enzimas antioxidantes (Kumar *et al.*, 2015) protegiendo de esta manera a la célula de radicales libres altamente reactivos. Además, Hamilton y Gómez (2002), describieron que la melanina puede actuar en la patogenia de los hongos como:

- a) “Un potente captador de radicales libres, que protege a la célula contra los oxidantes generados a través de las células como mecanismos de defensa. Por ejemplo, las células de *C. neoformans* no melanizadas pueden ser más susceptibles especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Esto se ha observado también en *S. schenckii* y *A. fumigatus*.”
- b) “Una armadura no específica, que protege a la célula de la luz UV, temperaturas extremas, péptidos antimicrobianos y antifúngicos. Así, las células melanizadas tienen más probabilidades de sobrevivir en el ambiente externo. Por lo tanto, es probable que el proceso de melanización en

los hongos se desarrolló en un inicio para proteger a las células de las influencias ambientales externas, en lugar de las respuestas de defensa del hospedero.”

2.5. Biosíntesis de melanina

2.5.1. Biosíntesis de DHN-melanina

La vía DHN-melanina fue descrita por primera vez por Wheeler y Bell en 1988 en *Verticillium dahliae*, con base en estudios genéticos y bioquímicos (Wheeler, 1981; Wheeler, 1982). El establecimiento de esta vía se debió a la identificación de diferentes intermediarios de la ruta utilizando cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC). El trabajo de Geis *et al.* (1984), donde se asoció la vía pentacétida en la síntesis de melanina en hongos dematiáceos, también contribuyó en la descripción de la vía DHN. El paso inicial de la vía DHN es la formación de 1,3,6,8-tetrahidroxi-naftaleno (1,3,6,8-THN) por la enzima policétido sintasa (PKS) a partir del precursor acetil-coenzimaA o malonil-coenzimaA (Figura 2).

Posteriormente este compuesto por acción de una enzima reductasa da lugar al intermediario *scytalone* que es deshidratado a 1,3,8-trihidroxi-naftaleno, reacción que es catalizada por la *scytalone* deshidratasa (SCD). El 1,3,8-THN es reducido por una segunda reductasa a *vermelone*. Es posible que a partir de este intermediario ocurra un segundo paso de deshidratación por la misma enzima SCD o por la enzima *vermelone* deshidratasa, que da lugar a DHN, el cual es el intermediario que da nombre a la vía. El DHN sufre una serie de reacciones de dimerización y polimerización mediante la acción de alguna fenol oxidasa para dar lugar a la DHN-melanina (Bell y Wheeler, 1986; Langfelder *et al.*, 2003; Eisenman y Casadevall, 2012).

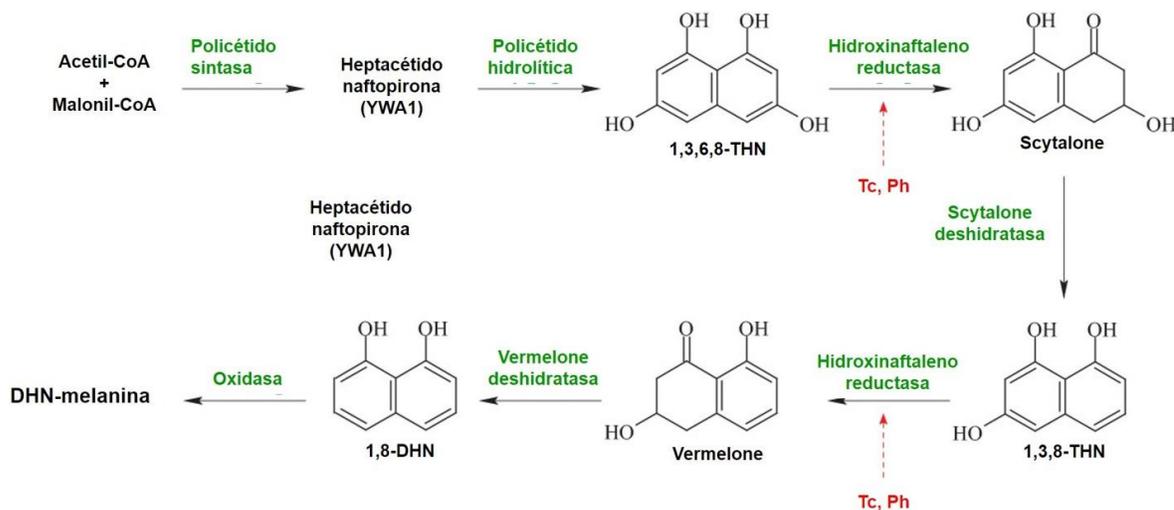


Figura 2. Vía de síntesis de DHN-melanina (modificado de Pihet *et al.*, 2009). En verde se indican las enzimas que intervienen en cada paso de la síntesis y, en rojo los sitios de acción de los compuestos inhibidores de la vía. Tc: triciclazol, Ph: phthalide.

2.5.2. Biosíntesis de DOPA-melanina

La síntesis de DOPA-melanina ha sido descrita en hongos como *Sporothrix schenckii* (Almeida-Paes *et al.*, 2009), *Aspergillus spp.* (Pal *et al.*, 2014) y *Cryptococcus neoformans* (Eisenman *et al.*, 2007). En esta vía se encuentran involucradas principalmente enzimas de la familia de las proteínas de cobre tipo 3 como lacasa y tirosinasa, debido a que el ion de cobre es necesario para unirse al grupo fenol del sustrato (Bell y Wheeler, 1986).

Los precursores de la vía pueden ser L-DOPA o tirosina. Cuando el precursor es la molécula de L-DOPA, ésta es oxidada por una enzima lacasa a dopaquinona; mientras que cuando el precursor corresponde a tirosina, esta debe primero ser convertida a L-DOPA y posteriormente a dopaquinona (Figura 3) (Langfelder *et al.*, 2003). El intermediario dopaquinona es altamente reactivo, y en ausencia de grupo tiol (o cisteína) formará ciclodopa (leucodopa-cromo) por adición nucleofílica al grupo amino. Este intermediario es oxidado para formar dopacromo, la cual por acción de la enzima dopacromo tautomerasa forma dihidroxindoles que se polimerizan a DOPA-melanina a través de actividad de tirosinasa o DHICA oxidasa (Bell y Wheeler, 1986; Ito, 2003; Langfelder *et al.*, 2003; Eisenman y Casadevall, 2012).

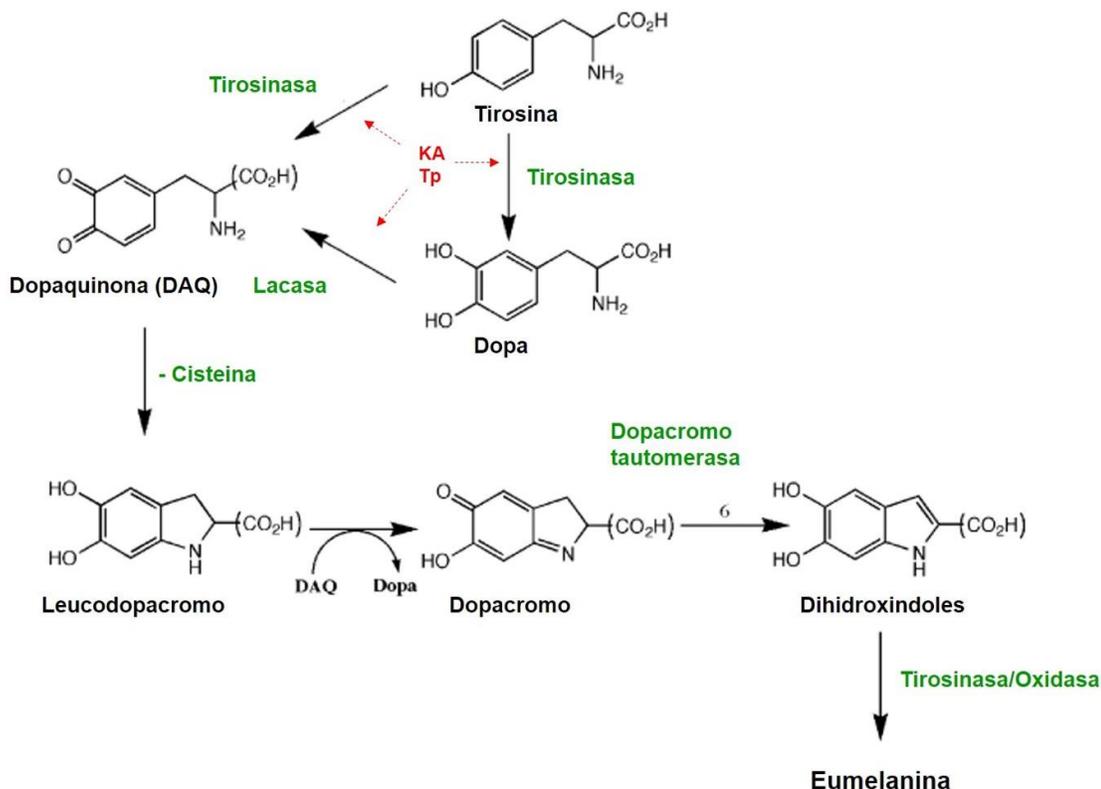


Figura 3. Vía de síntesis de DOPA-melanina (modificado de Langfelder *et al.*, 2003). En verde se indican las enzimas que intervienen en cada paso de la síntesis y, en rojo los sitios de acción de los compuestos inhibidores de la vía. Ka: ácido kójico, Tp: *tropolone*.

Por el contrario si el intermediario dopaquinona en presencia de cisteína, forma cisteinildopas que son oxidadas para dar lugar a intermediarios de benzotiazina para finalmente terminar en la producción de feomelanina (Ito, 2003; Turick *et al.*, 2010).

2.5.3. Biosíntesis de piomelanina

La piomelanina se forma a partir de la acumulación y polimerización del ácido homogentísico, el cual es un intermediario de la vía de degradación de tirosina. Este pigmento oscuro es hidrofílico, se sintetiza extracelularmente y se une a la superficie de las hifas (Schmaler-Ripcke *et al.*, 2009). Ya que el ácido homogentísico una vez secretado se auto-oxida para formar acetato de benzoquinona, y posteriormente, este se autoensambla en polímeros de piomelanina (Turick *et al.*, 2010).

En el inicio de la vía, la tirosina es degradada por la enzima tirosina aminotransferasa (TAT) a hidroxifenilpiruvato, el cual se convierte a ácido homogentísico (HGA) mediante la acción de la dioxigenasa de *p*-hidroxifenilpiruvato (HppD) (Figura 4). Posteriormente, el HGA puede utilizarse para producir piomelanina a través de la oxidación y polimerización del acetato de benzoquinona, y/o producir fumarato y acetato a través de la degradación del HGA a maleilacetoacetato por la enzima dioxigenasa de homogentisato (Heinekamp *et al.*, 2013).

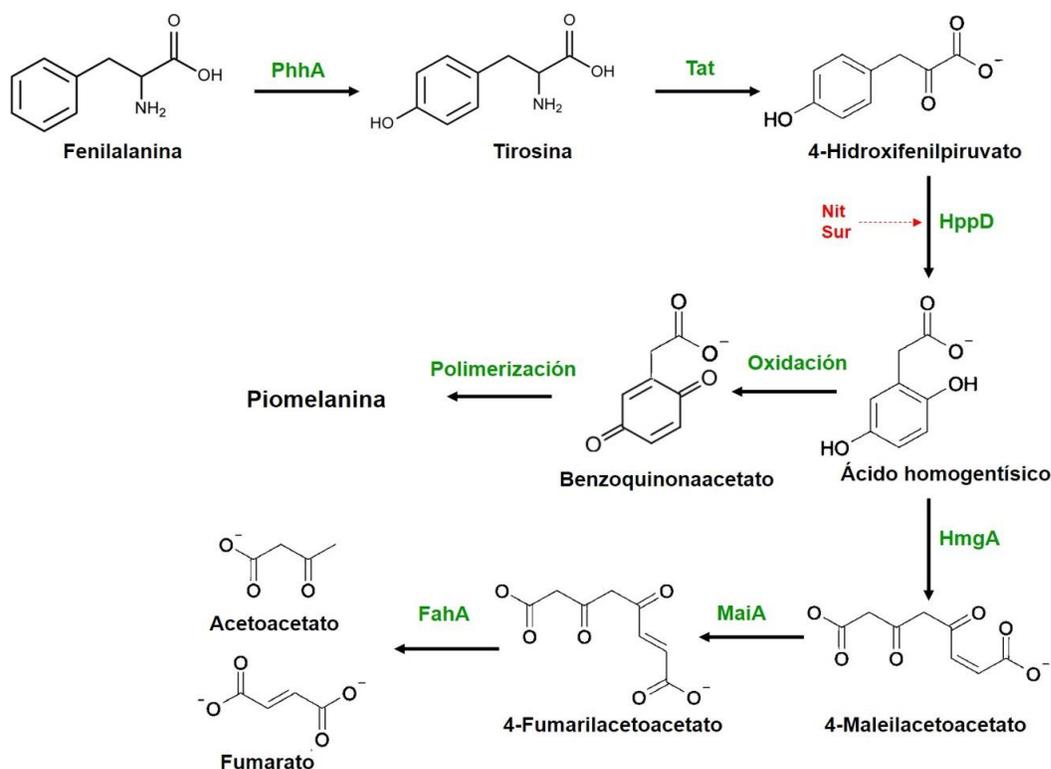


Figura 4. Vía de síntesis Piomelanina (modificado de Schmaler-Ripcke *et al.*, 2009). En verde se indican las enzimas que intervienen en cada paso de la síntesis y, en rojo los sitios de acción de los compuestos inhibidores de la vía. Nit: nitisinone, sur: surcotrina.

2.6. Metabolismo de aminoácidos aromáticos

Las plantas, en respuesta a agentes infecciosos, estímulos fisiológicos y estrés, sintetizan y acumulan compuestos derivados del metabolismo secundario. Entre estos se encuentran compuestos aromáticos como: compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas, terpenoides y esteroides (Goodman, et al., 1986). La biogénesis de estos compuestos aromáticos es igual en microorganismos y plantas superiores. Su ontogénesis se da a partir de aminoácidos aromáticos. La vía más importante para la biosíntesis de estos aminoácidos es la vía del ácido shikímico (Goodman, et al., 1986). Esta vía, a partir del ácido corísmico y posteriormente del ácido prefénico, conduce a la síntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano. De estos aminoácidos aromáticos, la tirosina y fenilalanina son precursores de un gran número de compuestos aromáticos del metabolismo secundario (Mathews *et al.*, 2002).

En las plantas, la tirosina y la fenilalanina dan lugar a la síntesis de compuestos que están involucrados en la estructura y/o defensa de esta, como son la lignina, suberina, fenilpropanoides, antocianinas, plastoquinonas, alcaloides isoquinolínicos y flavonoides (Nelson y Cox, 2008; Tzin y Galili, 2010). Algunos de estos compuestos se producen en un sitio alrededor de una infección causada por un patógeno y se acumulan en el tejido necrótico actuando como mecanismo de resistencia y/o defensa y de protección a UV (García-Mateo y Pérez-Leal, 2003; Nelson y Cox, 2008).

Por otro lado, la tirosina y la fenilalanina tienen un papel importante en la síntesis de melanina ya que son precursores de la DOPA-melanina, y están relacionadas con la piomelanina, ya que se deriva de la ruta de degradación de la tirosina (Bell y Wheeler, 1986; Schmalzer-Ripcke *et al.*, 2009; Pal *et al.*, 2014).

En algunos estudios, se ha encontrado que genes relacionados en la vía de degradación de tirosina se expresan en condiciones de infección de hongos patógenos de mamíferos como *Histoplasma capsulatum* (Hwang *et al.*, 2003), *Paracoccidioides brasiliensis* (Nunes *et al.*, 2005), *A. fumigatus* (Keller *et al.*, 2011), *Penicillium marneffeii*, y se ha sugerido que la tirosina tiene un rol clave como fuente de nutrientes durante el proceso de infección (Boyce *et al.*, 2015).

En *L. theobromae* Paolinelli-Alfonso *et al.* (2016), reportaron la inducción de genes para las enzimas HGD y HPPD relacionadas con el catabolismo de la tirosina y producción de piomelanina tanto en condiciones *in vitro* como *in planta* en condiciones de estrés. Por ello sugieren que en *L. theobromae* la vía de

piomelanina se activa después del estrés por calor y que ésta podría tener un rol durante su proceso de infección a la vid.

2.7. Inhibidores de la melanina

El uso de compuestos inhibidores específicos de cada vía de melanina, que bloquean pasos clave de la síntesis de esta, ayuda en el estudio de la vía que siguen los hongos en su producción. La vía de biosíntesis de la DHN-melanina puede ser inhibida por algunos compuestos, como triciclazol, cerulenina, *pyroquilone*, *phthalide* y clobentiazone. El triciclazol es un inhibidor de la DHN-melanina que bloquea la reducción del 1,3,6,8-THN a *scytalone* y de 1,3,8-THN a *vermelone* (Figura 2). Por su parte, la cerulenina inhibe enzimas como la policétido sintasa y la ácido graso sintetasa (Butler *et al.*, 2009).

En cuanto a la vía de síntesis de DOPA-melanina, también se han reportado algunos compuestos inhibidores como *tropolone*, ácido kójico, 2-mercaptobenzimidazole y dietilditiocarbamato. Estos compuestos actúan mediante un mecanismo competitivo con la tirosinasa debido a su capacidad de quelar el cobre cerca del sitio activo, dejando inactiva a la enzima, ya que esta requiere al cobre como cofactor (Figura 3) (Elliot, 1995; Chang *et al.*, 2009). También se ha reportado que en el caso de la enzima lacasa, que participa en la síntesis de DOPA-melanina, el *tropolone* no afecta su actividad, pero si el ácido kójico (Iyer y Chattoo, 2003).

La inhibición de piomelanina se ha estudiado principalmente en bacterias. En *P. aeruginosa* se ha reportado el uso de 2- [2-nitro-4- (trifluorometil) benzoil] -1,3-ciclohexanodiona (NTBC o nitisone); este compuesto interacciona con la enzima hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (4-HPPD) (Figura 4) de *P. aeruginosa* inhibiendo la producción de ácido homogentísico y su polimerización a piomelanina (Ketelboeter *et al.*, 2014). En *Shewanella algae* se ha usado [2-(2-cloro-4-metano sulfonilbenzoil)-1,3-ciclohexanediona] (sulcotrione), que igualmente es un inhibidor de la hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (4-HPPD), el cual previene la producción de ácido homogentísico, que es el precursor de la piomelanina (Turick *et al.*, 2008). En hongos, el uso de sulcotrione en *Sporothrix* spp. mostró una inhibición en la producción de piomelanina (Almeida-Paes *et al.*, 2012).

3. Justificación

En el hongo *L. theobromae*, se conoce poco sobre sus factores de patogenia y las medidas de control para el tratamiento de las enfermedades ocasionadas por este hongo son limitadas. Recientemente, en un estudio sobre el transcriptoma de este hongo realizado en el laboratorio de fitopatología del CICESE (Paolinelli-Alfonso *et al.*, 2016) se reportaron diferentes genes involucrados en más de una vía de síntesis de melanina. Se piensa que la melanina puede contribuir a la virulencia de *L. theobromae*, al proveerle protección hacia los mecanismos de defensa del hospedero y proteger sus conidiosporas contra la radiación ultravioleta. La vía que sigue para la síntesis de melanina y la relación que esta puede tener en su virulencia no ha sido explorada. Por lo anterior, es importante estudiar la síntesis de melanina en *L. theobromae*, y su rol como agente protector con el fin de considerarla para futuras estrategias de control de la enfermedad causada por este hongo.

4. Hipótesis

L. theobromae produce diversos tipos de melanina que le ayudan en la protección frente al estrés ambiental.

5. Objetivos

5.1.1. Objetivo general

Determinar el papel que tiene la melanina del hongo *Lasiodiplodia theobromae* para contender con el estrés ambiental y evaluar la presencia de la misma en el hongo durante su infección a plantas de vid.

5.1.2. Objetivos específicos

1. Determinar el tipo de melanina producido por *L. theobromae* usando inhibidores de melanina.
2. Evaluar la capacidad de *L. theobromae* de utilizar tirosina como fuente de carbono y nitrógeno; y relacionarlo con la síntesis de melanina.
3. Evaluar el crecimiento de *L. theobromae* frente al estrés ambiental por lisis enzimática, especies reactivas de oxígeno y radiación UV.
4. Evaluar la presencia de melanina en *L. theobromae* durante el proceso de infección y colonización.

Capítulo II.

6. Materiales y Métodos

6.1. Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento

Se utilizó la cepa UCD256Ma de *L. theobromae* aislada de una planta de vid del condado de Madera en California con presencia de canchales (Úrbez-Torres *et al.*, 2006). Esta fue proporcionada al laboratorio por el Dr. Douglas Gubler de la Universidad de California, Davis. La cepa se conservó en glicerol al 20% a 4 °C y fue cultivada rutinariamente en medio PDA Difco a 30±2 °C.

También, se utilizaron las cepas de *Trichoderma asperellum* T. TORO y de *Fusarium oxysporum* FFOCR-SQ, previamente aisladas y caracterizada molecularmente en el laboratorio de fitopatología de CICESE. Las mismas se cultivaron en PDA Difco a 28±2 °C.

6.2. Producción de esporas de *L. theobromae*

Para la obtención de espora hialinas y pigmentadas del hongo *L. theobromae*, la cepa UCD256Ma se creció en 15 mL de medio mínimo de Vogel (MMV) líquido con madera de vid molida 5% (p/v). La madera se obtuvo a partir de sarmientos de vid cv. Cabernet Sauvignon, los cortes se congelaron en nitrógeno líquido y se molieron con el uso de una licuadora (Waring), posteriormente se esterilizó en autoclave. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente bajo una lámpara de radiación electromagnética ultravioleta cercana, y/o una lámpara de fluorescencia de luz blanca para propiciar la formación de picnidios durante 15 a 20 días. Pasado el tiempo de incubación, se procedió a recolectar las esporas producidas dentro de los picnidios, esto se realizó observando los cultivos bajo un estereoscopio (Zeigen) y utilizando una aguja de disección. Se tomaron por separado esporas hialinas y pigmentadas, las cuales se suspendieron en una solución de Tween 20 al 0.05 % v/v para propiciar la separación de las esporas. Para ajustar la concentración, las esporas se contaron utilizando una cámara de Neubauer y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

6.3. Evaluación del crecimiento micelial y morfología de *L. theobromae*

Para evaluar el crecimiento micelial en cada uno de los ensayos realizados, se inoculó un disco micelial de 5 mm de diámetro en un extremo de la caja Petri, conteniendo los medios descritos en las secciones siguientes, y cada 24 h se marcó el margen de crecimiento del hongo en el medio utilizado. Se evaluaron los cambios en la pigmentación y la formación de micelio aéreo con respecto al tratamiento control de cada ensayo. Por otro lado, la morfología de las hifas se evaluó mediante microscopía de luz (Zeiss Axiovert 200, software AxioVision 4.8.2), tomando fotografías únicamente de las hifas en crecimiento y midiendo su diámetro. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6.4. Evaluación del comportamiento de *L. theobromae* usando inhibidores de melanina

El efecto de los inhibidores de melanina, *tropolone* (Tp), ácido kójico (Ka), *phthalide* (Ph), triciclazol (Tz) y *nitisinone* (NTBC), en el crecimiento de *L. theobromae* se evaluó en medio PDA adicionando el compuesto respectivo a 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200, 400, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las cajas se mantuvieron por 4 días a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. La preparación de las soluciones stock para cada inhibidor se describe en el Anexo II. Además se realizaron ensayos combinando los diferentes compuestos. Al final del experimento, se evaluó el crecimiento micelial, la morfología de la colonia, y el efecto de cada compuesto en el desarrollo de las hifas. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron para ensayos posteriores, aquellos inhibidores y concentraciones en los que el hongo mostró una disminución del color oscuro de la colonia en comparación con los controles en PDA.

6.5. Evaluación del efecto de *tropolone* en el crecimiento de hongos con micelio hialino

Con el fin de descartar que el *tropolone*, al ser un quelante de cobre (cofactor de la enzima tirosinasa) interfiriera con alguna ruta esencial para el crecimiento, se evaluó su efecto en hongos con micelio no melanizado (hialino). Para lo cual se emplearon las cepas FFOCR-SQ de *F. oxysporum* y T. TORO de *T. asperellum*. Ambas especies se crecieron en medio PDA suplementado con *tropolone* $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se usó medio PDA como control. Las cajas se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 días.

6.6. Evaluación de la utilización de tirosina por *L. theobromae*

Para evaluar la capacidad de *L. theobromae* de utilizar tirosina en su metabolismo, se creció al hongo en placas con medio mínimo 9 (MM9) sólido ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$: 10.0 glucosa, 5.8 Na_2HPO_4 , 3.0 K_2HPO_4 , 0.5 NaCl, 1.0 NH_4Cl) suplementado con tirosina 10 mM.

Además se preparó el medio sin la adición de glucosa (MM9-C), y sin glucosa ni NH_4Cl (MM9-CN), e igualmente los medios se suplementaron con tirosina 10 mM. El hongo se inóculo a partir de un disco micelial de 5 mm de diámetro, las cajas se incubaron durante 7 días a 30 ± 2 °C. El uso de tirosina, se determinó por la formación de un halo de degradación alrededor de la colonia, distinguible por la disminución de la opacidad del medio.

También se evaluó el uso de la tirosina 10 mM en el medio MM9-CN conteniendo los inhibidores de melanina previamente seleccionados. Las cajas Petri se inocularon con un disco micelial de 2 mm de diámetro y las cajas se crecieron durante 7 días a 30 ± 2 °C. En todos los tratamientos se evaluó la morfología de las hifas y de la colonia, el crecimiento micelial y el uso de tirosina.

6.7. Evaluación de la utilización de DL-DOPA y fenilalanina como precursores de melanina

Los medios MM9, MM9-C y MM9-CN fueron suplementados con DL-DOPA 1mM. También, se evaluó el efecto del *tropolone* en presencia de DL-DOPA 1mM en el medio MM9.

El uso de fenilalanina en el metabolismo de *L. theobromae* se evaluó en los medios MM9, MM9-C y MM9-CN suplementados con fenilalanina a 5 mM. También se evaluó el efecto del *tropolone* en presencia de fenilalanina 5 mM en el medio MM9. Todos los tratamientos se inocularon con un disco micelial del hongo de 5 mm de diámetro y se incubaron durante 7 días; se evaluaron: la morfología de la colonia, el color, el crecimiento y la morfología de las hifas.

6.8. Evaluación del papel de la melanina en *L. theobromae* frente a estrés abiótico

6.8.1. Lisis enzimática

Con el fin de obtener un extracto de enzimas hidrolíticas capaz de degradar la pared celular de hongos, la cepa de *T. asperellum* T. TORO, fue cultivada durante 10 días en MMV líquido. El cultivo se filtró mediante un filtro estéril (para jeringa) de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0.2 μm (VWR) y el extracto crudo obtenido se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para el ensayo, se preparó medio PDA con el extracto de enzimas hidrolíticas de *T. asperellum* al 30% v/v. Las cajas se inocularon con un disco micelial de 5 mm de diámetro de *L. theobromae*. También se realizaron ensayos con el uso de los inhibidores de melanina combinados con el extracto enzimático. Los cultivos se incubaron a $30\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 días y se evaluó la morfología de la colonia, el crecimiento micelial y la morfología de las hifas.

6.8.2. Estrés oxidativo

El crecimiento de *L. theobromae* en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se evaluó mediante una suspensión de esporas del hongo (1500 esporas aproximadamente) que se sembró por extensión en placa en medio PDA Difco con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno comercial (DERMOCLEEN^{MR}) a 0.5, 1.0, 2.5 y 3.0 y 5.0% v/v. Las cajas con los tratamientos se incubaron por 4 días a $30\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, se evaluó la morfología de la colonia, y se seleccionó la concentración en donde se observaron diferencias con respecto al control en PDA. Esta concentración se utilizó en los ensayos posteriores para evaluar el estrés oxidativo en presencia de inhibidores de melanina. Estos ensayos se llevaron a cabo usando un disco micelial del hongo. Los cultivos se incubaron a $30\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 días. Al final, se evaluó la morfología de la colonia e hifas, así como crecimiento micelial.

6.8.3. Radiación UV

La respuesta de la cepa *L. theobromae* a la radiación UV se evaluó a partir de esporas hialinas y pigmentadas utilizando un transiluminador UVP. Para lo cual, las esporas suspendidas en Tween al 0.5% v/v se pasaron a cajas de Petri de 13x30mm y se expusieron durante 20, 30, 40, 50 y 60 min a radiación UV de alta intensidad a 365 nm. Las suspensiones de esporas se mantuvieron en oscuridad y sembraron por extensión en placa aproximadamente 1500 esporas en medio PDA Difco. Las placas se incubaron a $30\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante 24 h y se analizó el tiempo de germinación de las esporas y las características morfológicas de los cultivos. También, se realizó un ensayo para evaluar la diferencia en el porcentaje de

germinación de las esporas hialinas y pigmentadas frente a la exposición a luz UV. Para esto, se inocularon 10 esporas de cada tipo, tomadas bajo el estereoscopio en placas de Petri en medio PDA. Las esporas fueron expuestas por 30 y 60 min a radiación UV con el uso del transiluminador UVP a alta intensidad e incubadas en oscuridad durante 24 h a 30 ± 2 °C. Se evaluó el porcentaje de germinación a las 24 y 48 h. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6.9. Microscopía de *L. theobromae* durante la colonización de plantas de vid

Para observar la colonización y la presencia de melanina en las hifas de *L. theobromae* en plantas infectadas, se utilizaron plantas de *Vitis vinifera* del cultivar Cabernet Sauvignon (Figura 5), en las cuales se generó una herida mecánica de 2 mm de diámetro en el tallo lignificado utilizando un taladro. El inóculo se obtuvo a partir de micelio de la cepa UCD256Ma en medio PDB de 3 días de crecimiento, el cual fue licuado, los fragmentos obtenidos se contaron con el uso de la cámara de Neubauer y se ajustaron a una concentración de alrededor de $2000 \text{ fragmentos} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Usando 10 μL de esta suspensión, se inocularon 10 plantas y las heridas fueron cubiertas con parafilm. De igual manera, otras 10 plantas se usaron como control para lo cual se inocularon solamente con medio PDB estéril. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento (CONVIRON PGR15) en las instalaciones de la Universidad de California, Riverside por 28 días con un ciclo de temperatura variando de 10-30-10 °C (noche-día-noche) a 50% de humedad. Pasado el tiempo correspondiente, se tomaron muestras del tallo en la zona de infección de aproximadamente 2 cm (1 cm por arriba del punto de infección, y 1 cm por debajo de este). La lesión se observó bajo un estereoscopio (Leica LED5000) y el tejido se fijó en solución FAA (formaldehído, alcohol etílico, acético 10%:50%:5%). Posteriormente los tallos se deshidrataron en soluciones de etanol (25, 50, 80% v/v) y fueron conservados en etanol al 80% a 4°C hasta su análisis. Las muestras fueron cortadas en secciones transversales y longitudinales de 70 μm de grosor con el uso de un micrótopo (EMS 5000 Oscillating Tissue Slicer). Para realizar la microscopía, las muestras se rehidrataron mediante recambio en soluciones de etanol de 50% a 25% y luego a agua.

Para evaluar la colonización de *L. theobromae* en el sistema vascular de la planta se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM; Hitachi TM-1000 Tabletop Microscope). Se evaluaron cortes longitudinales que fueron sometidos a un secado de punto crítico y se montaron sobre un botón para SEM con cinta adhesiva de carbono de doble cara.

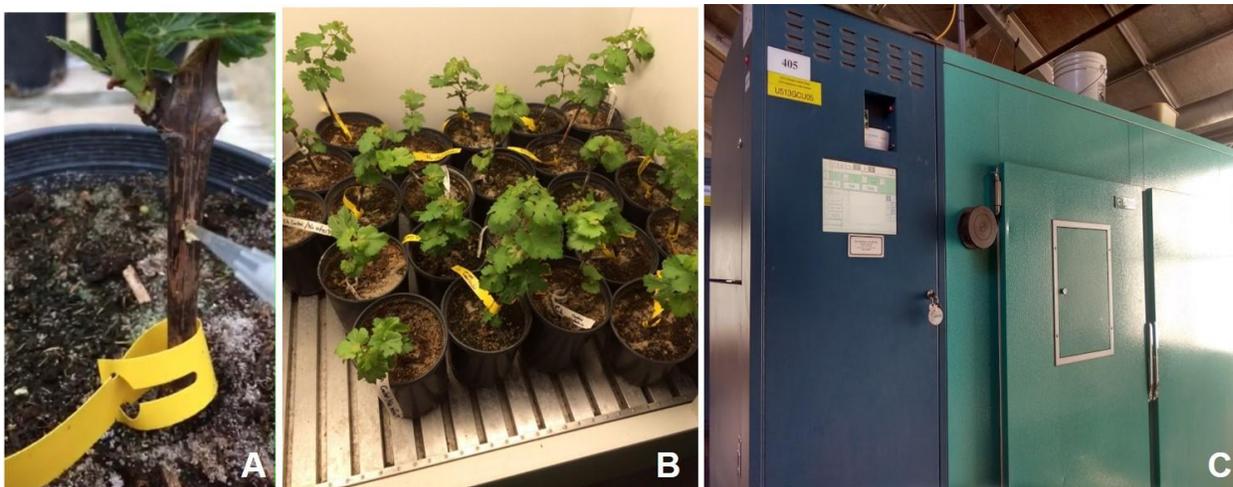


Figura 5. Plantas de Cabernet Sauvignon utilizadas. A) Inoculación del tejido leñoso, B) plantas dentro de la cámara de crecimiento, C) cámara de crecimiento CONVIRON PGR15.

Por otro lado, la presencia de melanina en las hifas de *L. theobromae* durante la colonización de las plantas de vid se analizó utilizando la tinción Masson-Fontana (modificada de Lillie, 1965) (Anexo II) y microscopía de luz (Leica Microsystems DM4000). Esta tinción se basa en la habilidad de la melanina para reducir la solución de nitrato de plata amoniacal a plata metálica sin usar un agente reductor externo (Lillie, 1965).

Capítulo III.

7. Resultados

7.1. Pigmentación de esporas en picnidios

La observación de picnidios usando el microscopio estereoscópico permitió la visualización de cirros formados por esporas hialinas y pigmentadas (Figura 6). En el interior de los picnidios se encontraron sólo esporas hialinas y se observó que las esporas en los cirros comenzaron a pigmentarse de abajo hacia arriba.

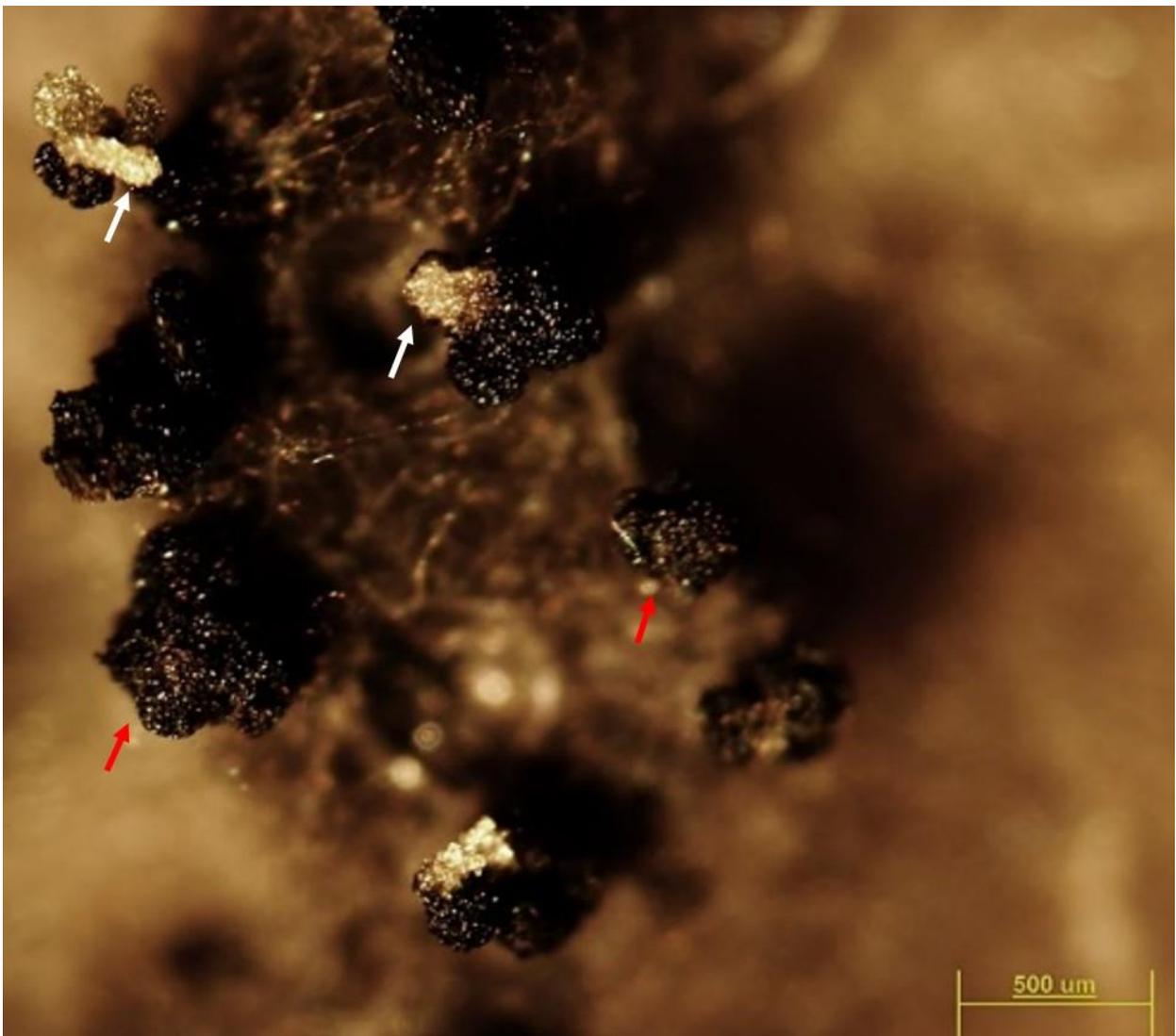


Figura 6. Picnidio de UCD256Ma con presencia de cirros (90X). Las flechas blancas indican las esporas hialinas en las puntas de los cirros (cadenas de esporas), y las flechas rojas indican las esporas pigmentadas.

Se observaron esporas en tres diferentes estados de maduración: hialinas sin septo (Figura 7A), pigmentadas con septo (Figura 7B) y un estado intermedio (Figura 7C), las cuales están tabicadas pero no completamente pigmentadas. El tamaño de las esporas se presenta en la Tabla 3.

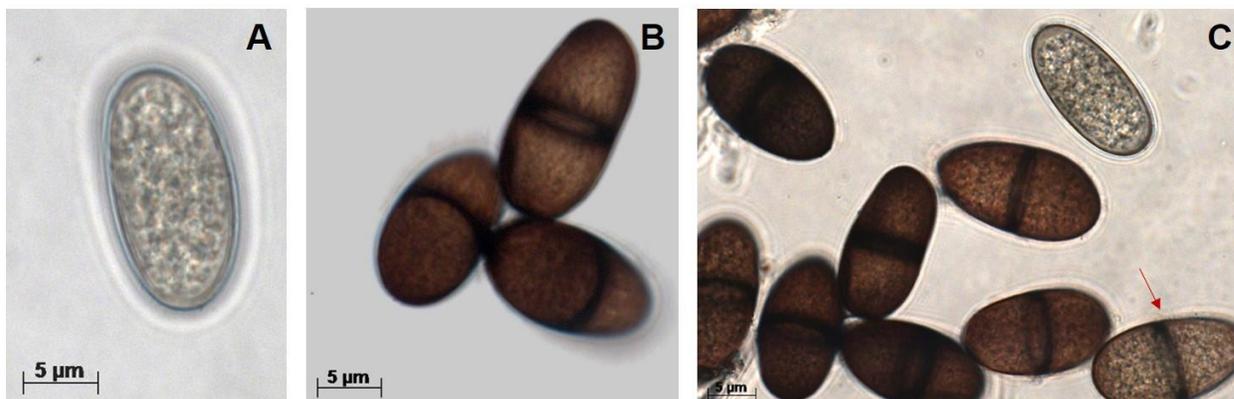


Figura 7. Morfología de esporas de UCD256Ma en diferentes estados de maduración. A) Espora hialina aseptada, B) esporas pigmentadas septadas, C) esporas hialinas y pigmentadas. La flecha roja indica una espora en estado intermedio) (100X).

Tabla 3. Tamaño de las esporas de la cepa UCD256Ma

Tipo espora	Tamaño espora (μm) ¹	Media \pm DS
Hialinas	11.54–19.29 x 7.87–10.28	16.02 \pm 2.5 x 8.5 \pm 0.92
Intermedias	15.06–17.45 x 7.42–8.6	16.34 \pm 0.74 x 8.19 \pm 0.44
Pigmentadas	13.26–17.71 x 7.15–9.18	15.63 \pm 1.54 x 8.31 \pm 0.5

¹El tamaño de la espora corresponde al rango entre la medida mínima y máxima de longitud y ancho registrado.

7.2. Crecimiento y morfología micelial de *L. theobromae* frente a diferentes inhibidores de melanina

La utilización de diferentes concentraciones de ácido kójico, inhibidor de DOPA-melanina, no mostró un efecto inhibitorio en la pigmentación de la colonia ni en el crecimiento del hongo en concentraciones de hasta 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, por lo que se descartó como inhibidor de DOPA-melanina en *L. theobromae*.

A diferencia del ácido kójico, con el uso de *tropolone* se observó una disminución de la pigmentación y crecimiento a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; y se observó además la inhibición de la formación de micelio aéreo, y la formación de exudados sobre la colonia a 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 8B). Esta concentración fue elegida para ensayos posteriores, ya que a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se inhibió completamente el crecimiento del hongo (Tabla 4).

Por otro lado, al inhibir la DHN-melanina con *phthalide* como inhibidor de DHN-melanina se vio una menor pigmentación de la colonia a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que se observó un cambio en la morfología y

pigmentación del hongo con respecto al control en PDA Difco (Figura 8C) y una inhibición marcada en el crecimiento a $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 9). En cuanto al triciclazol, se observó un cambio en la pigmentación del micelio a $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, pero no en la morfología del hongo; se mostró una coloración naranja-marrón e inhibición del crecimiento (Figura 8D) con el uso de $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, y este efecto se mantuvo hasta $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Al combinar los inhibidores *phthalide* $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y *tropolone* $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se observó menor formación de micelio aéreo, una menor coloración de la colonia, presencia de exudados sobre esta (Figura 8F) e inhibición del crecimiento (Figura 9). Con base en este resultado, se seleccionaron los inhibidores *tropolone* y *phthalide* para ensayos posteriores como inhibidores de DOPA-melanina y DHN-melanina, respectivamente.

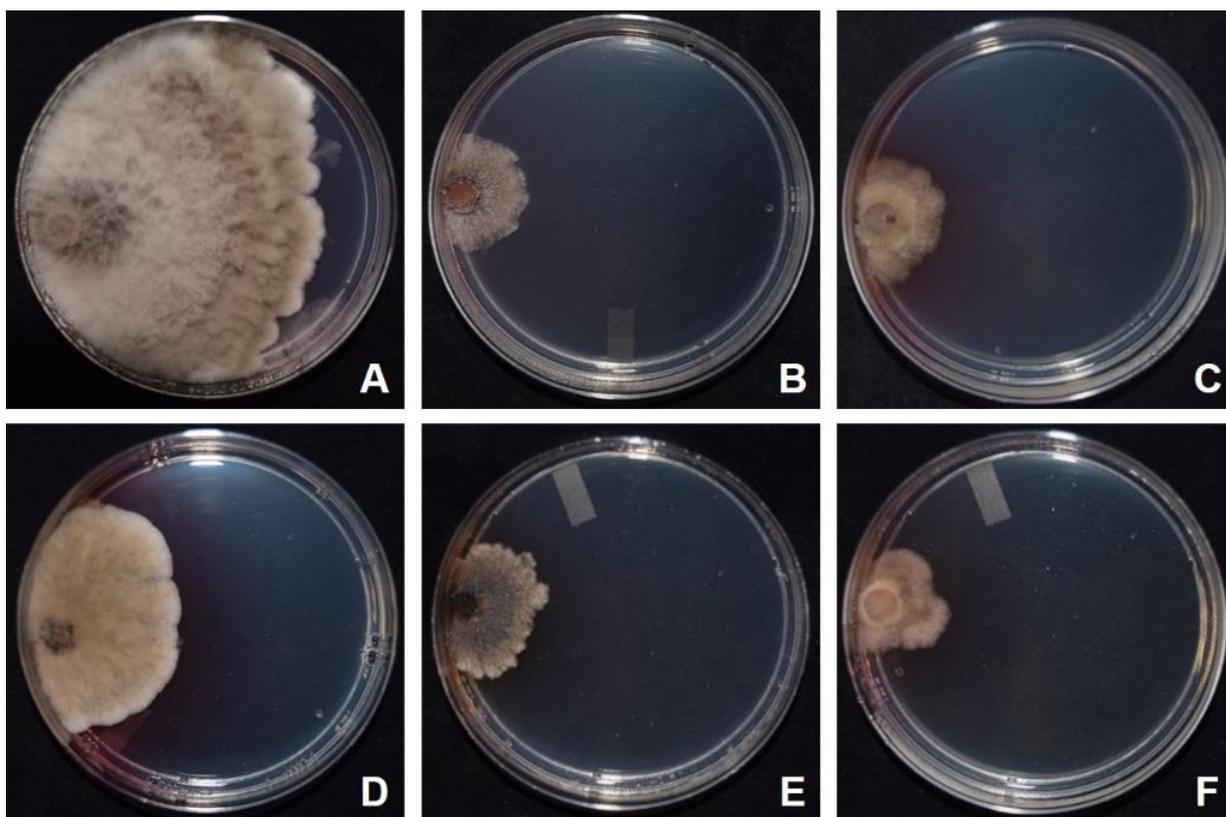


Figura 8. Morfología del crecimiento de UCD256Ma en presencia de inhibidores de DOPA-melanina y DHN-melanina. A) PDA (control), B) PDA + Tp $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. C) PDA + Ph $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. D) PDA + Tz $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. E) PDA + Tp $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Tz $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. F) PDA + Tp $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Ph $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ph: *phthalide*, Tz: triciclazol, Tp: *tropolone*.

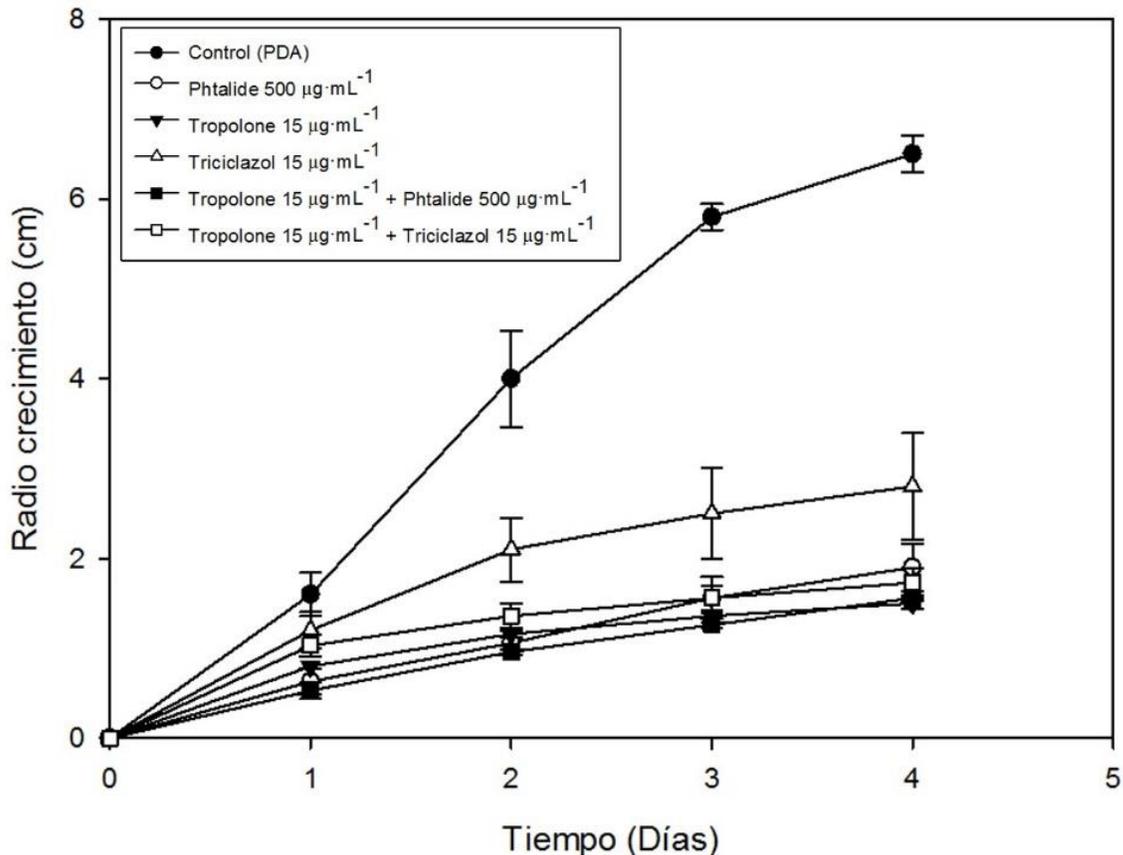


Figura 9. Crecimiento de UCD256Ma en presencia de inhibidores de DOPA-melanina y DHN-melanina. El radio de crecimiento se midió durante 4 días en cajas de Petri a 30 ± 2 °C. Las barras indican la desviación estándar de cada tratamiento.

Por otra parte, la inhibición de piomelanina con *nitisinone* mostró una reducción en el crecimiento, pero no de la pigmentación de la colonia a $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del compuesto; mientras que con el uso de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se observó una menor coloración, con respecto al control, así como inhibición del crecimiento (Figura 10B). De igual manera, el crecimiento, la coloración y la formación de micelio aéreo se vieron afectados con el uso de *nitisinone* $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y *tropolone* $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

La combinación de los tres tipos de inhibidores produjo la mayor inhibición de crecimiento, la formación de micelio aéreo y un cambio en la coloración de la colonia en comparación al control (Figura 10G y 11). También, con el uso de los tres inhibidores *tropolone*, *phtalide* y *nitisinone* se observaron hifas estresadas y con un patrón de crecimiento diferente con respecto al control, ya que principalmente se encontraron hifas más lineales (Figura 12). Por otro lado, a pesar de que el uso de *nitisinone* no inhibió el crecimiento del hongo de la misma manera que los otros inhibidores (*tropolone* y *phtalide*), el diámetro de las hifas fue menor con el uso del *nitisinone* solo y en combinación con *phtalide* y *tropolone* (Figura 13).

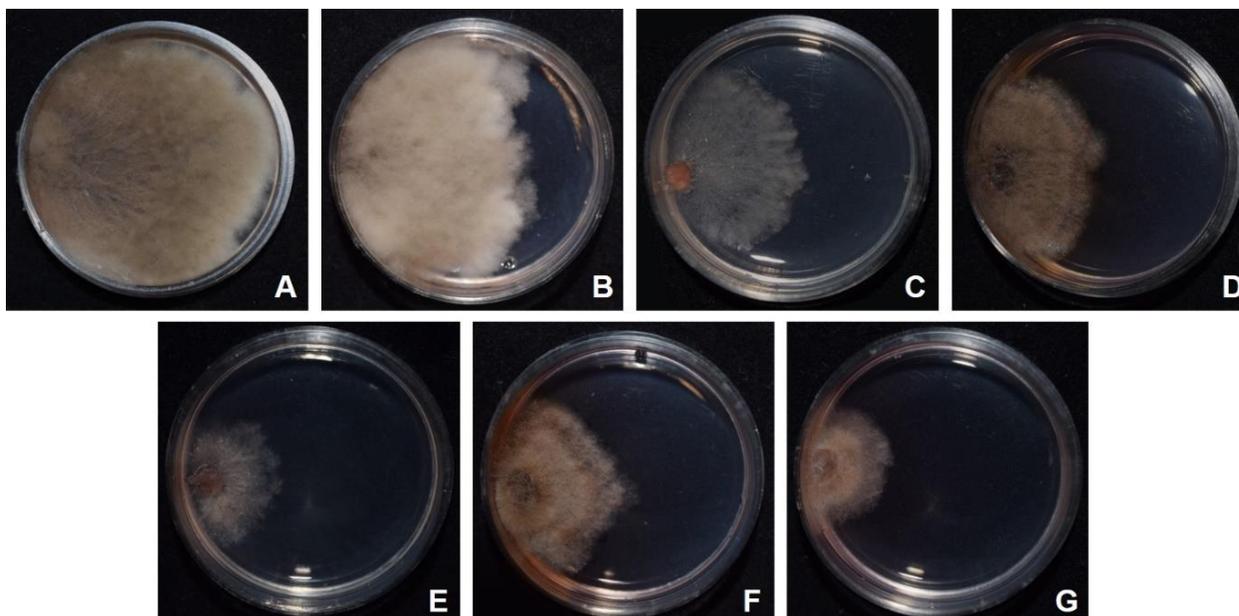


Figura 10. Morfología del crecimiento de UCD256Ma en presencia de inhibidores de DOPA-melanina, DHN-melanina y piomelanina. A) PDA (control), B) PDA + NTBC 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, C) PDA + Tp 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, D) PDA + Ph 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, E) PDA + NTBC 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Tp 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, F) PDA + NTBC 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Ph 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, G) PDA + NTBC 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Tp 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Ph 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ph: *phthalide*, Tp: *tropolone*, NTBC: *nitisinone*.

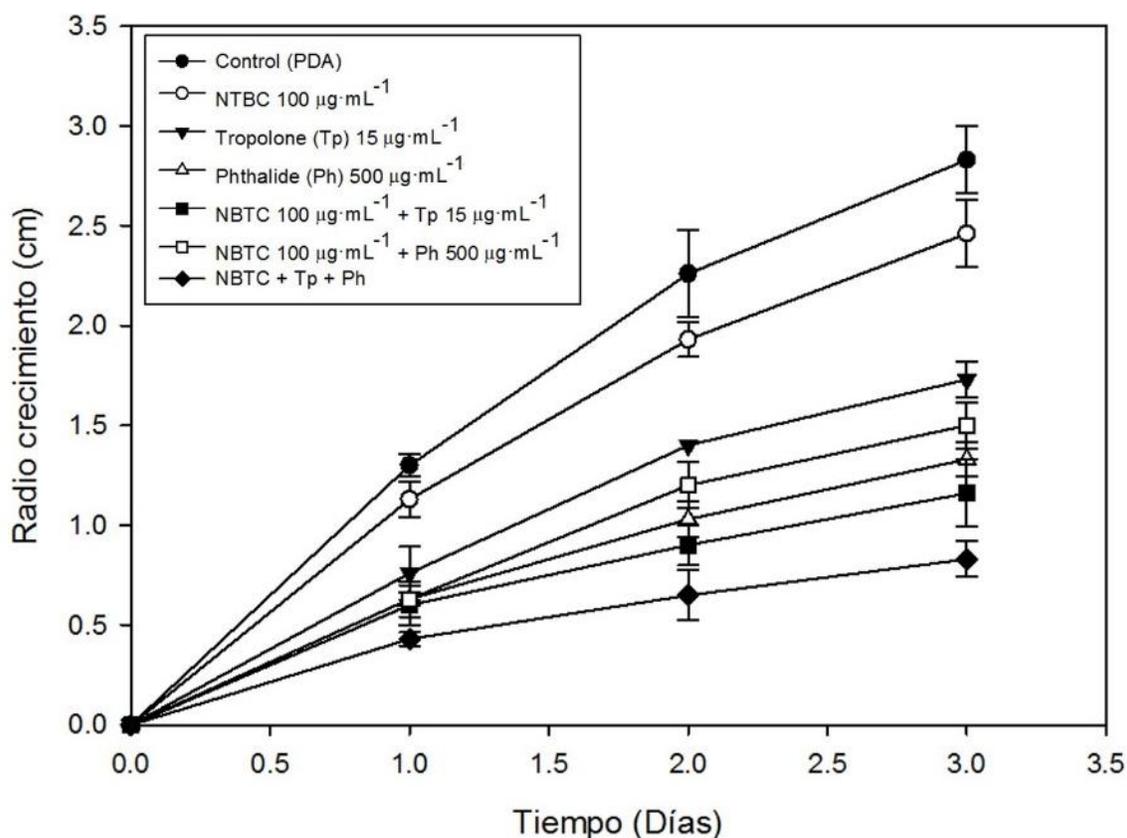


Figura 11. Crecimiento de UCD256Ma en presencia de inhibidores de piomelanina, DOPA-melanina y DHN-melanina. El radio de crecimiento se midió durante 3 días en cajas de Petri a 30 ± 2 °C. Las barras indican la desviación estándar de cada tratamiento.

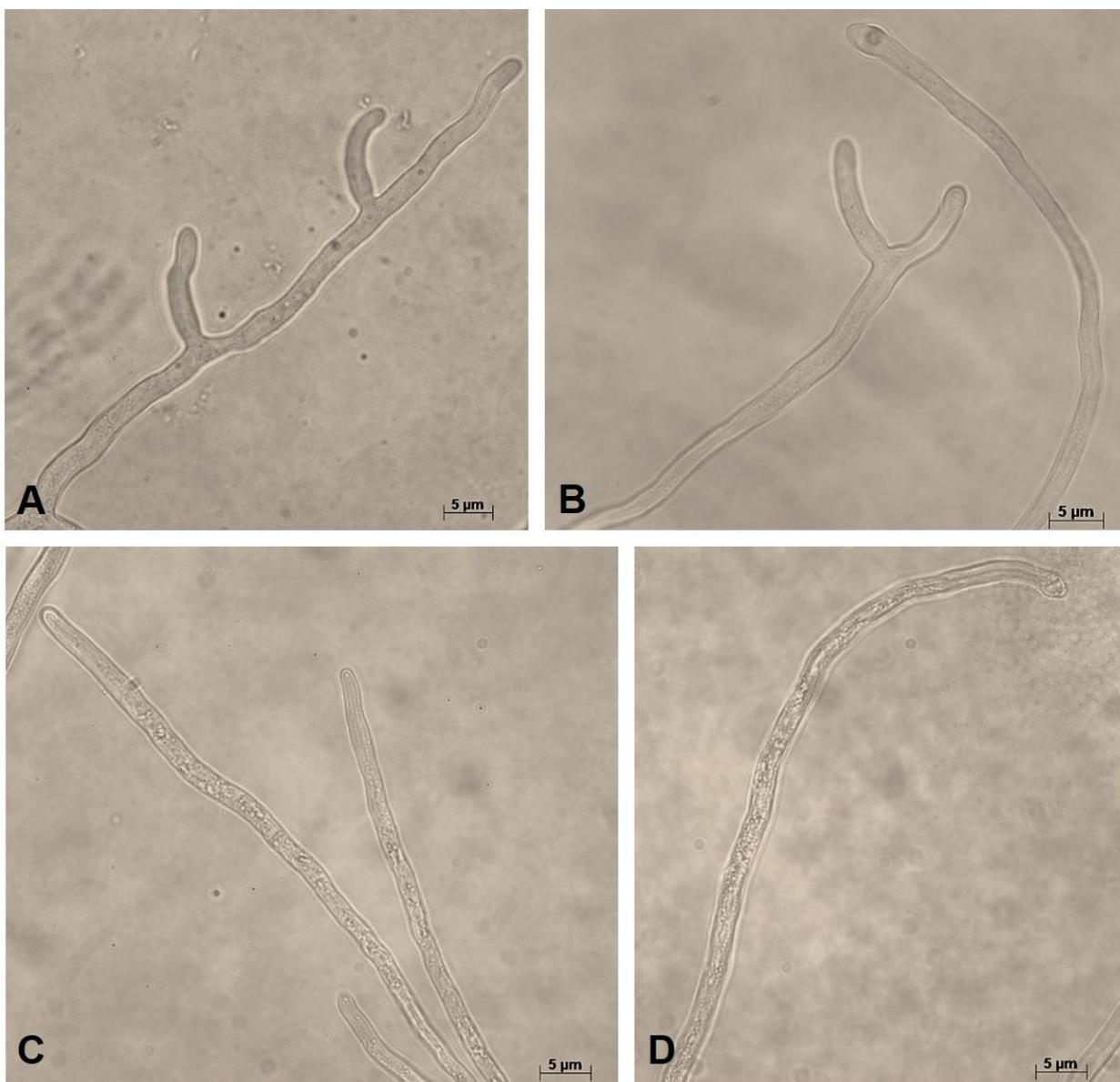


Figura 12. Desarrollo de las hifas de UCD256 en presencia de inhibidores de melanina. A) Control (PDA), B) PDA + Tz 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Tp 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, C) PDA + Ph 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + NTBC 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, D) PDA + NTBC 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Tp 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Ph 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ph: *phthalide*, Tz: *triciclazol*, Tp: *tropolone*, NTBC: *nitisinone*.

Tabla 4. Efecto de los inhibidores de melanina sobre el crecimiento de *L. theobromae*

Tipo de melanina	Inhibidor	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Observaciones
DOPA	Tropolone	5	Sin efecto
		10	Retraso en pigmentación, coloración beige, menor producción de micelio aéreo, inhibición de crecimiento
		15	Pigmentación beige, menor producción de micelio aéreo, inhibición de crecimiento
		20	Inhibición crecimiento
	Ácido kójico	5	Sin efecto
		10	Sin efecto
		15	Sin efecto
		20	Sin efecto
		30	Sin efecto
		100	Inhibición crecimiento/menor pigmentación
		250	Inhibición crecimiento/menor pigmentación
		500	Inhibición crecimiento/menor pigmentación
	DHN	Phthalide	5
10			Sin efecto
15			Sin efecto
20			Sin efecto
30			Sin efecto
100			Inhibición de crecimiento/menor pigmentación
200			Inhibición de crecimiento/menor pigmentación
400			Inhibición de crecimiento/menor pigmentación
500			Inhibición de crecimiento/coloración naranja-marrón
Triciclazol		5	Sin efecto
		10	Cambio en la pigmentación
		15	Coloración naranja-marrón, menor producción de micelio aéreo, inhibición de crecimiento
		20	Coloración naranja-marrón, menor producción de micelio aéreo, inhibición de crecimiento
		30	Coloración naranja-marrón, menor producción de micelio aéreo, inhibición de crecimiento
Piomelanina	Nitisinone	5	Sin efecto
		10	Sin efecto
		15	Sin efecto
		30	Inhibición crecimiento
		50	Inhibición crecimiento/menor pigmentación
		100	Inhibición crecimiento/menor pigmentación (cambio)
		200	Inhibición crecimiento/menor pigmentación

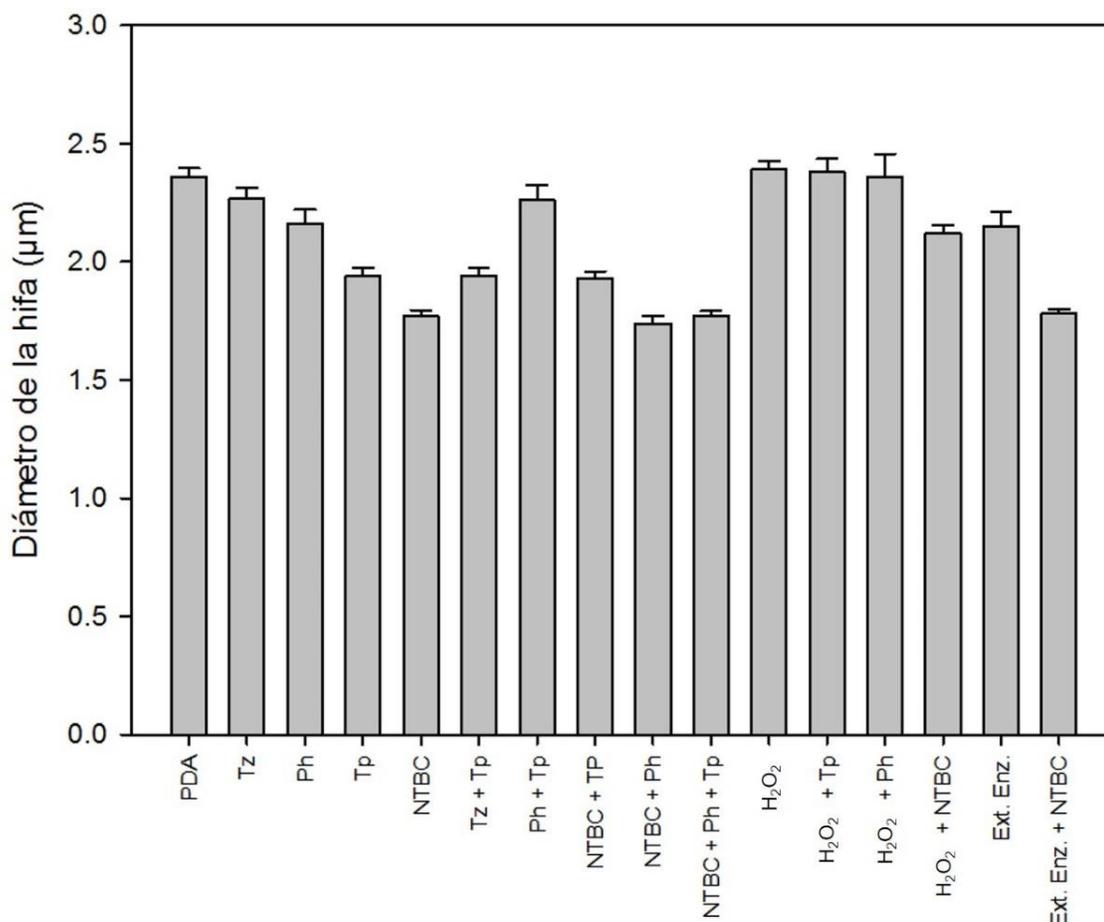


Figura 13. Diámetro de las hifas de *L. theobromae* UCD256Ma en presencia de inhibidores de melanina y condiciones de estrés oxidativo y lisis enzimática. Las barras de error indican la desviación estándar de cada tratamiento.

7.3. Efecto del *tropolone* en hongos con micelio hialino

No se observaron diferencias entre los tratamientos con el inhibidor y el control de *F. oxysporum* y *T. asperellum* en cuanto a la formación de micelio aéreo, el tamaño de la colonia. En el caso de *T. asperellum* tampoco se vio afectada la producción de esporas (Figura 14); por lo que, la inhibición del crecimiento por el uso de *tropolone* en *L. theobromae* se puede atribuir a la inhibición de la síntesis de DOPA-melanina.

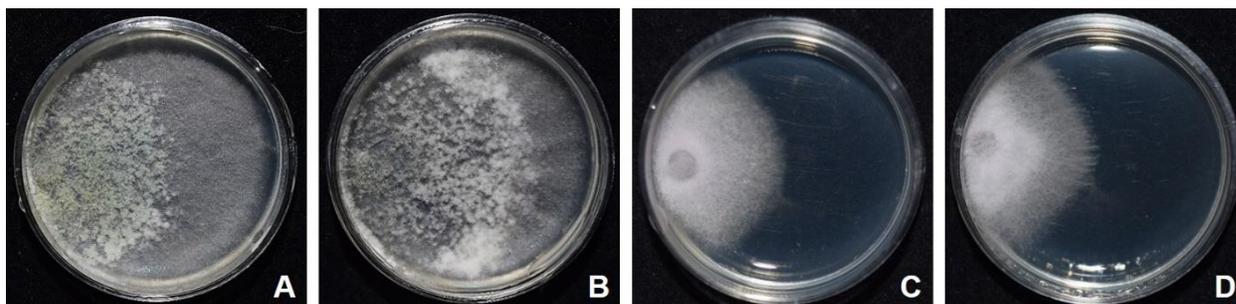


Figura 14. Efecto de *tropolone* en el crecimiento de *T. asperellum* A) PDA (control), B) PDA + Tp 15 µg·mL⁻¹, y *F. oxysporum* C) PDA (control) D) PDA + Tp 15 µg·mL⁻¹. Tp: *tropolone*.

7.4. Utilización de tirosina como fuente de carbono y nitrógeno en *L. theobromae*

La presencia de tirosina 10 mM en el medio MM9 indujo el crecimiento del hongo en comparación con el control en MM9 (Figura 15D). En los ensayos con tirosina en los medios MM9-C y MM9-CN, se observó formación de micelio aéreo y pigmentación de las hifas, así como un halo de degradación (Figura 15E y 15F), lo cual indica que el hongo puede catabolizar la tirosina, proveyéndolo de carbono y nitrógeno. Los controles en los medios MM9-C y MM9-CN aunque se presentaron crecimiento, el micelio de las colonias fue raquíptico (Figura 15 B y 15C).

Los tratamientos sin fuente de carbono y nitrógeno presentaron hifas con un patrón de ramificación modificado y morfología diferente con respecto al control en MM9. Por el contrario, en los tratamientos con tirosina, aunque se observaron hifas vacuolizadas, la morfología no se vio afectada (Figura 16). En cuanto al tamaño de las hifas, con el uso de tirosina como fuente de carbono y nitrógeno el diámetro fue mayor que en el control de MM9-CN (Figura 17).

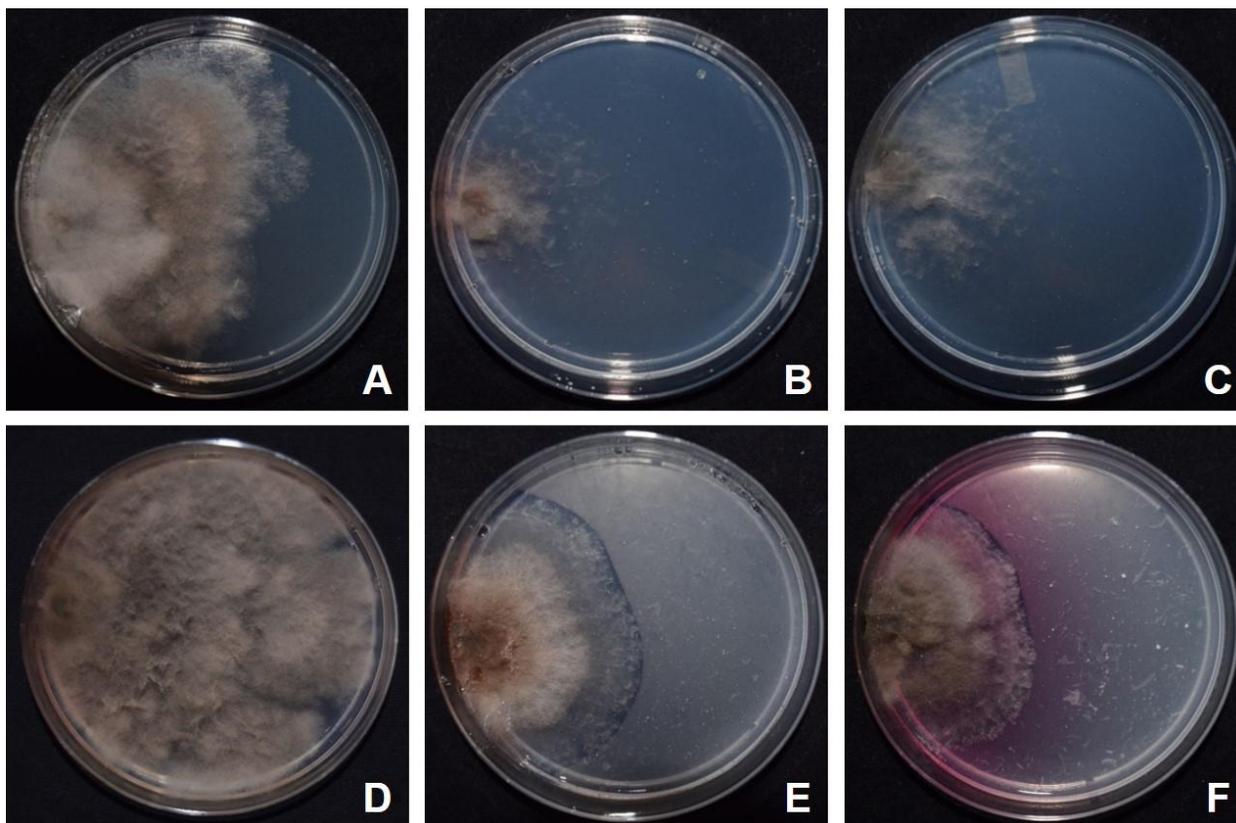


Figura 15. Uso de tirosina en el crecimiento de UCD256Ma. A) MM9 (control), B) MM9-C, C) MM9-CN, D) MM9-C + Tyr 10mM, E) MM9-CN + Tyr 10 mM. Tyr: tirosina.

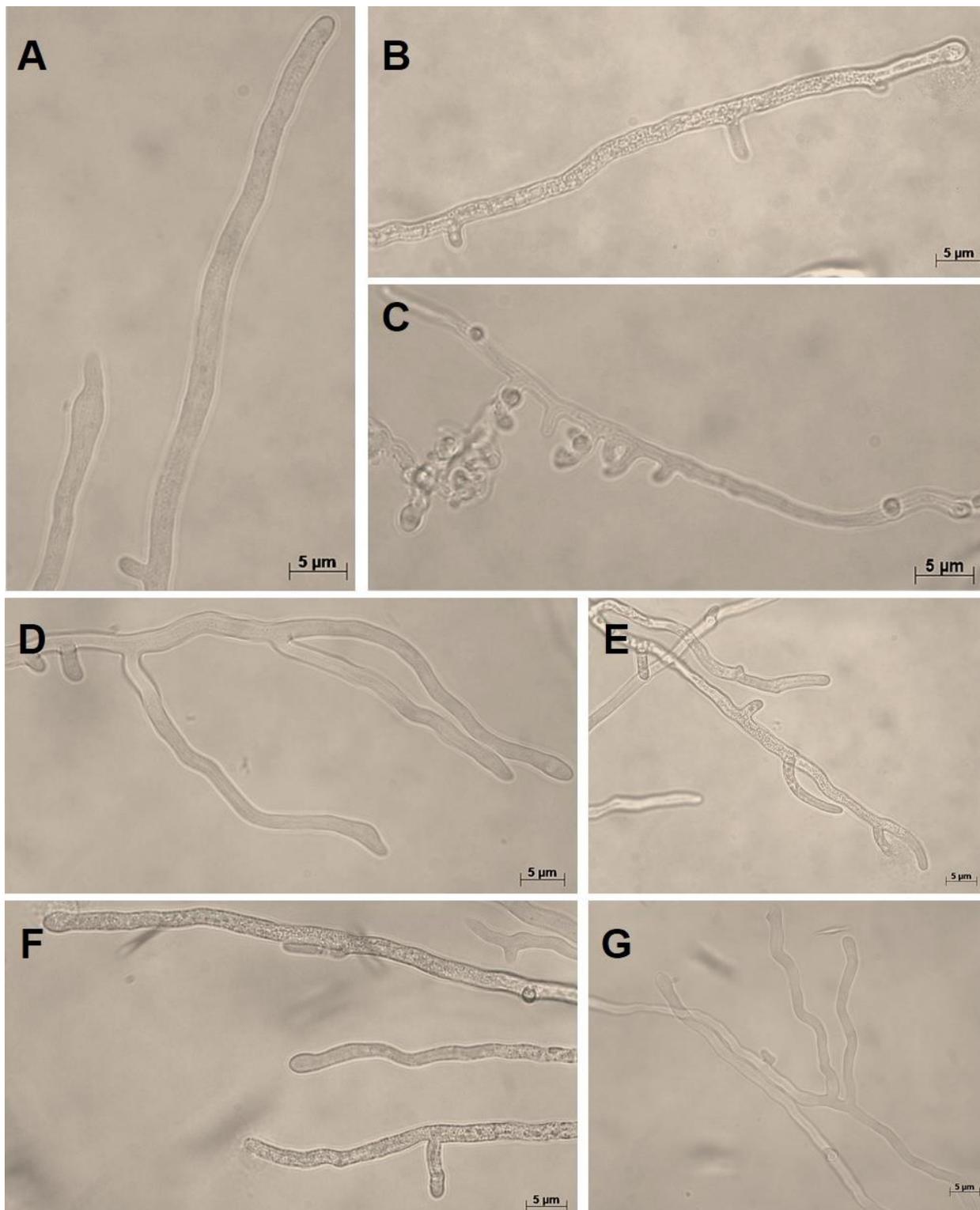


Figura 16. Desarrollo de las hifas de UCD256 en presencia de tirosina como fuente de nutrientes. A) MM9 (control), B) MM9-C, C) MM9-CN, D y E) MM9-C +Tyr 10 mM, G y F) MM9-CN + Tyr 10 mM. Tyr: tirosina.

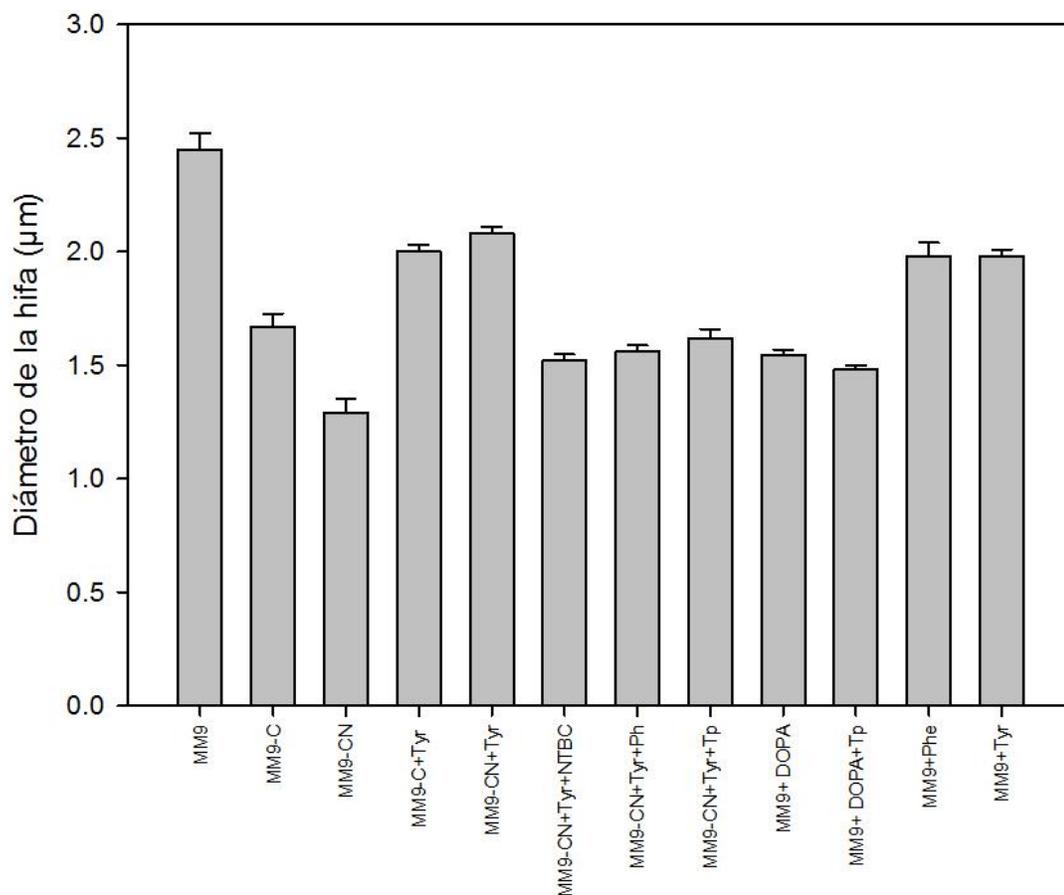


Figura 17. Diámetro de la hifa de *L. theobromae* UCD256Ma en los diferentes tratamientos con tirosina, DL-DOPA, fenilalanina y en presencia de inhibidores de melanina. Las barras indican la desviación estándar de cada tratamiento.

Por otro lado, se observó que el hongo no tuvo la capacidad de utilizar la tirosina en presencia de *tropolone* y su crecimiento se vio disminuido (Figura 18E). Con la combinación de los inhibidores para los tres tipos de melanina en el medio MM9-CN con tirosina 10mM el hongo no presentó crecimiento (Figura 18G y 19).

Con el uso de *phthalide* se observaron hifas con un patrón de ramificación diferente, ya que presentaron mayor número de ramificaciones, aunque éstas fueron cortas y seguidas en una misma hifa (Figura 20); mientras que con *tropolone* las hifas presentaron menos ramificaciones con respecto al control. En general, la presencia de los inhibidores de melanina en los tratamientos con tirosina, causó que las hifas fueran más delgadas con respecto al control en MM9 y a los tratamientos en los medios MM9-C y MM9-CN más tirosina (Figura 17).

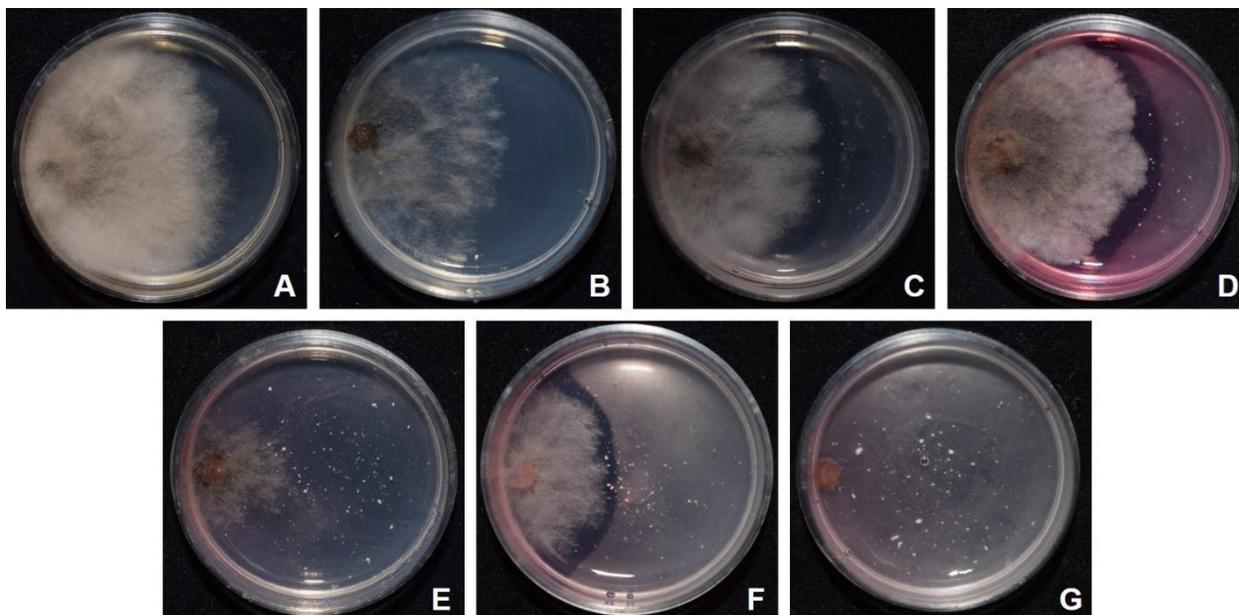


Figura 18. Crecimiento de UCD256Ma en medio en presencia de tirosina e inhibidores de melanina. A) MM9 (control), B) MM9-CN, C) MM9-CN + Tyr 10 mM, D) MM9-CN + Tyr 10 mM + NTBC 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, E) MM9-CN + Tyr 10 mM + Tp 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, F) MM9-CN + Tyr 10 mM + Ph 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, G) MM9-CN + Tyr 10 mM + NTBC 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Tp 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ + Ph 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Tyr: tirosina, Ph: *phthalide*, Tp: *tropolone*, NTBC: *nitisinone*.

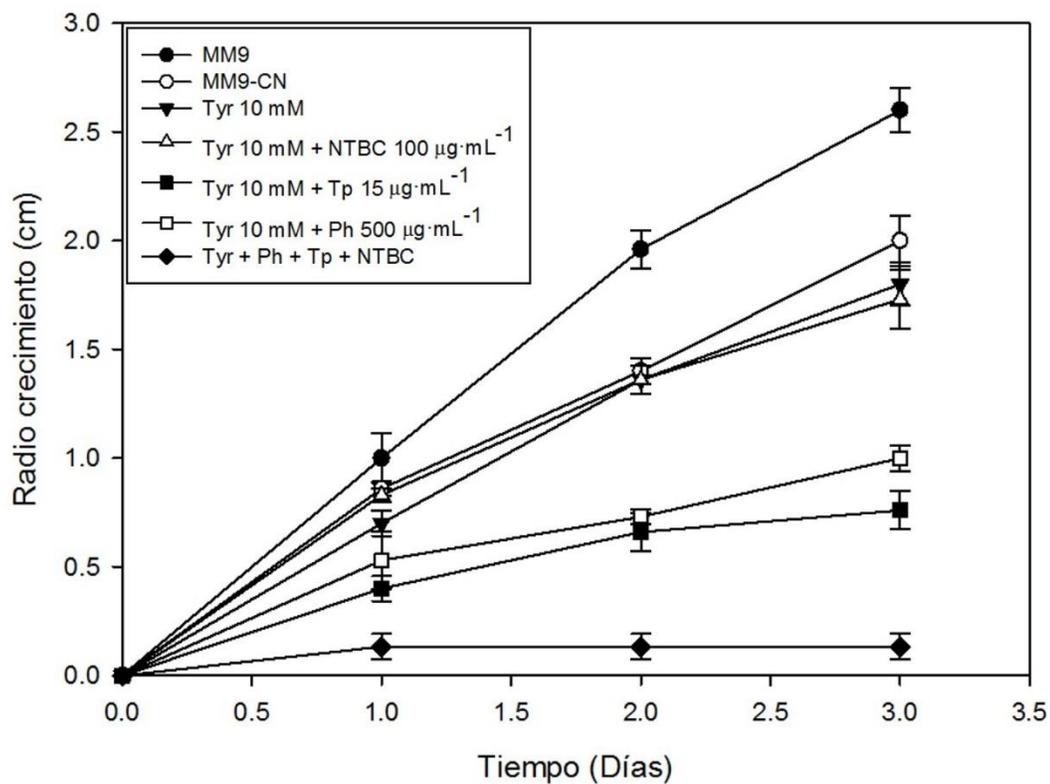


Figura 19. Crecimiento de UCD256Ma con tirosina como fuente de carbono y nitrógeno en presencia de diferentes inhibidores de melanina. El radio de crecimiento se midió durante 3 días en cajas de 30x10mm a 30 ± 2 °C. Las barras indican la desviación estándar de cada tratamiento.

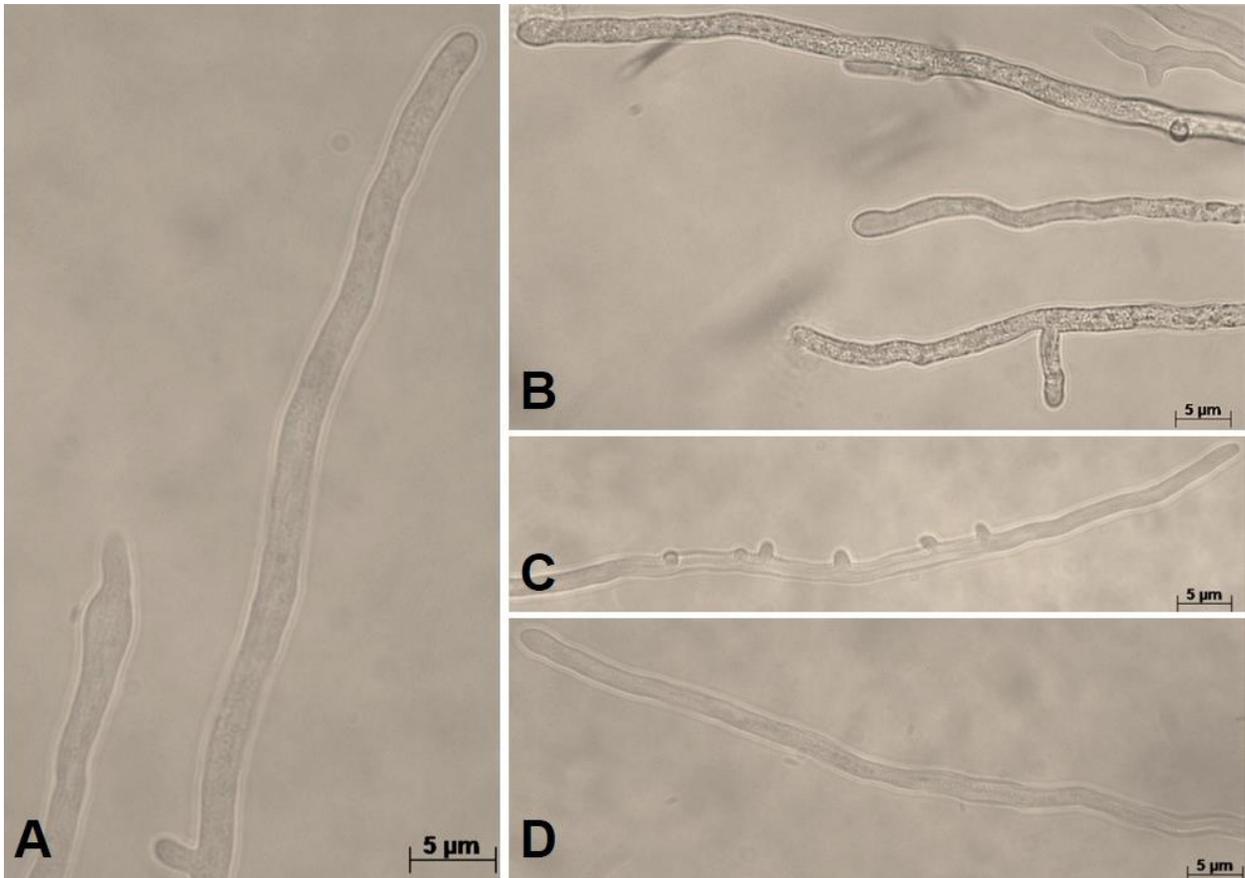


Figura 20. Desarrollo de las hifas de UCD256 en presencia de tirosina como fuente de nutrientes e inhibidores de melanina. A) MM9 (control), B) MM9-CN + Tyr 10 mM + Ph 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y C) MM9-CN + Tyr 10 mM + Tp 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Tyr: tirosina, Ph: *phthalide*, Tp: *tropolone*, NTBC: *nitisinone*.

7.5. Utilización de la utilización de DL-DOPA y fenilalanina como precursores de melanina

El uso de DL-DOPA 1 mM mostró un crecimiento en el hongo similar al control, aunque se observó un micelio menos denso (Figura 21B y 22), el medio se tornó de un color beige a gris oscuro, lo cual podría deberse a la oxidación del compuesto DL-DOPA, ya que este compuesto tiende a oxidarse rápidamente en presencia de luz y aire, lo cual lo vuelve oscuro (Stroomeer *et al.*, 1990).

El micelio de *L. theobromae* fue raquítico cuando se utilizó DL-DOPA en los medios MM9-C y MM9-CN. La combinación de DL-DOPA y *tropolone* inhibió la formación de micelio aéreo y el crecimiento del hongo, y la coloración del micelio se tornó a marrón (Figura 21D). Las hifas en los tratamientos con DL-DOPA y con *tropolone* fueron más delgadas que las hifas del tratamiento control (Figura 17).

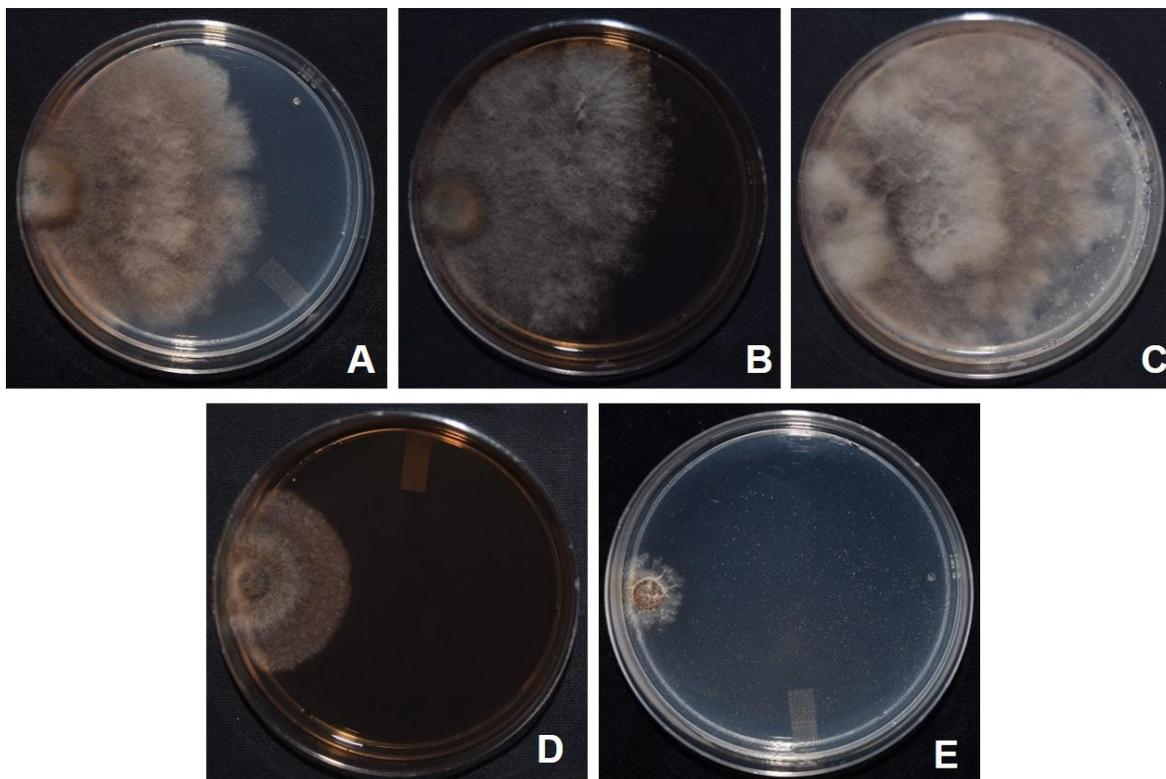


Figura 21. Crecimiento de UCD256Ma en MM9 con diferentes precursores de melanina. A) MM9 (control), B) MM9 + DL-DOPA 1 mM, C) MM9 + Phe 5mM, D) MM9 + DL-DOPA 1 mM + Tp 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, E) MM9 + Phe 5mM + Tp 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. DL-DOPA: DL-dihidroxifenilalanina, Phe: fenilalanina, Tp: *tropolone*.

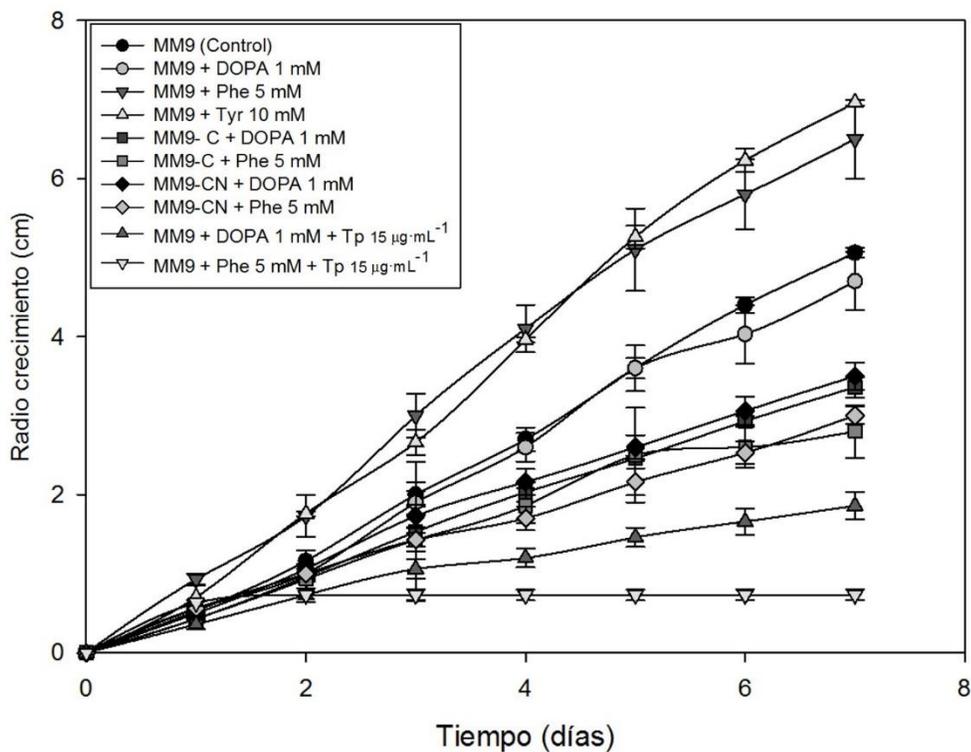


Figura 22. Crecimiento de UCD256Ma en MM9 con DL-DOPA, fenilalanina e inhibidores de melanina. El radio de crecimiento se midió durante 7 días en cajas de Petri a 30 ± 2 °C. Las barras indican la desviación estándar de cada tratamiento.

Por otra parte, se indujo el crecimiento de *L. theobromae* con el uso de fenilalanina 5 mM en el medio MM9 con respecto al control (Figura 21C). Sin embargo, al utilizarla en el medio MM9-C y MM9-CN el hongo mostró menor crecimiento que en el medio MM9 con fenilalanina (Figura 22) y el micelio fue raquítico. Con el uso de fenilalanina 5 mM y *tropolone*, se inhibió totalmente el crecimiento del hongo (Figura 21E). También se observó que en el tratamiento con fenilalanina el diámetro de las hifas fue mayor que con el uso de DL-DOPA en el medio (Figura 17).

7.6. La melanina en la resistencia a lisis enzimática

El extracto enzimático inhibió el crecimiento del hongo, pero ni la coloración ni la formación de micelio aéreo se vio afectada (Figura 23B y 24), y en las microscopías no se observaron hifas estresadas, es decir, vacuolizadas o con daños en la pared celular (Figura 25) y el diámetro de las hifas fue similar a las de control (Figura 13).

En la evaluación de la presencia de inhibidores y el extracto enzimático, el uso de *tropolone* $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 23C y 24) inhibió completamente el crecimiento del hongo; el *phthalide* $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 23D) inhibió el crecimiento de *L. theobromae* y se observó un cambio en la pigmentación de la colonia; mientras que el nitisinone $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no afectó el crecimiento del hongo en comparación con el uso únicamente del extracto enzimático de *T. asperellum* (Figura 26C), además que las hifas tuvieron un diámetro menor con respecto al control y al tratamiento con el uso de únicamente el extracto de enzimas hidrolíticas (Figura 13).

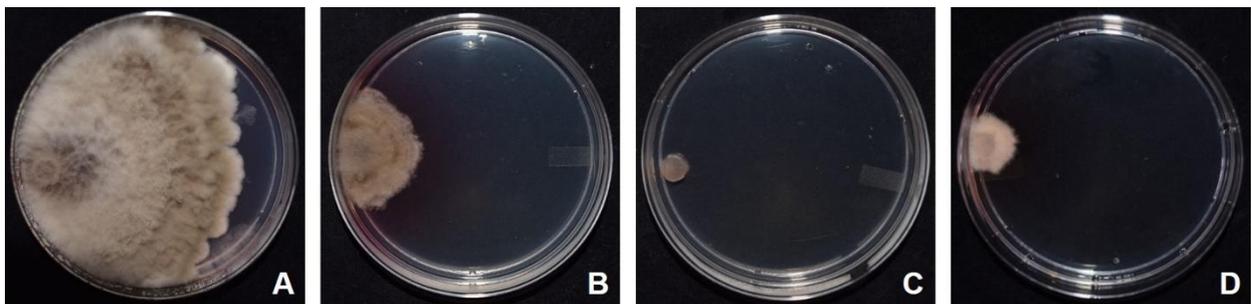


Figura 23. Crecimiento de UCD256Ma en presencia del extracto enzimático (EE) de *T. asperellum* al 30%: A) PDA (control), B) PDA + EE 30%, C) PDA + EE 30% + Tp $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, D) PDA + EE 30% + Ph $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Tp: *tropolone* Ph: *phthalide*.

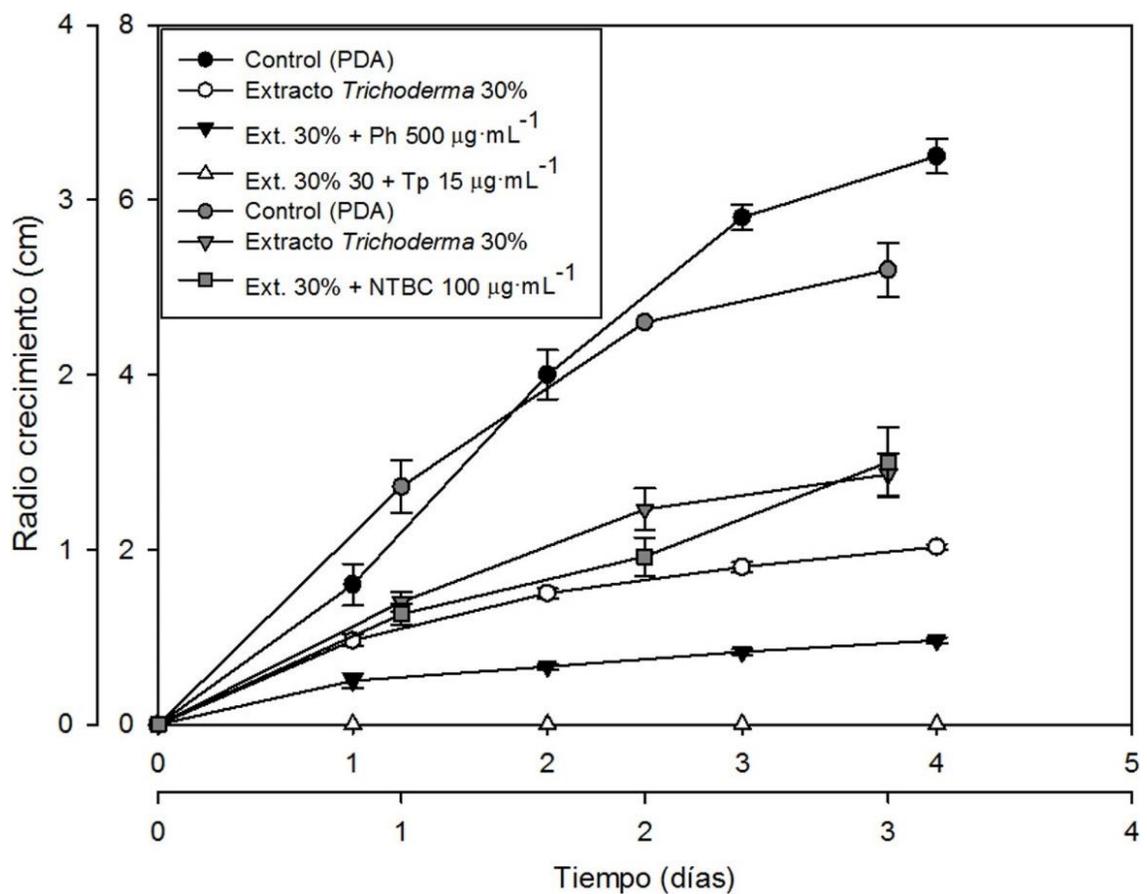


Figura 24. Crecimiento de UCD256Ma bajo lisis enzimática en presencia del extracto de *T. asperellum* 30% e inhibidores de melanina. El radio de crecimiento para inhibidores de DOPA-melanina y DHN-melanina se midió durante 4 días y para el inhibidor de piomelanina durante 3 días en cajas de Petri a 30 ± 2 °C. Las barras indican la desviación estándar de cada tratamiento.

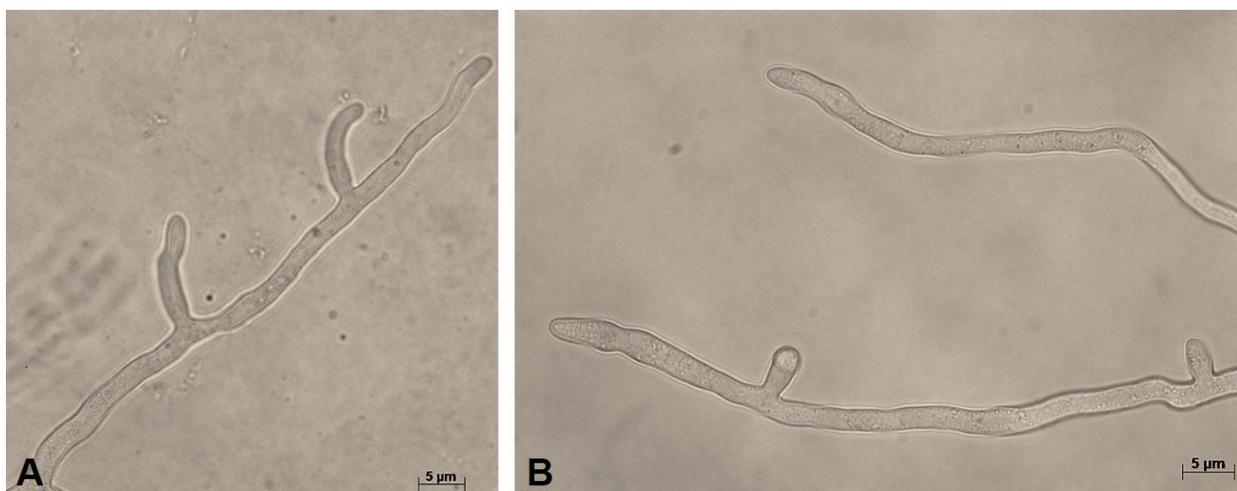


Figura 25. Desarrollo de las hifas de UCD256Ma en presencia del extracto enzimático (EE) de *T. asperellum*. A) PDA (control), B) PDA + EE 30%.

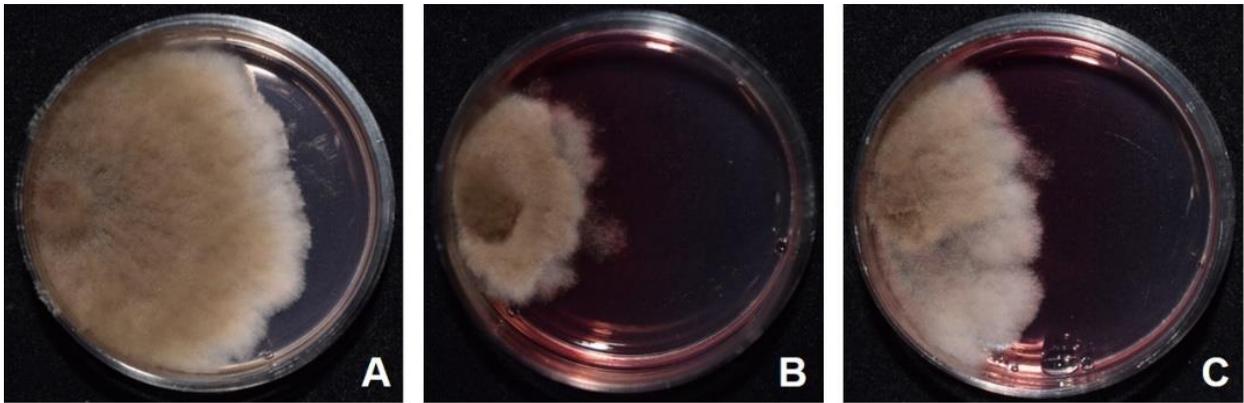


Figura 26. Crecimiento de UCD256Ma en presencia del extracto enzimático (EE) de *T. asperellum* al 30% y el inhibidor de piomelanina. A) PDA (control), B) PDA + EE 30%, C) PDA + EE 30% + NTBC 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. NTBC: *nitisinone*.

7.7. La melanina en la resistencia a estrés oxidativo

Las exposiciones a peróxido de hidrógeno en concentraciones de 0.5-2.5% no mostraron inhibición en el crecimiento de *L. theobromae* o un cambio en la morfología. Sin embargo, el uso de 5% de peróxido de hidrógeno (Figura 26B y 29) inhibió el crecimiento de la colonia pero no afectó su coloración.

Se observó una disminución de la tolerancia del hongo a las condiciones de estrés oxidativo al emplear *phthalide* 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y *tropolone* 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, como lo indica la inhibición del crecimiento de *L. theobromae* con respecto al control en PDA y al tratamiento sólo con peróxido de hidrógeno (Figura 26 y 29). Por otro lado, las hifas con el tratamiento de peróxido de hidrógeno no se observaron estresadas (Figura 27). Sin embargo, con el uso de *tropolone* 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se observaron hifas con estrés, vacuolizadas y con daño en la pared celular distinguible por la liberación del contenido citoplasmático (Figura 27D).

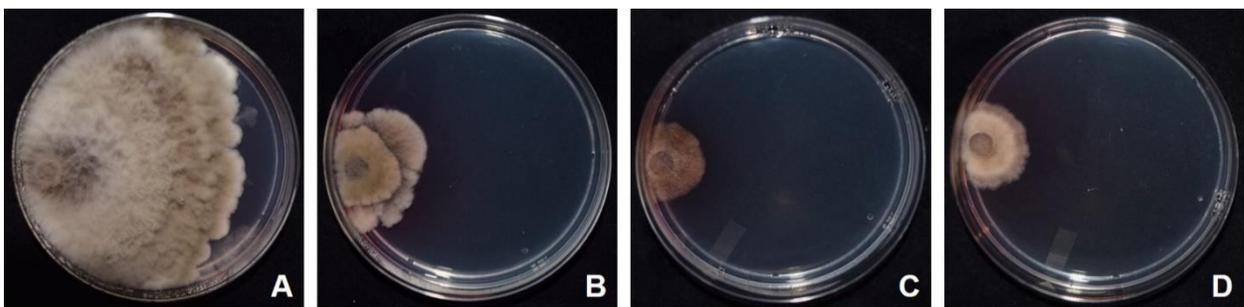


Figura 27. Crecimiento de UCD256Ma en condiciones de estrés oxidativo e inhibidores de melanina. A) PDA (control), B) PDA + H_2O_2 5%, C) PDA + H_2O_2 5% + Ph 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, D) PDA + H_2O_2 5% + Tp 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ph: *phthalide*, Tp: *tropolone*.

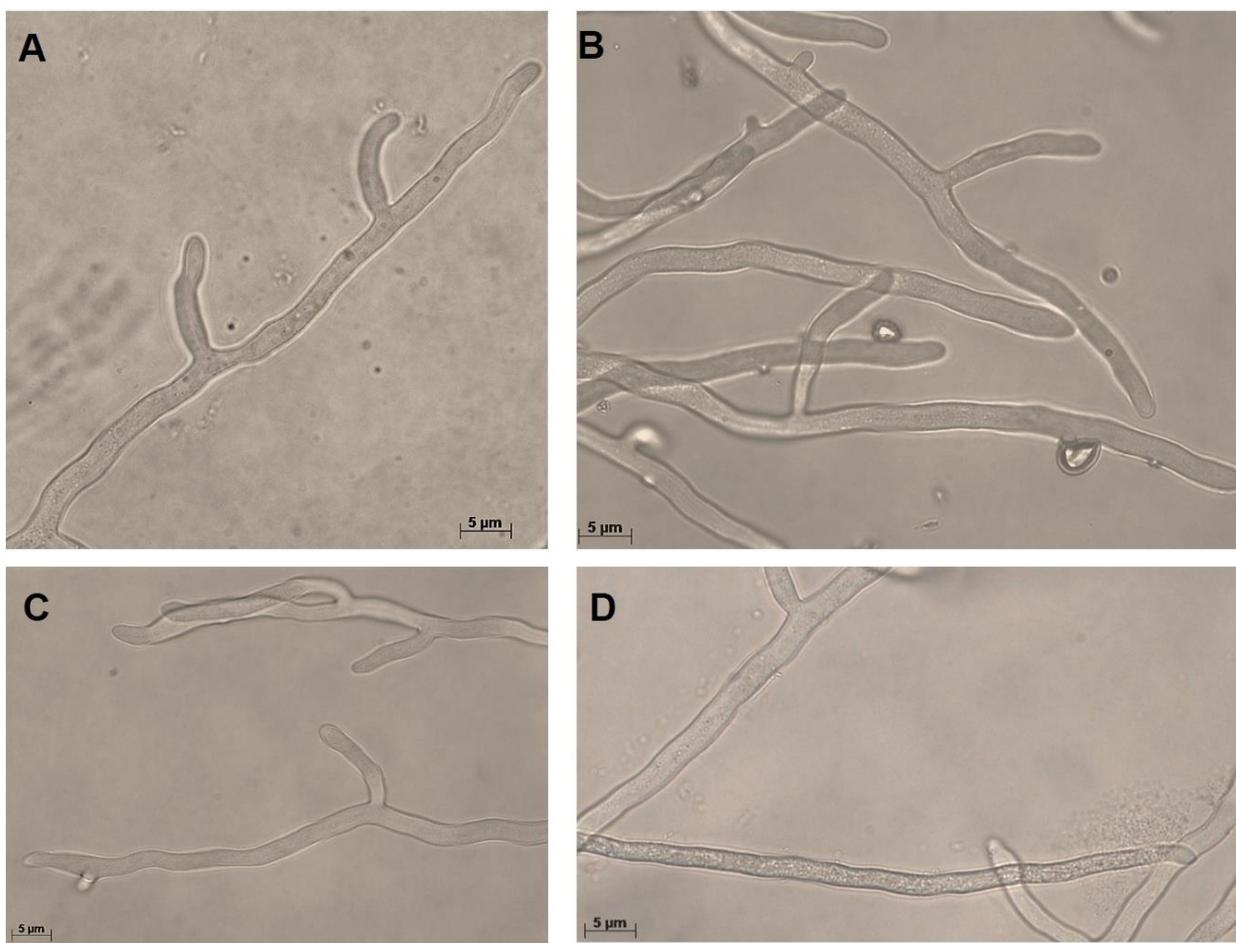


Figura 28. Desarrollo de las hifas de UCD256Ma en la exposición a H_2O_2 e inhibidores de melanina. A) PDA (control), B) PDA + H_2O_2 5%, C) PDA + H_2O_2 5% + Ph $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, D) PDA + H_2O_2 5% + Tp $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ph: *phthalide*, Tp: *tropolone*.

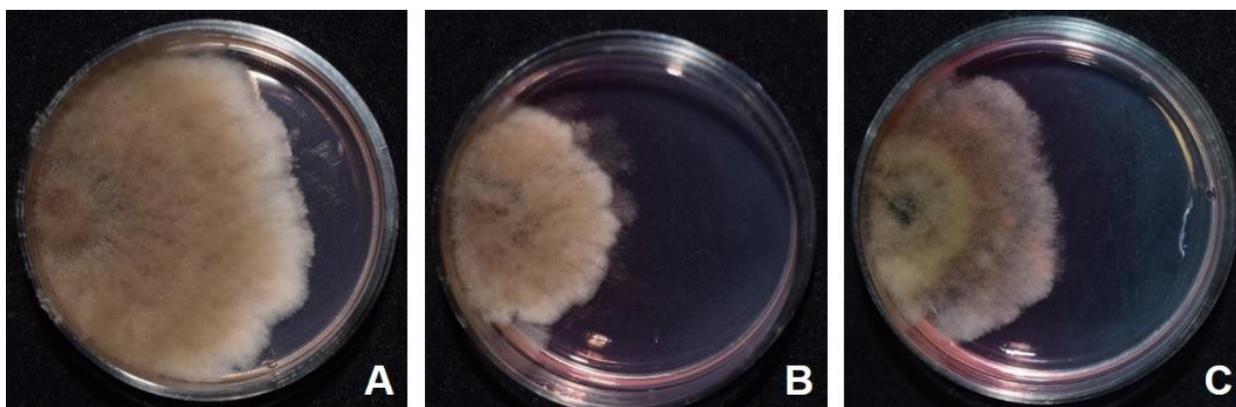


Figura 29. Crecimiento de UCD256Ma en condiciones de estrés oxidativo e inhibidor de piomelanina. A) PDA (control), B) PDA + H_2O_2 5%, C) PDA + H_2O_2 5% + NTBC $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. NTBC: *nitisinone*.

La presencia de peróxido de hidrógeno más *nitisinone* no afectó de manera visible el crecimiento de *L. theobromae* (Figura 28C); y si bien a nivel de la colonia no se observaron cambios marcados al usar

nitisinone, las hifas crecieron más delgadas con respecto al uso de únicamente el extracto enzimático y el peróxido de hidrógeno (Figura 30).

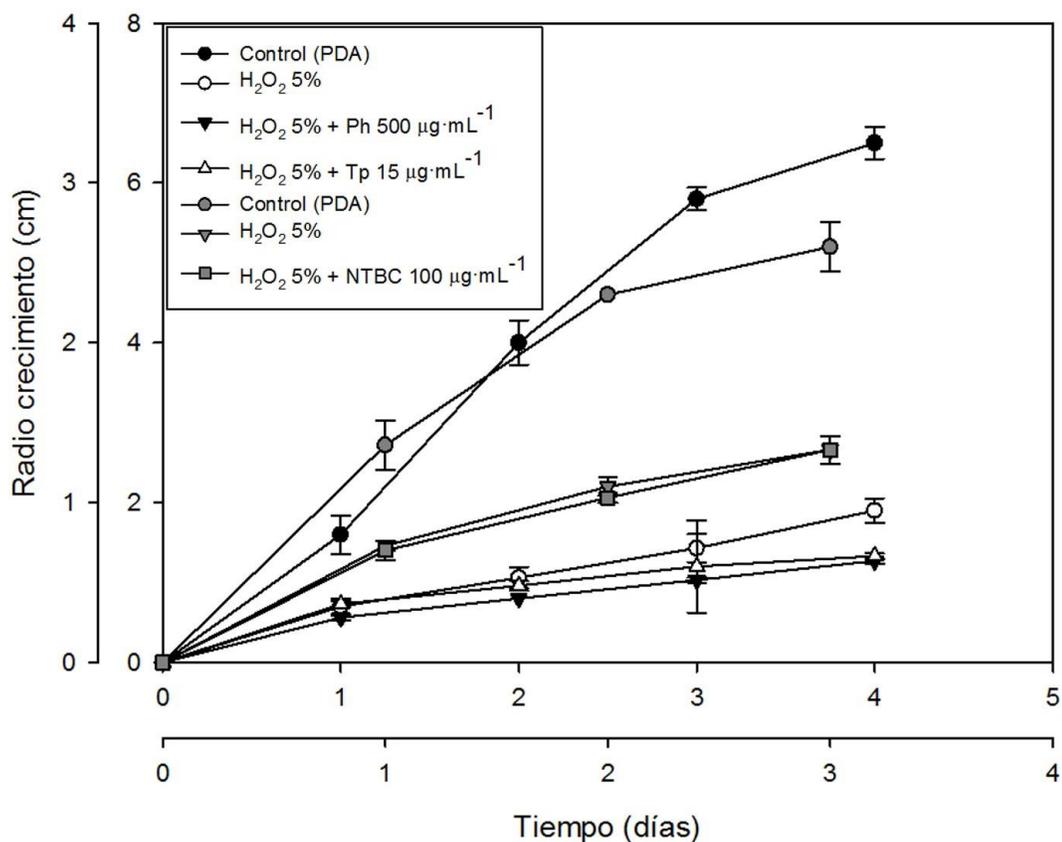


Figura 30. Crecimiento de UCD256Ma bajo estrés oxidativo en presencia de peróxido de hidrógeno 5% e inhibidores de melanina. El radio de crecimiento para inhibidores de DOPA-melanina y DHN-melanina se midió durante 4 días y para el inhibidor de piomelanina durante 3 días en cajas de Petri a 30 ± 2 °C. Las barras indican la desviación estándar de cada tratamiento.

7.8. La melanina en la resistencia a radiación UV

La exposición a UV retrasó la germinación y el crecimiento de esporas hialinas, pero no de las esporas pigmentadas, las primeras germinaron a las 48 h y las segundas a partir de las 24 h (Tabla 5).

Tabla 5. Comportamiento de UCD256Ma bajo exposición UV

Tipo de espora	Tiempo incubación (h)	Tiempo exposición (min)			
		30	40	50	60
Hialinas	24	Retraso	Retraso	Retraso	Retraso
	48	Germinaron	Germinaron	Germinaron	Germinaron
Pigmentadas	24	Germinaron	Germinaron	Germinaron	Germinaron

En cuanto a la coloración de las colonias, las esporas hialinas expuestas a 50 y 60 min a radiación UV, después de 96 h de crecimiento, se observaron más claras con respecto al control (Figura 31B y 31C). Por su parte, las esporas pigmentadas no se vieron afectadas por la exposición a luz UV (Figura 31E y 31F).

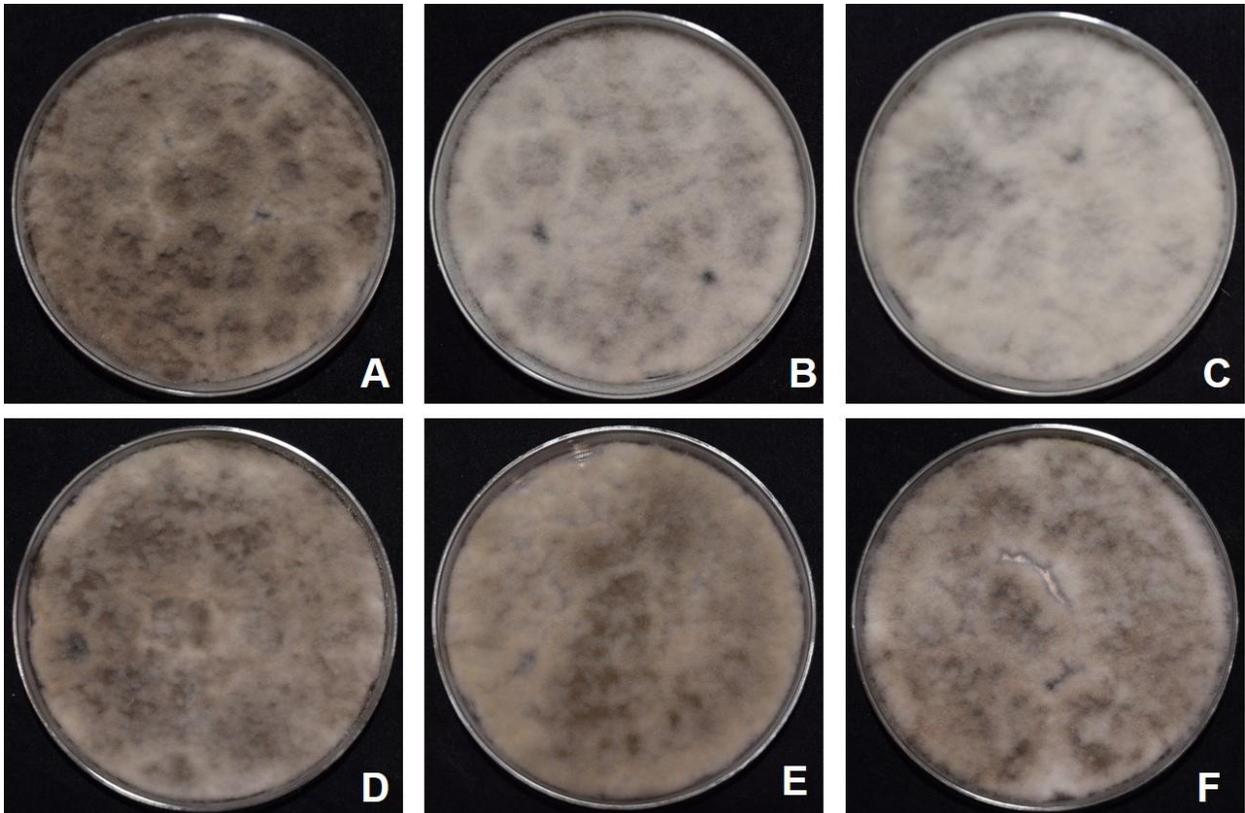


Figura 31. Germinación de esporas de UCD256Ma a 96 h de incubación expuestas a radiación UV. A) Esporas hialinas sin exposición (control), B) esporas hialinas expuestas 50 min, C) esporas hialinas expuestas 60 min, D) esporas pigmentadas sin exposición (control), E) esporas pigmentadas expuestas 50 min, F) esporas pigmentadas expuestas 60 min.

7.8.1. Porcentaje de germinación de esporas expuestas a radiación UV

Las esporas hialinas y pigmentadas presentaron un 100% de germinación a las 24 h de incubación los controles (sin exposición a UV). Sin embargo las esporas hialinas a las 24 h bajo la exposición a tanto a 30 como a 60 min no presentaron germinación, sino hasta las 48 h donde se observó un porcentaje de germinación por debajo del 40% (Figura 32).

A diferencia de las esporas hialinas, las esporas pigmentadas durante las primeras 24 h de crecimiento en el tratamiento expuesto 30 min a luz UV alcanzaron un 80% de germinación, mientras que a las 48 h las esporas expuestas 60 min a UV alcanzaron casi el 80% de germinación (Figura 32). De acuerdo con esto se puede reconocer la importancia de la presencia de melanina en las paredes de las esporas es importante para mantener su viabilidad ante la exposición a radiación UV.

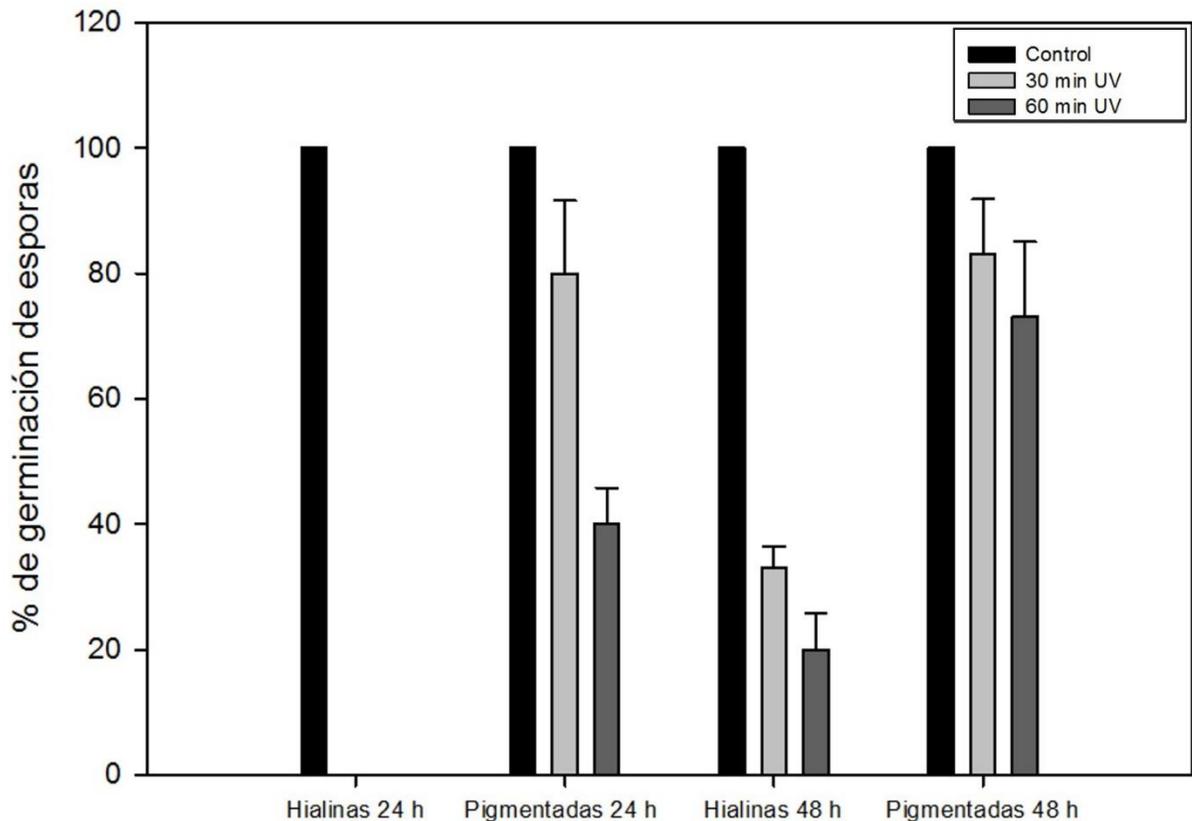


Figura 32. Porcentaje de germinación de las esporas hialinas y pigmentadas de UCD256Ma expuestas a diferentes tiempos de radiación UV. Las barras indican la desviación estándar de cada tratamiento.

7.9. Colonización de *L. theobromae* en plantas de vid

En las muestras tomadas de las plantas infectadas de Cabernet Sauvignon a los 28 días de incubación en las cámaras de crecimiento, se observó necrosis en la zona de la infección (Figura 33C y 33D), mientras que en los controles se observó una regeneración del tejido cercano al punto de la herida (Figura 33A y 33B).

Con el uso de SEM se pudo observar al hongo *L. theobromae* colonizando zonas cercanas al punto de inoculación, así como los haces vasculares (Figura 34). Además se observó principalmente en el cambium vascular y cercano a los rayos del parénquima, pero no se encontró en el tejido del floema. También se observaron algunas oclusiones de los vasos por la formación de calosa y tilosa.

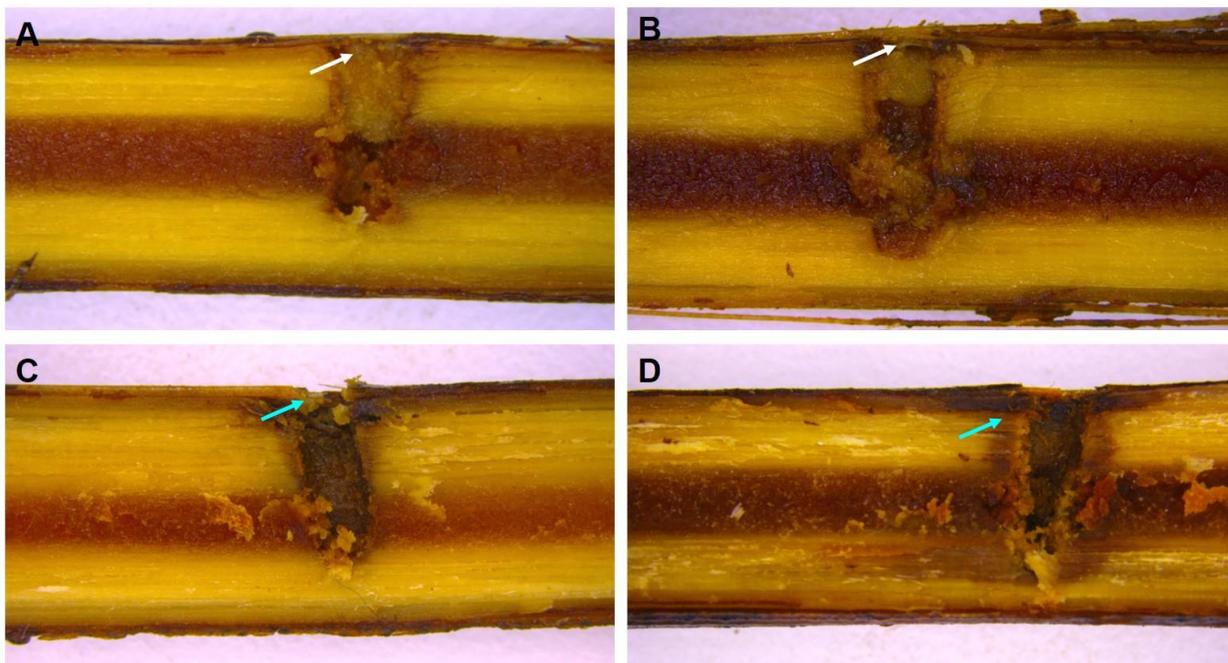


Figura 33. Respuesta de la *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon 28 dpi. A y B) plantas control, C y D) plantas infectadas con *L. theobromae* str. UCD256Ma.

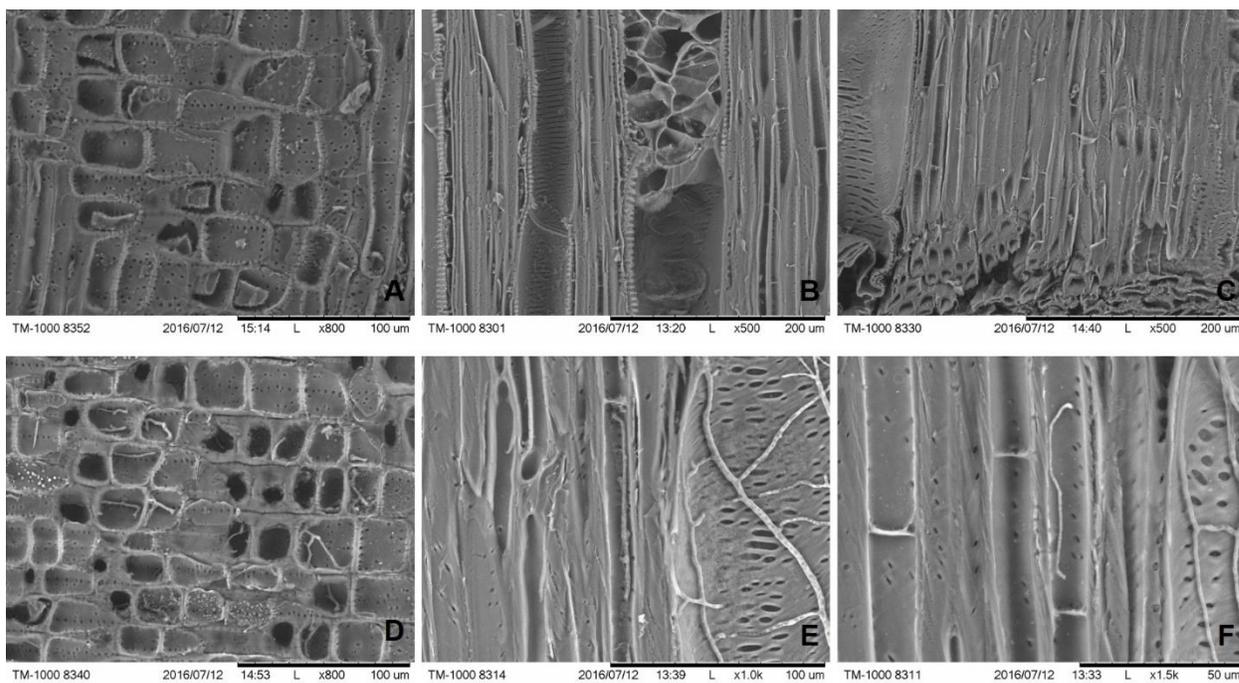


Figura 34. Microscopía electrónica de barrido de UCD256Ma *in planta*. A, B y C) muestras control (parénquima, haz vascular y cambium vascular, respectivamente); D, E y F) muestras infectadas (parénquima, haz vascular y cambium vascular, respectivamente).

Por otra parte, el uso de la tinción Masson-Fontana permitió observar a *L. theobromae* melanizado principalmente en el tejido de la médula de la planta (Figura 35). Además se observó a *L. theobromae* en

los puntos de inoculación así como invadiendo los haces vasculares de la planta. Se observaron oclusiones de estos tanto en las muestras infectadas como en las muestras control, esto debido a la respuesta de la planta a la herida provocada en las plantas control.

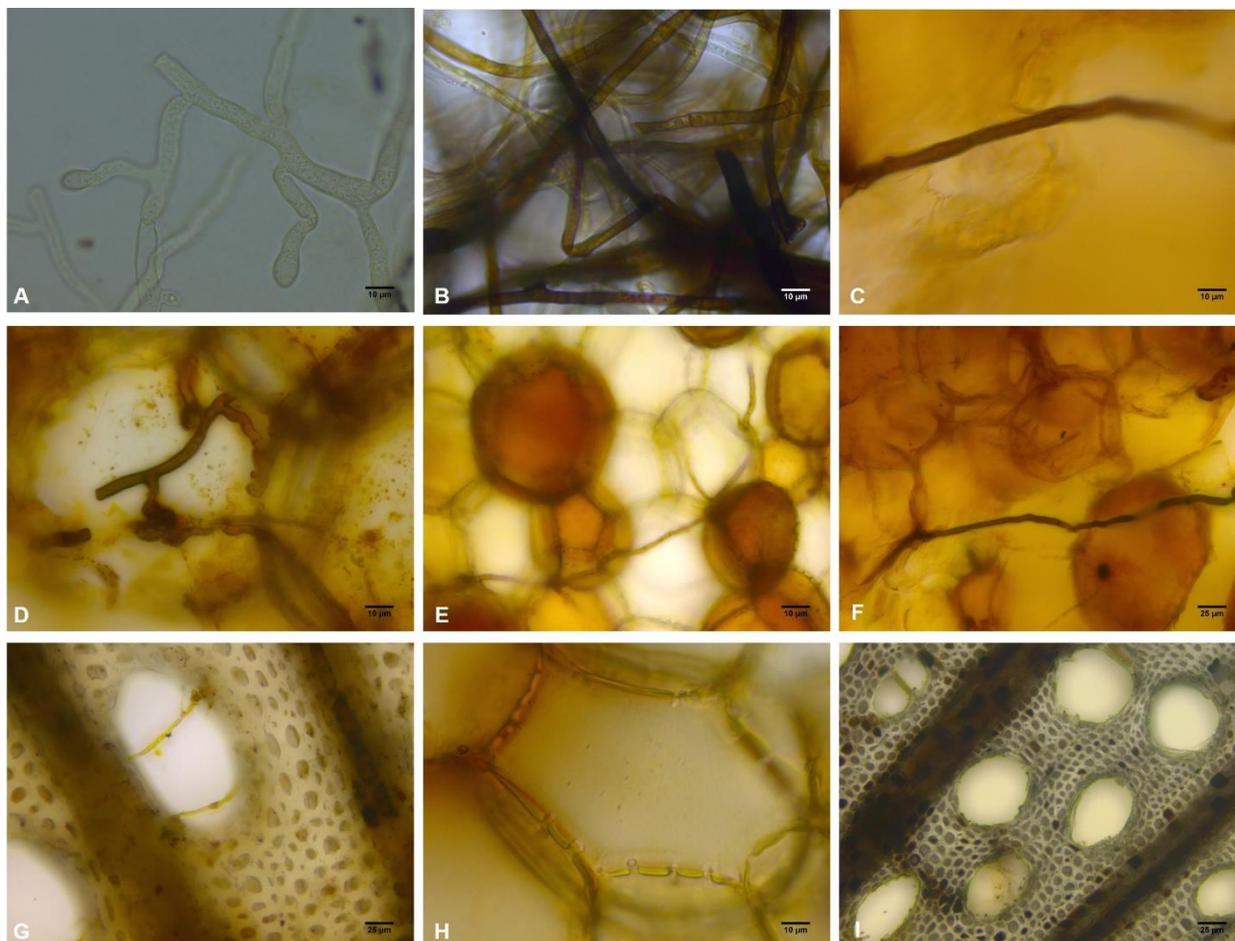


Figura 35. Tinción de melanina en el hongo *L. theobromae* usando el método de Masson-Fontana. A) Control negativo (UCD256Ma en PDA no melanizado), B) control positivo (UCD256Ma en PDA melanizado), C, D, E y F) UCD256Ma melanizado colonizando la médula de la planta, G) haz vascular colonizado con UCD256Ma, H) médula de la planta limpia en la muestra control; I) haces vasculares de la muestra control.

Capítulo IV.

8. Discusión

El uso de inhibidores de melanina se ha usado en algunos hongos para el estudio de las vías de síntesis de este pigmento (Woloshuk 1982; Wheeler y Klich, 1995; Butler *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2015). Gonçalves *et al.* (2011) reportaron que el uso de *tropolone* en el medio inhibió la síntesis de melanina en *A. nidulans* a diferencia del uso de inhibidores de DHN-melanina. Pal *et al.* (2014) usaron triciclazol, phthalide, tropolone y ácido kójico en *Aspergillus* spp. y encontraron que en *A. niger*, *A. tamarii* y *A. flavus* la síntesis de melanina fue inhibida por ácido kójico ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para *A. niger*) y *tropolone*; mientras que en *A. terreus* y *A. tubingensis* ésta se inhibió en presencia de triciclazol ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y *phthalide*. En cuanto al nitisinone, se ha usado principalmente en bacterias como *P. aeruginosa* en donde Ketelboeter *et al.* (2014) a $300 \mu\text{M}$ observaron la inhibición de piomelanina. Los autores mencionan que este compuesto tiene gran potencial como un factor de anti-virulencia en el tratamiento de infecciones bacterianas piomelanogénicas. En este trabajo se encontró que los inhibidores de las tres vías afectaron la coloración, morfología y crecimiento normal del hongo, lo cual indica que *L. theobromae* produce los tipos DOPA-melanina, DHN-melanina, así como piomelanina. La biosíntesis de los tres tipos de melanina no es tan común, pero esto se ha reportado en hongos patógenos como *S. schenckii* (Romero-Martínez *et al.*, 2000; Almeida-Paes *et al.*, 2009; Almeida-Paes *et al.*, 2012), *A. fumigatus* (Schmaler-Ripcke *et al.*, 2009; Pal *et al.*, 2014), y *P. marneffeii* (Liu *et al.*, 2014; Sapmak *et al.*, 2015; Boyce *et al.*, 2015).

Por otra parte, la formación de micelio aéreo es importante en los hongos para la formación y dispersión de las estructuras reproductivas (Braun, 2008). Choi y Goodwin (2011), reportaron cepas mutantes del gen *mve1* en del patógeno *Mycosphaerella graminicola* con un fenotipo albino y con menor producción de micelio aéreo en comparación con la cepa silvestre en placas de agar, lo que indica relación entre la falta de melanina y la ausencia de micelio aéreo. También la melanina se ha relacionado con la formación de micelio en hongos dimórficos como *Malassezia Furfur* (Youngchim *et al.*, 2013). En *L. theobromae* observamos que la DOPA-melanina está relacionado con la producción de micelio aéreo, ya que con el uso de *tropolone*, inhibidor de esta vía, se obtuvieron colonias planas. Posiblemente la DOPA-melanina ayuda al hongo en el crecimiento vegetativo al darle fuerza estructural a las hifas, y resulta ser la principal vía de síntesis *in vitro* de *L. theobromae*. Dada la relación entre el micelio aéreo y la reproducción asexual, sería conveniente evaluar más adelante la producción de esporas en relación con la formación del micelio aéreo,

esto el fin de considerar el uso de inhibidores para el control de la propagación de las esporas causantes del decaimiento por botriosferia.

El papel de la melanina en la protección a lisis enzimáticas ha sido poco estudiado. En 1967 Kuo y Alexander, así como Bloomfield y Alexander reportaron que mutantes de *A. nidulans* y *A. phoenicis*, respectivamente, sin la capacidad de producir melanina fueron más susceptibles a lisis enzimática. En este trabajo, el uso de un extracto de enzimas hidrolíticas inhibió el crecimiento de *L. theobromae*, pero no se afectó la formación de micelio aéreo ni la morfología de las hifas. En cambio, al bloquear la ruta de DOPA-melanina el hongo no pudo sobreponerse al estrés por la lisis enzimática y el crecimiento se inhibió completamente, sugiriendo que la presencia de melanina en el hongo es importante para mantener su integridad en la pared celular. Puesto que la melanina se ha asociado a la pared celular por su asociación con la quitina (Nosanchuk *et al.*, 2015), como en *A. nidulans* (Bull 1970) y *C. neoformans* (Banks *et al.*, 2005), consideramos que la melanina sirve para ocultar las moléculas blanco de las enzimas de degradación de pared celular, impidiendo el daño y debilitamiento de la misma.

Langfelder *et al.* (2003) mencionan que la DOPA-melanina está asociada a la protección a las células contra el daño por estrés oxidativo. En *C. neoformans* (Jacobson y Tinnell, 1993), *Sporothrix* spp. (Almeida-Paes *et al.*, 2012) y *A. fumigatus* (Heinkekamp *et al.*, 2013) se ha reportado un papel importante de este tipo de melanina en la protección frente a agentes oxidantes. También en el basidiomiceto *Inonotus obliquus*, Zheng *et al.* (2009) se reportó que la producción de DOPA-melanina es una de las respuestas más importantes al estrés oxidativo en presencia de H₂O₂, en donde también se observó un incremento en la producción de micelio. En este trabajo, la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio inhibió el crecimiento de *L. theobromae*, pero no afectó las características morfológicas del hongo, como la pigmentación, la formación de micelio aéreo y las ramificaciones de las hifas. Sin embargo, al bloquear la producción de DOPA-melanina mediante *tropolone*, se inhibió el crecimiento y la formación de micelio aéreo, cambió la coloración de la colonia y se encontraron hifas dañadas en la pared celular, lo cual indica que en *L. theobromae* al igual que en otros hongos, la DOPA-melanina protege a las células contra el daño por estrés oxidativo.

Otra función reportada para la melanina en hongos es la protección a la radiación UV, ya que se ha visto que cepas melanizadas presentan más resistencia a la radiación UV que aquellas que no producen melanina (Bell y Wheeler, 1986; Jacobson, 2000). Al-Laaiby *et al.* (2016) reportaron diferencias en la germinación de esporas expuestas a 200 mJ·cm⁻² de radiación UV de *Lomentospora prolificans* melanizadas

con respecto a esporas de cepas deficientes de la enzima PKS1, con un 51% y 28% de supervivencia, respectivamente. En *L. theobromae* la presencia de melanina contribuyó en la supervivencia de las esporas al ser expuestas a radiación UV. Mientras que las esporas hialinas presentaron un porcentaje bajo de supervivencia, así como retraso en el tiempo de germinación, las pigmentadas fueron poco afectadas. Se ha reportado que la melanina puede absorber la luz UV y actuar como un escudo de fotones de alta energía para proteger a la célula y prevenir del daño por mutaciones del DNA, lo cual puede desencadenar la muerte celular (Almeida-Paes *et al.*, 2012). De acuerdo a los resultados en este trabajo, se sugiere que la melanina en las esporas pigmentadas de *L. theobromae* actúa como agente protector que les permite resistir la radiación UV, lo cual podría ayudarle al hongo para la supervivencia de sus esporas y su eficiente diseminación en el ambiente. Se desconoce el tipo de melanina que *L. theobromae* produce en esporas, por lo cual se sugiere continuar con la evaluación de inhibidores de melanina en la producción de esporas pigmentadas para determinar el tipo de melanina producido en estas y controlar su producción con el fin de disminuir la dispersión de la enfermedad causada por este hongo.

Por otro lado, se observó que la tirosina, a diferencia de la fenilalanina, es un aminoácido importante para el crecimiento de *L. theobromae*, ya que el hongo puede utilizarla como fuente de carbono y nitrógeno. Sin embargo, la presencia de fenilalanina, al igual que tirosina en MM9 indujo el crecimiento, la formación de micelio aéreo y la pigmentación de la colonia, lo que sugiere un aumento en la producción de melanina. Además se observó que la tirosina es precursor de la vía de síntesis de DOPA-melanina al verse afectado su uso en el medio en presencia de *tropolone*. Paolinelli-Alfonso *et al.* (2016) reportaron la inducción de genes asociados a la producción de DOPA-melanina (TYR y MCO) en respuesta a la presencia de madera de vid en el medio. Boyce *et al.* (2015) mencionan que los aminoácidos son una fuente importante de nutrientes para algunos hongos patógenos y que pueden asimilarlos a partir de las proteínas de su hospedero para usarlos como carbono y nitrógeno. Con base en nuestros resultados se sugiere que la capacidad de degradación de tirosina podría ser una ventaja para *L. theobromae* durante el proceso de infección y colonización. Por lo que, es importante detectar cuál es el tipo de melanina que *L. theobromae* está produciendo en la planta en los diferentes estadios de la infección. Esto ayudará a comprender el proceso de síntesis de melanina en el hongo y la importancia que tiene cada tipo en el metabolismo de este y en su patogenia. Para lo cual, se propone continuar con el estudio de la expresión de los genes relacionado a la síntesis de los tres tipos de melanina durante la infección en plantas de vid en diferentes etapas de la colonización.

Se esperaba que el uso de *nitisinone* afectara el crecimiento del hongo en presencia de tirosina, ya que la piomelanina se deriva del catabolismo de tirosina. Esto puede deberse a que el hongo en condiciones *in vitro* utiliza la tirosina principalmente para la síntesis de DOPA-melanina. La piomelanina podría ser más importante para el hongo cuando durante el proceso de colonización en la planta, ya que la piomelanina se ha relacionado al estado de infección de algunos hongos. Almeida-Paes *et al.* (2012) reportan que *Sporothrix* spp. producen piomelanina en presencia de tirosina, la cual podría estar involucrada en su virulencia. Además, Paolinelli-Alfonso *et al.* (2016), señalan que los genes para las enzimas HGD y HPPD relacionadas al catabolismo de tirosina y producción de piomelanina se inducen en las condiciones de estrés por calor y en presencia de madera. En *P. marneffe* se ha sugerido que la tirosina es una fuente de nutrientes clave durante su crecimiento infeccioso, ya que la inhibición química de la 4-hidroxifenilpiruvato deshidrogenasa inhibe la producción *ex vivo* de las células de levadura; aunque el catabolismo de la tirosina y la producción de piomelanina no es necesario en las etapas iniciales de la infección en mamíferos (Boyce *et al.*, 2015). Para entender el rol que tiene la piomelanina en *L. theobromae*, sería conveniente generar una mutante sin la capacidad de producir este tipo de melanina e inocularla en la planta para comprobar su virulencia.

El desarrollo de las hifas, lleva a la formación de micelio aéreo y una colonia madura. Las hifas al iniciar su crecimiento, generalmente son más delgadas y a medida que crecen van incrementando su diámetro (McLean y Prosser, 1987; Gooday, 1993). También, el patrón de crecimiento de un hongo y la morfología de las hifas (longitud, ramificación y diámetro) se relaciona con las condiciones ambientales en las cuales se encuentra éste y, a cambios en las concentraciones de nutrientes, dióxido de carbono y oxígeno (Wongwicharn *et al.*, 1999; Ross, 2001; Trinci *et al.*, 2001; Ordaz *et al.*, 2012). Los hongos tienden a gastar menos energía en la formación de biomasa cuando se encuentran en un medio pobre en nutrientes, cubriendo un área mayor en la búsqueda de alimento (Prosser, 1994; Ordaz *et al.*, 2012). En este aspecto, se observó que con el uso de tirosina en los medios MM9-C y MM9-CN, *L. theobromae* pudo recuperar características de su crecimiento en condiciones óptimas, al mostrar mayor formación de micelio aéreo, hifas más gruesas y colonias más pigmentadas en comparación con los controles. Con el uso de inhibidores en estas condiciones de bajos nutrientes, el *phthalide* afectó el patrón de ramificación del hongo, al presentar hifas con ramificaciones cortas y muy seguidas en una misma hifa. Por su parte, el *nitisinone* mostró en todos los tratamientos, hifas más delgadas con respecto a los controles y al uso de otros inhibidores solos, de forma que la melanina podría ser importante para el desarrollo de las hifas en el hongo.

De acuerdo con lo observado en este trabajo, se propone que en condiciones *in vitro*, DOPA-melanina es el tipo principal producido por *L. theobromae*, la cual lo protege de la lisis enzimática y el estrés oxidativo. La DHN-melanina se observó como el segundo tipo importante para este, por los cambios observados en la morfología de la colonia, y se piensa podría ser importante para la ramificación en un medio con bajos nutrientes. Por otra parte, aunque la síntesis de piomelanina no resultó importante en el crecimiento del hongo, si lo fue para el engrosamiento de las hifas. El uso de tirosina en condiciones *in vitro* está destinado a la producción de DOPA-melanina en el hongo, más que a seguir la ruta de degradación de tirosina (Figura 36).

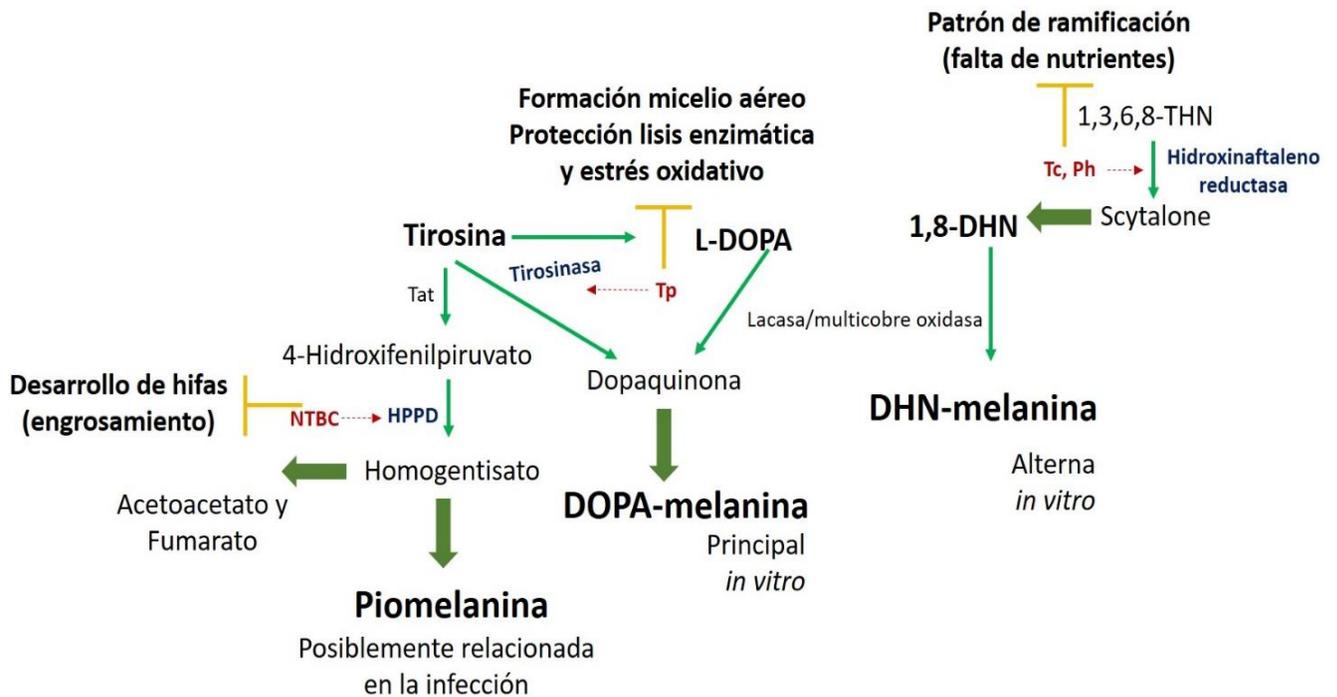


Figura 36. Relación de la biosíntesis de los diferentes tipos melanina en *Lasiodiplodia theobromae*, sitios de acción de los inhibidores de melanina y la respuesta de *L. theobromae* al uso de los inhibidores de melanina. Las flechas gruesas indican que hay pasos intermedios en las vías, los nombres en azul representan las enzimas sobre las que actúan los inhibidores de melanina, los cuales se encuentran en rojo.

Por otro lado, es importante conocer la forma en que el hongo infecta a las plantas y los mecanismos que utiliza para contrarrestar la respuesta de la planta a la infección, pero el proceso de colonización de plantas de vid por *L. theobromae* ha sido poco estudiado. Mediante el uso de SEM se observó al hongo colonizando el cambium vascular, los rayos del parénquima y los haces vasculares. También se observó que las hifas se encontraban melanizadas fundamentalmente entre las células del parénquima en la médula del hospedero, mientras que no se observó melanización al crecer en los haces vasculares, sugiriendo que el hongo se va melanizando conforme avanza en la colonización de la planta. La

melanización podría ayudar al hongo a protegerse de los mecanismos de defensa del hospedero y el hongo podría utilizar algunos compuestos de la planta, como la tirosina, como precursores en la producción de melanina. De acuerdo con esto, se sugiere continuar el estudio del proceso de colonización del hongo utilizando diferentes técnicas de microscopía con el fin de comprender los mecanismos de colonización y qué es lo que va sucediendo en la planta a manera que el hongo va invadiendo el tejido vegetal.

Capítulo V.

9. Conclusiones

L. theobromae tiene la capacidad de producir tres tipos de melanina: DOPA-melanina, DHN-melanina y piomelanina. La DOPA-melanina es la más importante para el crecimiento vegetativo de este hongo y está involucrada en la formación de micelio aéreo en *L. theobromae*, posiblemente otorgando fuerza estructural a las hifas.

L. theobromae puede utilizar tirosina como fuente de nutrientes, así como también, como precursor de DOPA-melanina.

La presencia de melanina protege al hongo ante la lisis enzimática y estrés oxidativo y su presencia en las esporas las protege contra radiaciones UV.

El hongo *L. theobromae* produce melanina durante su colonización en plantas de vid. Con base en la importancia para la resistencia a estrés abiótico en condiciones *in vitro* determinadas en este trabajo, se sugiere que la melanina protege al hongo de las condiciones adversas que se puedan presentar en su entorno generados por los mecanismos de defensa de la planta.

Literatura citada

- Al-Laeiby, A., Kershaw, M. J., Penn, T. J. y Thorton, C. R. 2016. Targeted disruption of melanin biosynthesis genes in the human pathogenic fungus *Lomentospora prolificans* and its consequences for pathogen survival. *International Journal of Molecular Science*, 17(4), 444. doi:10.3390/ijms17040444.
- Almeida-Paes, R., Frases, S., Fialho, P. C., Gutierrez-Galhardo, M. C., Zancopé-Oliveira, R. M. y Nosanchuk, J. D. 2009. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes and Infection*, 11(5), 554–562. doi:10.1016/j.micinf.2009.03.002.
- Almeida-Paes, R., Frases, S., Araújo, G., Marques, M., Gerfen, G. J., Nosanchuk, J. D. y Zancopé-Oliveira, R. M. 2012. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine. *Applied and Environment Microbiology*, 78(24), 8623–8630. doi:10.1128/AEM.02414-12.
- Al-Saadoon, A.H., Ameen, M. K. M. y Al-Rubaie, E. M. A. 2012. Histopathology of grapevine inoculated with *Lasiodiplodia theobromae*. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 25(1), 1–12.
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A. y Evidente, A. 2011. Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins*, 3, 1569–1605. doi:10.3390/toxins3121569.
- Banks, I. R., Specht, C. A., Donlin M. J., Gerik, K. J., Levitz, S. M. y Lodge, J. K. 2005. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 4(11), 1902 – 1912. doi: 10.1128/EC.4.11.1902-1912.2005.
- Bell, A. A. y Wheeler, M. H. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology*, 24, 411–51.
- Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C. y Fontaine, F. 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62(2), 243–265. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x
- Bloomfield, B. J. y Alexander, M. 1967. Melanins and resistance of fungi to lysis. *Journal of Bacteriology*, 93, 1276–1280.
- Boyce, K. J., McLauchlan, A., Schreider, L. y Andrianopoulos, A. 2015. Intracellular growth is dependent on tyrosine catabolism in the dimorphic fungal pathogen *Penicillium marneffeii*. *PLOS Pathogens*, 11(3), e1004790. doi:10.1371/journal.ppat.1004790
- Braun, S. 2008. Natural products in mycelia microorganisms: Impact of morphology. En: Ikan, R. (Ed.), *Selected topics in the chemistry of natural products*. World Scientific, Singapore. pp. 253–284.
- Bull, A. T. 1970. Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. *Journal of General Microbiology*, 63, 75-94. doi: 10.1099/00221287-63-1-75.
- Bürki, N., Michel, A. y Tabacchi, R. 2003. Naphthalenones and isocoumarins of the fungus *Ceratocystis fimbriata* sp. platani. *Phytopathologia Mediterranea*, 42, 191–198.
- Burrano, S., Mondello, V., Conigliaro, G., Alfonzo, A., Spagnolo, A. y Mugnai, L. 2008. Grapevine decline in Italy caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytopathologia Mediterranea*, 47, 132–136.
- Butler, M. J. y Day, A. W. 1998. Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 1115–1136.

- Butler, M. J., Gardiner, R. B. y Day, A. W. 2005. Fungal melanin detection by the use of copper sulfide-silver. *Mycologia*, 97(2), 312–319.
- Butler, M. J., Gardiner, R. B. y Day, A. W. 2009. Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, 101(3), 296–304. doi:10.3852/08-120.
- Carreira, A., Ferrerira, L. M. y Loureiro, V. 2001. Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3463-3468 doi: 10.1128/AEM.67.8.3463–3468.2001
- Cesati V. y de Notaris, G. 1863. Schema di classificazione degli sferiacei italici aschigeri piu' o meno appartenenti al genere *Sphaeria* nell'antico significato attribuitoglide Persoon. *Commentario della Società Crittogamologica Italiana*, 4, 177–240.
- Chang, T.-S., 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 2440-2475. doi: 10.3390/ijms10062440.
- Chen, Z., Nunes, M. A., Silva, M. C. y Rodrigues, C. J Jr. 2004. Appressorium turgor pressure of *Colletotrichum kahawae* might have a role in coffee cuticle penetration. *Mycologia*, 96(6), 1199–1208.
- Choi, Y.-E. y Goodwin, S. B. 2011. Gene encoding a c-type cyclin in *Mycosphaerella graminicola* is involved in aerial mycelium formation, filamentous growth, hyphal swelling, melanin biosynthesis, stress response, and pathogenicity *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(4), 469–477. doi:10.1094 / MPMI -04-10-0090.
- Coon, S. L., Kotob, S., Jarvis, B. B., Wang, S., Fuqua, W. C. y Weiner, R. M. 1994. Homogentisic acid is the product of MelaA, which mediated melanogenesis in the marine bacterium *Shewanella colwelliana* D. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), 3006–3010.
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F., Philips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. y Groenewald, J. Z. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycolgy*, 55, 235–253.
- Damm, U., Crous, P. W. y Fourie, P. H. 2005. 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.
- Denman, S., Crous, P. W., Taylor, J. E., Kang, J.-C., Pascoe, I. y Wingfield, M. J. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, 45, 129–140.
- Eisenman, H. C., Mues, M., Weber, S. E., Frases, S., Chaskes, S., Gerfen, G. y Casadevall, A. 2007. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology*, 153(12), 3954–3962. doi: 10.1099/mic.0.2007/011049-0.
- Eisenman H. C. y Casadevall, A. 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93(3), 931–940. doi: 10.1007/s00253-011-3777-2.
- Elliot, M. L. 1995. Effect of melanin biosynthesis inhibiting compounds on *Gaeumannomyces* species. *Mycologia*, 87(3), 370–374.
- Evidente, A., Sparapano, L., Andolfi, A. y Bruno, G. 2000. Two naphthalenone pentaketides from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with esca of grapevine. *Phytopathologia. Mediterranea*, 39(1), 162–168.
- Fernandez, C. W. y Koide, R. T. 2013. The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecology*, 6, 479–486. doi:10.1016/j.funeco.2013.08.004

- Funa, N., Ohnishi, Y., Fuji, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y. y Horinouchi, S. 1999. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*, 400, 897–899.
- García-Mateo, R. y Pérez-Leal, R. 2003. Fitoalexinas: Mecanismos de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 9(1), 5–10.
- Geis, P. A., Wheeler, M. H. y Szaniszlo, P. J. 1984. Pentaketide metabolites of melanin synthesis in the dematiaceous fungus *Wangiella dermatitidis*. *Archives of Microbiology*, 137(4), 324–8.
- Gonçalves, R. C. R., Lisboa, H. C. F. y Pombeiro-Sponchiado, S. R. 2011. Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1467–1474. doi:10.1007/s11274-011-0948-3.
- González, S. 2014. Cadena de valor económico del vino de Baja California, México. *Estudios Fronterizos, nueva época*, 16(32), 163–193.
- Gooday, G. 1993. The dynamics of hyphal growth. *Mycological Research*, 99(4), 385–394.
- Goodman, R. N., Király, Z. y Wood, K. R. 1986. The biochemistry and physiology of plants disease. University of Missouri Press, Columbia.
- Hamilton, A. J. y Gómez, B. L. 2012. Melanins in fungal pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 51, 189–191.
- Hawkins, S. y Boudet, A. 1996. Wound-induced lignin and suberin deposition in a woody angiosperm (*Eucalyptus gunni* Hook): histochemistry of early changes in young plants. *Protoplasma*, 191, 96–104.
- Heinekamp, T., Thywissen, A., Macheleidt, J., Keller, S., Valiante, V. y Brakhage, A. A. 2013. *Aspergillus fumigatus* melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2012.00440
- Henson, J. M., Butler, M. y Day, A. W. 1999. The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 447–471.
- Howard R. J. y Valent, B. 1996. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*, 50, 49–512.
- Hwang, L., Hocking-Murray, D., Bahrami, A. K., Andersson, M., Rine, J. y Sil, A. 2003. Identifying phase-specific genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* using a genomic shotgun microarray. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 2314–2326.
- Ito, S. 2003. The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 16, 230–236.
- Iyer, G. y Chattoo, B. B. 2003. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters*, 227, 121–126. doi:10.1016/S0378-1097(03)00658-X
- Jacobson, E. S. y Tinnell, S. B. 1993. Antioxidant function of fungal melanin. *Journal of Bacteriology*, 175(21), 7102–7104.
- Jacobson, E. S. 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 708–717. doi:10.1128/CMR.13.4.708-717.2000.
- Keller, S., Macheleidt, J., Scherlach, K., Schmalzer-Ripcke, J., Jacobsen, I. D., Heinekamp, T. y Brakhage, A. A. 2011. Pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus* requires HmgX and the transcriptional activator HmgR but is dispensable for virulence. *PLoS One*, 6(10), e26604. doi:10.1371/journal.pone.0026604

- Ketelboeter, L. M., Potharla, V. Y. y Bardy, S. L. 2014. NTBC Treatment of the pyomelanogenic *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA1111 inhibits pigment production and increases sensitivity to oxidative stress. *Current Microbiology*, 69, 343–348. doi:10.1007/s00284-014-0593-9.
- Kobayashi, T., Vieira, W. D., Potterf, B., Sakai, C., Imokawa, G. y Hearing, V. J. 1995. Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *Journal of Cell Science*, 108, 2301–2309.
- Kotze, C., van Niekerk, J., Halleen, F., Mostert, L. y Fourie, P. 2011. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(4), S247–S263.
- Kubo, Y., Suzuki, K., Furusawa, I. y Yamamoto, M. 1982. Effect of tricyclazole on appressorial pigmentation and penetration from appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology*, 9, 1198–1200.
- Kumar, M., Ramesh, C., Dubey, R. S. y Shah, K. 2015. Effect of tricyclazole on morphology, virulence and enzymatic alterations in pathogenic fungi *Bipolaris sorokiniana* for management of spot blotch disease in barley. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 23–35. doi:10.1007/s11274-014-1756-3.
- Kuo, M. J. y Alexander, M. 1967. Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *Journal of Bacteriology*, 94 (3), 624–629.
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G. y Brakhage, A. A. 2003. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 38, 143–158. doi:10.1016/S1087-1845(02)00526-1.
- Lillie, R. D. 1965. *Histopathologic Technique and Practical Histochemistry*, 3rd ed. McGraw Hill, New York.
- Liu, D., Wei, L., Guo, T. y Tan, W. 2014. Detection of DOPA-Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Penicillium marneffeii* and its effect on macrophage phagocytosis in vitro. *PLoS One*, 9(3), e92610. doi: 10.1371/journal.pone.0092610.
- Mathews, C. K., van Holde, K. E. y Ahern, K. G. 2002. *Bioquímica*, 3ra. ed. Pearson Addison Wesley, Madrid.
- McLean, K.M., y Prosser J.I. 1987. Development of vegetative mycelium during colony growth of *Neurospora crassa*. *Transactions of the British Mycological Society*, 88(4), 489–495.
- Narayanasamy, P. 2008. *Molecular biology in plant pathogenesis and disease management: disease development*, Vol. 2. Springer, Coimbatore.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th ed. W.H. Freeman, New York.
- Nosanchuk J.D., y Casadevall A. 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 5(4), 203–223.
- Nosanchuk, J. D., Stark, R. E. y Casadevall, A. 2015. Fungal melanin: what do we know about structure? *Frontiers in Microbiology*, 6, 1463. doi: 10.3389/fmicb.2015.01463.
- Nunes, L. R., Costa de Oliveira, R., Leite, D. B., da Silva, V. S., dos Reis Marques, E., da Silva Ferreira, M. E., Duarte, D. C., de Souza, L. A., Goldman, M. H. S., Puccia, R., Travassos, L. R., Batista, W. L., Nóbrega, M., Nobrega, F. G., Yang, D.-Y., de Bragança, C. A. y Goldman, G. H. 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryotic Cell*, 4(12), 2115–2128. doi:10.1128/EC.4.12.2115-2128.2005.
- Ordaz, A., Favela, E., Meneses, M., Mendoza, G. y Loera, O. 2012. Hyphal morphology modification in thermal adaptation by the white-rot fungus *Fomes* sp. EUM1. *Journal of Basic Microbiology*, 52, 167–174. doi:10.1002/jobm.201000528.

- Paim, S., Linhares, L. F., Mangrich, A. S. y Martin, J. P. 1990. Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy. *Bacteriology and Fertility of Soils*, 10(1), 72–76. doi: 10.1007/BF00336128.
- Pal, A. K., Gajjar, D. U. y Vasavada, A. R. 2014. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Medical Mycology*, 52(1), 10–18. doi: 10.3109/13693786.2013.826879.
- Paolinelli-Alfonso, M., Villalobos-Escobedo, J. M., Rolshausen, P., Herrera-Estrella, A., Galindo-Sánchez, C., López-Hernández, J. F. y Hernández-Martínez, R. 2016. Global transcriptional analysis suggests *Lasiodiplodia theobromae* pathogenicity factors involved in modulation of grapevine defensive response. *BMC Genomics*, 17, 615. doi:10.1186/s12864-016-2952-3.
- Phillips, A. J. L. 1998. *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology*, 146, 327–332.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z. y Crous, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51–167. doi:10.3114/sim0021.
- Pihet, M., Vandeputte, P., Tronchin, G., Renier, G., Saulnier, P., Georgeault, S., Mallet, R., Chabasse, D., Symoens, F. y Bouchara, J.-P. 2009. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Microbiology*, 9, 177. doi:10.1186/1471-2180-9-177.
- Plonka, P. M. y Grabacka, M. 2006. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnical and medical aspects. *Acta Biochimica Polonica*, 53(3), 429–443.
- Prosser, J. I. 1994. Kinetics of filamentous growth and branching. En: Grow, N.A.R., y Gadd G.M. (Eds), *The growing fungus*. Chapman & Hall, London. pp. 301–318.
- Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, 519, 1-2.
- Romero-Martínez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G. y Torres-Guerrero, H. 2000. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and Immunity*, 68(6), 3696 – 3703.
- Ross, I. K. 2001. Hyphae. *Encyclopedia of Life Sciences*. doi: 10.1038/npg.els.0000366.
- Saccardo, P. A. 1877. Fungi veneti novi vel critici vel mycologiae venetae addendi. Series VI. *Michelia*, 1(1), 1–72.
- Sapmak, A., Boyce, K. J., Andrianopoulos, A. Y Vanittanakom, N. 2015. The *pbrB* gene encodes a laccase required for DHN-melanin synthesis in conidia of *Talaromyces (Penicillium) marneffeii*. *PloS One*, 10(4): e0122728. doi: 10.1371/journal.pone.0122728
- Schmaler-Ripcke, J., Sugareva, V., Gebhardt, P., Winkler, R., Kniemeyer, O., Heinekamp, T. y Brakhage, A. A. 2009. Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 493–503. doi:10.1128/AEM.02077-08.
- Schoch, C. L., Shoemaker, R. A., Seifert, K. A., Hambleton, S., Spatafora, J. W. y Crous, P. W. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia*, 98(6), 1041–1052.
- Shcherba, V. V., Babitskaya, V. G., Kurchenko, V. P., Ikonnikova, N. V. y Kukulyanskaya, T. A. 2000. Antioxidant Properties of Fungal Melanin Pigments. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(5), 491–495.

- Slippers, B. y Wingfield, M. J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 21, 90-106. doi:10.1016/j.fbr.2007.06.002.
- Solano, F. 2014. Melanins: Skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*, 2014, 1–28. doi:10.1155/2014/498276.
- Spagnolo, A., Larignon, P., Magnin-Robert, M., Hovasse, A., Cilindre, C., van Dorselaer, A., Clement, C., Schaeffer-Reiss, C. y Fontaine, F. 2014. Flowering as the most highly sensitive period of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Mourvèdre) to the botryosphaeria dieback agents *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia seriata* infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 9644–9669. doi:10.3390/ijms15069644.
- Theissen, F. y Sydow, H. 1918. Vorentwürfe zu den Pseudosphaeriales. *Annales Mycologici*, 16, 1–34.
- Torres, M. A., Jones, J. D. G. y Dangl, J. L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, 141, 373–378. doi:10.1104/pp.106.079467.
- Trinci, A. P., Wiebe, M. G. y Robson, G. D. 2001. Hyphal Growth. *Encyclopedia of Life Science*. doi:10.1038/npg.els.0000367.
- Turick, C. E., Caccavo, F. Jr. y Tisa, L. S. 2008. Pyomelanin is produced by *Shewanella algae* BrY and affected by exogenous iron. *Canadian Journal of Microbiology*. 54, 334–339. doi:10.1139/W08-014.
- Turick, C. E., Knox, A. S., Becnel, J. M., Ekechukwu, A. A. y Milliken, C. E. 2010. Properties and function of pyomelanin. En: Elnashar M.M. (Ed), Biopolymers. Sciyo, Rijeka. pp. 449–472.
- Tzin, V. y Galili, G. 2010. New insights into the shikimate and aromatic amino acid biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant*, 3(6), 956–972. doi:10.1093/mp/ssq048.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M. y 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., Guerrero, J., Guevara, J. y 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. y 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., Battany, M., Bettiga, L. J., Gispert, C., McGourty, G., Ronocoroni, J., Smith, R. J., Verdegaal, P. y Gubler, W. D. 2010. *Botryosphaeriaceae* species spore-trapping studies in California Vineyards. *Plant Disease*, 94(6), 717-724. doi:10.1094/ PDIS-94-6-0717.
- Úrbez-Torres, J. R. 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(4), S5–S45. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-9316.
- van de Sande, W. W. J., de Kat, J., Coppens, J., Ahmed, A. O. A., Fahal, A., Verbrugh, H. y van Belkum, A. 2007. Melanin biosynthesis in *Madurella mycetomatis* and its effect on susceptibility to itraconazole and ketoconazole. *Microbes and Infection*, 9, 1114–1123. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.015.
- van Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Halleen, F. y Crous, P. W. 2006. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45, 43–54.
- Vasanthakumar, A., DeAraujo, A., Mazurek, J., Schilling, M. y Mitchell, R. 2015. Pyomelanin production in *Penicillium chrysogenum* is stimulated by L-Tyrosine. *Microbiology*, 161, 1211–1218. doi:10.1099/mic.0.000030.

- Wheeler, M. H. 1981. Melanin biosynthetic enzymes in cell-free homogenates of *Verticillium dahliae* and *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 71(8), 912.
- Wheeler, M. H. 1982. Melanin biosynthesis in *Verticillium dahliae*: dehydration and reduction reactions in cell-free homogenates. *Experimental Mycology*, 6, 171–179.
- Wheeler, M. H. y Bell, A. A. 1988. Melanins and their importance in pathogenic fungi. *Current Topics in Medical Mycology*, 2, 338–387.
- Wheeler, M. H. y Klich, M. A. 1995. The effects of tricyclazole, pyroquilon, phthalide, and related fungicides on the production of conidial wall pigments by *Penicillium* and *Aspergillus* species. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 52, 125–136.
- Wolkow, P. M., Sisler, H. D. y Vigil, E. L. 1983. Effect of inhibitors of melanin biosynthesis on structure and function of appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology*, 22, 55–71.
- Woloshuk, C. P. y Sisler, H. D. 1982. Tryciclazol, pyroquilon, tetrachlorophthalide, PCBA, coumarin y related compounds inhibit melanization and epidermal penetration by *Pyricularia oryzae*. *Journal of Pesticide Science*, 7(2), 161–166.
- Wongwicharn, A., McNeil, B. y Harvey, L. M. 1999. Effect of oxygen enrichment on morphology, growth, and heterologous protein production in chemostat cultures of *Aspergillus niger* B1-D. *Biotechnology & Bioengineering*, 65, 416–424.
- Wu, Y., Shan, L., Yang, S. y Ma, A. 2008. Identification and antioxidant activity of melanin isolated from *Hypoxylon archeri*, a companion fungus of *Tremella fuciformis*. *Journal of Basic Microbiology*, 48, 217–221. doi:10.1002/jobm.200700366.
- Wunderlich, N., Ash, G. J., Steel, C. C., Raman, H., Cowling, A. y Savocchia, S. 2011. Refining the biological factors affecting virulence of Botryosphaeriaceae on grapevines. *Annals of Applied Biology*, 159, 467–477. doi:10.1111/j.1744-7348.2011.00508.x.
- Yabuuchi, E. y Omyama, A. 1972. Characterization of “pyromelanin” - producing strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 22(2), 53–64.
- Youngchim, S., Nosanchuk, J. D., Pornsuwan, S., Kajiwarra, S. y Vanittanakom, N. 2013. The role of L-DOPA on melanization and mycelial production in *Malassezia furfur*. *PLoS One*, 8(6), e63764. doi:10.1371/journal.pone.0063764.
- Zheng, W., Zhao, Y., Zhang, M., Wei, Z., Miao, K. y Sun, W. 2009. Oxidative stress response of *Inonotus obliquus* induced by hydrogen peroxide. *Medical mycology*. 4, 814–823. doi: 10.3109/13693780802653933.

Anexos.

Anexo I: Lista de abreviaciones

DHN	Dihidroinaftaleno
DOPA	Dihidroxifenilalanina
DS	Desviación estándar
EE	Extracto Enzimático
FAA	Formaldehído-Alcohol etílico-Acético
FahA	Fumarilacetoacetato hidrolasa
GDHB	γ -Glutaminil-3,4-dihidroxibenzeno
HGD	Homogentisato dioxigenasa
HPPD	Hidroxifenilpiruvato dioxigenasa
IRCD	Anillo de escisión de intradiol dioxigenasa
Ka	Ácido Kójico
MaiA	Maleilacetoacetato isomerasa
MCO	Multicobre oxidasa
MM9	Medio mínimo 9
MM9-C	Medio mínimo 9 sin fuente de Carbono (sin glucosa)
MM9-CN	Medio mínimo 9 sin fuente de Carbono ni Nitrógeno (sin glucosa, ni NH ₄ Cl)
NTBC	Nitisinone
PDA	Agar Papa Dextrosa
PhhA	Fenilalanina hidroxilasa
Phe	Fenilalanina
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SH	Silicilato hidroxilasa
Tat	Tirosina aminotransferasa
THN	Tetrahidronaftaleno
Tp	Tropolone
Tyr	Tirosina
TYR	Tirosinasa
Tz	Triciclazol

Anexo II: Preparación de soluciones stock

Medio mínimo de Vogel 500 mL

Sales de Vogel 50X*	10 mL
Sacarosa	7.5 g
Aforar con agua destilada a 500 mL	

*Sales de Vogel 50X 100 mL

Citrato de sodio	15 g
KH ₂ PO ₄	2.5 g
NH ₄ NO ₃	10 g
MgSO ₄	1 g
Elementos traza*	500 µL
Biotina (0.1 mg · mL ⁻¹)	250 µL
Coloroformo (para preservar)	200 µL
Aforar con agua destilada a 100 mL	

*Solución elementos traza 100 mL

Ácido cítrico	5 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	1 g
CuSO ₄ · H ₂ O	0.25 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.05 g
H ₃ BO ₃	0.05 g
Na ₂ MoO ₄ · H ₂ O	0.05 g
Cloroformo (para preservar)	1 mL
Aforar con agua destilada a 100 mL	

Soluciones stock de los inhibidores de melanina

Triciclazol

Soluble en agua hasta 0.596 g · L⁻¹ a 20°C

P.M.

Solución stock de 200 µg · mL⁻¹

Phthalide

Soluble en agua caliente

Solución stock de 2000 µg · mL⁻¹

Tropolone

Soluble en agua

Solución stock de 200 µg · mL⁻¹

Ácido Kójico

Soluble en agua

Solución stock de 2000 µg · mL⁻¹

Nitisonone

Soluble en agua hasta 9.5 mg mL a pH 7.2

Solución stock de 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Soluciones stock de los aminoácidos**Tirosina**

Soluble en Buffer de fosfatos 0.2 M pH 7

P.M.=181.19 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Solución stock de 100 mM

DL-DOPA

Soluble en agua hasta 5 mM

P.M.= 197.19 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Solución stock de 3 mM

Preparar y usar el mismo día

Fenilalanina

Soluble en Buffer de fosfatos 0.2 M pH 7

P.M.= 165.19 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Solución stock de 10 mM

Reactivo Masson-Fontana 100 mL

AgNO_3 10 % 50 mL

NH_4OH

Agua destilada 50 mL

Agregar NH_4OH a la solución de AgNO_3 10 % gota a gota hasta observar una opalescencia.

Mezclar con la misma cantidad de agua destilada.

Filtrar y almacenar toda la noche en la oscuridad.

La solución es estable hasta por un mes cuando es almacenada en oscuridad.

Tinción Masson-Fontana

- Fijación del tejido en FAA (Formaldehído, Ácido Acético, Alcohol)
- Lavar con agua destilada
- Agregar reactivo Masson-Fontana (25 min a 56 °C)
- Lavar con agua destilada
- Fijar en Tiosulfato de sodio 5% (5 min)
- Lavar con agua destilada
- Montar en portaobjetos y observar