



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO BIOLOGÍA

Trabajo de Tesis Doctoral

**Estudio de las melaninas de *Pseudocercospora*
griseola, agente causante de la mancha angular
del poroto y rol biológico.**

Tesista

Lic. Alejandra Bárcena

Director

Dr. Mario, Carlos Nazareno Saparrat,

Codirector

Dr. Pedro Alberto Balatti

Asesora académica

Dra. Mariela, Bruno

Año 2016

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICBA) y a la Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por las becas otorgadas.

A la Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas por permitirme realizar esta investigación.

Al Dr. Mario Saparrat y el Dr. Pedro Balatti, por guiarme, enseñarme, entusiasmarme cuando los resultados eran como esperábamos, y por estimularme cuando así no era. Por cada una de nuestras discusiones para enriquecer el trabajo. Por enseñarme que la paciencia es la madre de la ciencia y el esfuerzo su padre.

A la Dra. Mariela Bruno, por ser mi Asesora Académica, por escucharme, por sus palabras de aliento en los momentos más difíciles con esa ternura que la caracteriza.

A la Dra. Laura López por asesorarme cuando comencé la tesis.

A la Dra. Fernanda Rosas, Dra. María Mirífico, Dra Gabriela Petroselli, Dra Rosa Erra-Balsells, Dra. Ana Gennaro, Dr. José Estévez, por su colaboración con los espectros FTIR, UV MALDI-TOF, EPR, microscopía confocal, y sobre todo por la buena predisposición que siempre demostraron.

A los chicos del laboratorio Carla, Darío, Ernest, Grace, Inés, Pepe, Silvina, Rocío, por estar siempre dispuestos a dar una mano en cuestiones de estadística, biología molecular, y también por los lindos momentos extra laborales.

Al INFIVE y a cada uno de sus integrantes por hacer que cada día fuera un placer ir a trabajar.

A Agus, Ali, Ana, Lucía, Iné, Fer, Pepe, Diego, Emi, Anita, Mari, Andre, Facu, Nico, Canari, Cristian, Diana, Laurita, Mari, Nadia, Guille, Santi, Taty, por las charlas y discusiones laborales, por compartir los almuerzos al sol (en invierno) o a la sobra (en verano en el Botánico) y cenas por fuera del trabajo con alguna que otra cervecita artesanal.

A los amigos que conocí en este lugar, Agus, Emi, Santi, Pepe que sé que aunque nuestras vidas tomen rumbos distintos ellos siempre van a estar para compartir una charla, una cerveza o un momento.

A los amigos de la facultad, Ana, Cacho, Canari, Caro, Cristian, Diego, Lara, María, Pau, Tincho, de los cuales algunos también fueron compañeros de trabajo.

A Ceci, Mari, Pau y Romi, por nuestras salidas y charlas.

A las chicas de Maca, Carli, Dani, Pao, Tati y Vale, por sus palabras de aliento con cada uno de los capítulos que terminaba, por estar siempre por más que el tiempo y la distancia nos separan desde hace más de 10 años.

A Sebastián, por ser mi compañero durante una gran parte de este camino.

A Ángel, por la colaboración con las imágenes, y a él y Grace por bancarme en especial en el último tiempo.

A mi familia, Papi, Mami, Dai y Nahuel por bancarse mis estados anímicos en la etapa de escritura, por interesarse y preguntar por mi trabajo. GRACIAS por acompañarme y entender mis elecciones.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xviii

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción general	1
1.1. Pigmentos.....	4
1.2. ¿Qué son las melaninas?	6
1.3. Diversidad de melaninas.....	7
1.4. Características y propiedades de las melaninas	12
1.5. Roles de las melaninas	15
1.5.1. Resistencia a estreses ambientales	15
1.5.2. Patogénesis y virulencia.....	17
1.6. Sitios de deposición	19
1.7. Aplicaciones.....	20
1.8. <i>Pseudocercospora griseola</i> : un hongo bajo estudio	21
Hipótesis.....	24
Objetivos.....	24

CAPÍTULO II: VARIABILIDAD MORFOLÓGICA Y DEPOSICIÓN DE MELANINAS EN REPRESENTANTES DE LOS GRUPOS GÉNICOS DE *PSEUDOCERCOSPORA GRISEOLA*.

2.1. Introducción	26
Objetivos.....	31
Hipótesis.....	31
2.2. Materiales y métodos	32
2.2.1. Aislamientos de <i>Pseudocercospora griseola</i>	32
2.2.2. Conservación de los aislamientos.	32
2.2.3. Inoculación y condiciones de cultivo de los hongos	33
2.2.4. Estimación del crecimiento micelial.	33

2.2.5. Análisis de la pigmentación de las colonias	34
2.2.6. Análisis microscópicos de <i>P. griseola</i> en cultivos sólidos y en la presencia de Triciclazole.....	34
2.2.7. Análisis estadístico	36
2.3. Resultados.....	37
2.3.1. Crecimiento y pigmentación de las colonias	37
2.3.2. Análisis microscópicos de <i>P. griseola</i> en cultivos sólidos y en la presencia de triciclazole.	42
2.4. Discusión	47

CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN DE LAS MELANINAS DE PSEUDOCERCOSPORA GRISEOLA

3.1. Introducción	53
Objetivos	55
Hipótesis	55
3.2. Materiales y métodos.....	56
3.2.1. Cultivos de <i>Pseudocercospora griseola</i>	56
3.2.2. Extracción de los pigmentos.	56
3.2.3. Espectroscopía UV-visible.....	57
3.2.4. Espectroscopía de fluorescencia.	57
3.2.5. Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica.	58
3.2.6. Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier.	58
3.2.7. Determinación de grupos fenólicos.....	59
3.2.8. Identificación de intermediarios de la síntesis de melanina por UV-MALDI MS.60	
3.2.9. Actividad antioxidante de melaninas.....	61
3.2.10. Actividad quelante de melaninas.	62
3.2.11. Análisis estadístico	63
3.3. Resultados.....	64
3.3.1. Espectroscopía UV-visible.....	64
3.3.2. Espectroscopía de fluorescencia	65
3.3.3. Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica	68
3.3.4. Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier	68
3.3.5. Determinación de grupos fenólicos.....	71
3.3.6. Identificación de intermediarios de la síntesis de melanina por UV-MALDI MS72	

3.3.7. Actividad antioxidante de melaninas.....	76
3.3.8. Actividad quelante de melaninas	76
3.4. Discusión	78

CAPÍTULO IV: ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA SÍNTESIS DE MELANINAS

4.1. Introducción	83
Objetivos	87
Hipótesis	87
4.2. Materiales y métodos.....	88
4.2.1. Detección de actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de melaninas.88	
4.2.1.1 Actividad Policétido sintasas (PKS).....	88
Obtención del extracto enzimático	88
Detección de actividad PKS.....	88
Detección de flaviolina por UV-MALDI MS.....	89
Determinación de proteínas totales.....	90
4.2.1.2. Actividad oxidativa extracelular	90
Obtención de la fuente de enzimas.....	90
Determinación de actividad enzimática oxidativa	91
4.2.2. Identificación de secuencias génicas que codifican el dominio KS de PKSs involucradas en la síntesis de pigmentos oscuros.	91
4.2.2.1 Extracción de ADN y cuantificación.....	91
4.2.2.2. Amplificación de la secuencia nucleotídica que codifica el dominio KS .92	
4.2.2.3. Secuenciación de fragmentos amplificados.....	93
4.2.2.4. Alineamientos múltiples y análisis filogenético	94
4.2.3. Análisis estadístico	97
4.3. Resultados.....	98
4.3.1. Detección de actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de melaninas.98	
4.3.1.1 Actividad Policétido sintasa (PKS)	98
4.3.1.2 Actividad oxidativa extracelular	100
4.3.2. Identificación de secuencias génicas que codifican el dominio KS de PKSs involucradas en la síntesis de pigmentos oscuros.	100
4.3.2.2. Amplificación de la secuencia nucleotídica que codifica el dominio KS100	
4.3.2.3. Alineamientos múltiples y análisis filogenético	101
4.4. Discusión	106

CAPÍTULO V: PSEUDOCERCOSPORA GRISEOLA BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO Y SU RESPUESTA EN EL CRECIMIENTO, LA PIGMENTACIÓN Y LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

5.1. Introducción	109
Objetivo.....	111
Hipótesis	111
5.2. Materiales y métodos.....	112
5.2.1. Cultivos de <i>Pseudocercospora griseola</i>	112
5.2.2. Tratamientos químicos en cultivos de <i>P. griseola</i>	112
5.2.3. Inoculación y condiciones de cultivo de los hongos.	114
5.2.4. Estimación del crecimiento micelar.....	114
5.2.5. Análisis de la pigmentación de las colonias... ..	115
5.2.6. Peroxidación lipídica.....	115
5.2.7 Análisis estadístico	116
5.3. Resultados.....	117
5.3.1. Crecimiento, pigmentación y nivel de MDA bajo un rango de concentración de fungicidas.	117
5.3.2. Crecimiento, pigmentación y nivel de MDA bajo un rango de concentración de agentes rédox.....	121
5.4. Discusión	125
CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	131
BIBLIOGRAFÍA	133

INDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

Tabla 1.3.1. Tipos de melaninas.....	12
---	----

CAPÍTULO II

Tabla 2.2.1. Aislamientos de <i>P. griseola</i> utilizados.....	32
Tabla 2.3.1.1. Crecimiento de los grupos génicos.....	39
Tabla 2.3.1.2. Pigmentación de los grupos génicos	39
Tabla 2.3.1.3. Crecimiento, pigmentación y tasa de crecimiento en <i>P. griseola</i> a los 21 días de cultivo sobre APG.....	40
Tabla 2.3.2.1. Espesor de la pared celular de las hifas de <i>P. griseola f. griseola</i> (aislamiento S3b) y <i>P. griseola f. mesoamericana</i> (aislamiento T4) desarrollados sobre APG y APG+100 mg/L de Triciclazole después de 21 días de incubación.....	45

CAPÍTULO III

Tabla 3.1.1. Características fisicoquímicas de los pigmentos oscuros de <i>P. griseola</i>	55
Tabla 3.2.1. Bandas de identificación del espectro FT-IR del pigmento.....	59
Tabla 3.3.1. Contenido de grupos fenólicos expresado en µg por muestra en <i>P. griseola f. griseola</i> y <i>P. griseola f. mesoamericana</i>	72

CAPÍTULO IV

Tabla 4.2.1. Secuencia de los cebadores utilizados.....	93
Tabla 4.2.2. Genes <i>pks</i> de organismos utilizados en el análisis filogenético: denominación, número de acceso en Gen Bank y posición aminoacídica relativa del dominio KS. Nr; nombre del gen no reportado.	96
Tabla 4.3.1. Actividad lacasa extracelular de <i>P. griseola f griseola</i> (S3b) y <i>P. griseola f mesoamericana</i> (T4). En medio basal (MB) y en la presencia de sulfato de cobre (II), a diferentes tiempos de incubación (7, 14 y 21 días).	100

CAPÍTULO V

Tabla 5.2.1. Características de los fungicidas utilizados.	113
Tabla 5.3.1. Concentraciones de fungicidas que inhiben el 50 % del crecimiento micelial. ND=no determinado.....	118

INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Árbol filogenético de la vida.....	1
Figura 2. Filogenia y clasificación del Reino Fungi: “Fungi basal” y Dikarya.	3
Figura 1.1.1. Diversidad de pigmentos en hongos.....	6
Figura 1.3.1. Ruta de síntesis de la melanina DOPA.....	8
Figura 1.3.2. Ruta de síntesis de la melanina DHN.	9
Figura 1.3.3. Ruta de síntesis de la piomelanina.	10
Figura 1.3.4. Ruta de síntesis de la melanina GHB (a) y PAP (b).	10
Figura 1.3.5. Ruta de síntesis de la melanina catecol.....	11
Figura 1.8.1. Ciclo de la mancha angular del poroto.....	22

CAPÍTULO II

Figura 2.3.1.1. Diámetro y pigmentación de las colonias de aislamientos del grupo Andino y del grupo Mesoamericano.....	35
Figura 2.3.1.2. Colonias de aislamientos seleccionados de <i>P. griseola</i> después de 21 días de cultivo en el medio APG a 24°C.	41
Figura 2.3.2.1. Colonias de <i>P. griseola f. griseola</i> y <i>P. griseola f. mesoamericana</i> sobre APG y APG + 100 mg/L de Triciclazole.....	43
Figura 2.3.2.2. Hifas de <i>P. griseola</i> sobre APG y APG + 100 mg/L de Triciclazole.....	44

Figura 2.3.2.3. Hifas de *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4) de cultivos sobre APG (a) y sobre APG + 100 mg/L de Triciclazole (b) no tratados (1) y tratados con H₂O₂ 6M y luz (2). 46

Figura 2.3.2.4. Relación de la señal fluorescente para el área media en la pared celular y vesículas intracelulares en cultivos de *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4) control (0) y cultivos suplementados con Triciclazole (100) tratados con H₂O₂ y luz (barras negras) y no tratados con H₂O₂ y luz (barras grises)..... 46

CAPITULO III

Figura 3.2.1. Secuencia de los pasos de extracción de melanina..... 57

Figura 3.2.2. Ruta de síntesis de la melanina dihidroxinaftaleno (DHN). 61

Figura 3.3.1. Espectro de absorción de 1 mg del pigmento purificado disuelto en hidróxido de sodio 0,1 M..... 64

Figura 3.3.2. Espectros de fluorescencia de los productos de degradación oxidativa de las muestras: espectro de excitación de micelio y melanina. 66

Figura 3.3.3. Espectros de fluorescencia de los productos de degradación oxidativa de las muestras: espectro de emisión de micelio y melanina. 67

Figura 3.3.4. Espectro RPE de muestra sólida (a) y en solución alcalina (b) de la melanina extraída de *P. griseola f. griseola* y *P. griseola f. mesoamericana*. 68

Figura 3.3.5. Espectro Infrarrojo con transformación de Fourier (FT-IR) de la melanina extraída de *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b) (a) y *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4) (b), y de la biomasa de *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b) (c) y *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4) (d)..... 70

Figura 3.3.6. Estructura química de a) Triciclazole, inhibidor de la síntesis de melanina-DHN, y b) flaviolina, producto derivado de la inhibición de la melanina de *P. griseola* f. mesoamericana (T4) por el Triciclazole 73

Figura 3.3.7. Espectro de masas MALDI en modo positivo de extractos correspondientes a cultivos de 21 días de crecimiento de T4 sobre APG: a) control 24 h y b) APG+ 100 mg/L Triciclazole 24 h, c) ácido gentísico (matriz) y d) Triciclazole.. 74

Figura 3.3.8. Espectro MS/MS MALDI de la señal m/z 206 obtenida desde extractos de acetato de etilo correspondientes a cultivos de 21 días de T4 crecido sobre APG+ 100 mg/L de Triciclazole 74

Figura 3.3.9. Estructura y masa propuesta de algunos fragmentos formados desde el ión molecular flaviolina..... 75

Figura 3.3.10. Espectro de masas UV-MALDI MS/MS ión positivo del ión $[M+H]^+$ con m/z 190 desde a) extracto de acetato de etilo correspondiente a cultivos de 21 días de T4 sobre APG+ 100 mg/L Triciclazole 24 h y b) Triciclazole de referencia. 75

Figura 3.3.11. Actividad antioxidante total de la melanina de T4, S3b y del BHT... 76

Figura 3.3.12. Porcentaje de capacidad de la melanina de T4 (línea negra) y S3b (línea gris) para quelar el hierro 77

CAPITULO IV

Figura 4.1.1. Síntesis de melanina DHN: precursor y reacciones involucradas. 84

Figura 4.1.2. Arquitectura de las PKS fúngicas..... 85

Figura 4.2.1. Reacción modelo catalizada por una enzima PKS..... 89

Figura 4.2.2. Posición relativa de los cebadores utilizados en la secuencia nucleotídica que codifica el dominio KS de la PKS 93

Figura 4.3.1. UV–MALDI MS (matriz AG). a) matriz; b) mezcla de reacción conteniendo 50 µl extracto enzimático, c) mezcla de reacción conteniendo 100 µl extracto enzimático; d) mezcla de reacción control negativo..... 99

Figura 4.3.2. Fragmentos amplificados por PCR utilizando los cebadores LC1/LC2 sobre el ADN genómico de *P. griseola*. 1) Producto de amplificación de *P. griseola f. griseola* (S3b). 2) Producto de amplificación de *P. griseola f. mesoamericana* (T4). 3) Control de PCR sin ADN. 4) Marcador de peso molecular. 101

Figura 4.3.3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los organismos utilizados en el análisis filogenético. 104

Figura 4.3.4. Relaciones filogenéticas de la secuencia aminoacídica deducida del dominio KS de las PKSs de *P. griseola f. griseola* (S3b) y *P. griseola f. mesoamericana* (T4) con otras PKSs fúngicas. 105

CAPITULO V

Figura 5.3.1. Crecimiento de *P. griseola* en presencia de distintas concentraciones de fungicidas: a) Azoxistrobina, b) Carbendazim, c) Difenconazole y d) Triciclazole. 118

Figura 5.3.2. Pigmentación de colonias de *P. griseola* sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de fungicidas: a) Azoxistrobina, b) Carbendazim, c) Difenconazole y d) Triciclazole..... 119

Figura 5.3.3. Componente “a” del color de las colonias de *P. griseola* sobre APG (medio basal) y en presencia de Triciclazole. 120

Figura 5.3.4. Peroxidación de lípidos en biomasa de *P. griseola* sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de Difenconazole. 120

Figura 5.3.5. Porcentaje de inhibición de las colonias de *P. griseola* sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de ácido ascórbico. 121

Figura 5.3.6. Pigmentación de colonias de <i>P. griseola</i> sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de ácido ascórbico.	122
Figura 5.3.7. Peroxidación de lípidos en la biomasa de <i>P. griseola</i> sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de ácido ascórbico.	122
Figura 5.3.8. Diámetros de colonias de <i>P. griseola f. mesoamericana</i> , T4 (A) y <i>P. griseola f. griseola</i> , S3b (B) sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de sulfato ferroso (mg/ml) y condición lumínica.....	123
Figura 5.3.9. Pigmentación de colonias de <i>P. griseola f. mesoamericana</i> , T4 (A) y <i>P. griseola f. griseola</i> , S3b (B) sobre APG (medio basal, MB) y en presencia de distintas concentraciones de sulfato ferroso (mg/ml) y condición lumínica.....	124
Figura 5.3.10. Peroxidación de lípidos en biomasa de <i>P. griseola</i> sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de sulfato ferroso y condición lumínica. A) <i>P. griseola f. mesoamericana</i> (T4) y B) <i>P. griseola f. griseola</i> (S3b).....	124

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ABTS	[2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico)]
AG	ácido gentísico
ALS	angular left spot
ANOVA	análisis de la varianza
APG	agar papa glucosa
BHT	Butil hidroxitolueno
CEM	Cromatografía de exclusión molecular
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CTAB	bromuro de cetil-trimetil amonio
DC	descarboxilasas
ddNTPs	didesoxinucleósidos
ddNTP	didesoxinucleótidos trifosfatados
DH	deshidratasas
DHN	Dihidroxinaftaleno
Dopa	dihidroxifenilalanina
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
flaviolina	2, 5,7-trihidroxi-1,4-naftoquinona
FTIR	espectroscopía infrarroja transformada de Fourier
GHB	glutaminil-4-hidroxi-benceno
GT	glutaminiltransferasas
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
MALDI MS matriz asistida por láser	espectrometría de masas desorción/ionización de la
MC	microscopio confocal
MET	microscopio electrónico de transmisión
MO	microscopio óptico
NJ	Neighbor- Joining
NO	noroeste
O	oxidasas

PAP	p-aminofenol
Pb	pares de bases
PKS	policétido sintasa
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PEG	polietilenglicol
PVPP	polivinilpirrolidona
PG	papa - glucosa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
R	reductasas
RPE	Resonancia paramagnética electrónica
RMN	Resonancia paramagnética nuclear
T	tirosinasas
TA	transaminasas
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TRIS	tris (hidroximetil-aminometano
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
UV	ultravioleta
1,3,6,8-THN	1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno
1,3,,8 THN	1,3,8 trihidroxinaftaleno
2-HJ	2-hidroxijuglone

RESUMEN

Las melaninas son pigmentos oscuros sintetizados por un amplio espectro de organismos. Estos polímeros, químicamente complejos, cumplen roles de protección ante situaciones de estrés y tienen propiedades de interés debido a que pueden ser de importancia médica, industrial y/o agronómica. *Pseudocercospora griseola* es el agente causal de la mancha angular, una enfermedad que causa severas pérdidas de rendimiento en los cultivos de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) en el noroeste de la Argentina. Este hongo se caracteriza por desarrollar micelio y esporas pigmentados. De la misma manera que otros patógenos evolucionó en paralelo con su hospedante, diversificándose en dos grupos génicos: "Andino" (*P. griseola* f. *griseola*) y "Mesoamericano" (*P. griseola* f. *mesoamericana*). En estudios previos se determinó que el tipo de melanina que sintetiza este hongo es 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN). El objetivo general de esta tesis fue analizar la capacidad de los aislamientos de *Pseudocercospora griseola* correspondientes a los grupos génicos Andinos y Mesoamericanos para sintetizar melanina, las características de los pigmentos y el rol biológico que cumplen. Para ello se estudiaron en primer lugar las diferencias en crecimiento y pigmentación de 10 representantes de los dos grupos génicos. A partir de dicho estudio se seleccionaron dos aislamientos, *P. griseola* f. *griseola* (S3b) y *P. griseola* f. *mesoamericana* (T4), que difieren en crecimiento y pigmentación. Con estos aislamientos se llevaron a cabo experimentos para caracterizar la localización y propiedades de sus melaninas así como la evaluación de dos actividades enzimáticas relacionadas con su síntesis, una involucrada en la reacción inicial y otra vinculada con la polimerización. También se analizó el cultivo de S3b y T4 bajo diferentes condiciones de cultivo, incluyendo la aplicación de tratamientos químicos con fungicidas con diferentes modos de acción y agentes que alteran el estado redox. La melanina de estos hongos se localizaron en la capa externa electrodensa de la pared celular, la que varía en espesor en los dos grupos génicos. Se confirmó que la

melanina de *P. griseola* es del tipo DHN, la que está caracterizada por diferentes grupos químicos, incluyendo grupos fenólicos y por revelar propiedades antioxidantes y quelantes de Fe^{+2} . En *P. griseola* este pigmento reveló diferencias según el aislamiento analizado. *P. griseola* sintetiza tanto enzimas PKSs como unas con actividad oxidativa extracelular de tipo lacasa. Los aislamientos S3b y T4, correspondientes a los grupos Andino y Mesoamericano respectivamente, se comportan diferencialmente frente a distintas condiciones ambientales, lo que sugiere la existencia de mecanismos diferentes para enfrentar situaciones ambientales según el grupo génico de procedencia, incluso bajo condiciones de estrés. Estos resultados pueden tener relevancia en el desarrollo de estrategias de control de este hongo patógeno de poroto vinculados con la síntesis de pigmentos oscuros.

ABSTRACT

Melanins are dark pigments synthesized by a broad spectrum of organisms. These chemically complex polymers fulfill roles of protection against stress and have properties of interest since they can be medical, industrial and/or agronomical importance. *Pseudocercospora griseola* is the causal agent of angular leaf spot, a disease that causes severe yield losses in crops of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Northwest of Argentina. This fungus is characterized by developing pigmented mycelium and spores. In the same way that other pathogens, *P. griseola* evolved in parallel with its host, diversifying into two genetic groups: "Andino" (*P. griseola* f. *griseola*) and "Mesoamericano" (*P. griseola* f. *mesoamericana*). In previous studies it was determined that the type of melanin synthesized by this fungus is 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN). The general objective of this thesis was to analyze the ability of *Pseudocercospora griseola* isolates -corresponding to the Andino and Mesoamericano groups- to synthesize melanin, the pigment characteristics and the biological role they played. To do this, in first place we studied the differences in growth and pigmentation in 10 representatives of the two genetic groups. From this study two isolates were selected, *P. griseola* f. *griseola* (S3b) and *P. griseola* f. *mesoamericana* (T4), which differ in growth and pigmentation. With these isolates they were carried out experiments to characterize the location and properties of its melanin as well as the evaluation of two enzymatic activities related to their synthesis, one involved in the initial reaction and another linked to the polymerization. Cultivation of S3b and T4 isolates under different culture conditions was also analyzed, including the application of chemical treatments with fungicides with different modes of action and agents that alter the redox state. Melanin of these fungi was located on the electron-dense outer layer of the cell wall, which varies in thickness in the two genetic groups. It was confirmed that the melanin of *P. griseola* is DHN type, which is characterized by different chemical groups, including phenolic groups and for revealing Fe⁺² antioxidant

and chelating properties. In *P. griseola* this pigment revealed differences according to the isolation analyzed. *P. griseola* synthesizes both enzymes PKSs and ones with an extracellular oxidative activity of laccase type. The S3b and T4 isolates, corresponding to the Andino and Mesoamericano groups respectively, behave differently in response to diverse environmental conditions, suggesting the existence of different mechanisms depending on the genetic group of origin to face environmental situations, even under stress conditions. These results may have relevance to the development of strategies to control this bean fungal pathogen, linked to the synthesis of dark pigments.

Introducción general

En los comienzos de la vida sobre la Tierra tres dominios surgieron por divergencia a partir de un organismo ancestral común. Las tres líneas evolutivas (dominios) de la vida son: *Bacteria* y *Archaea* (Procariotas) y *Eukarya* (Eucariotas; Figura 1; Madigan *et al.*, 2009).

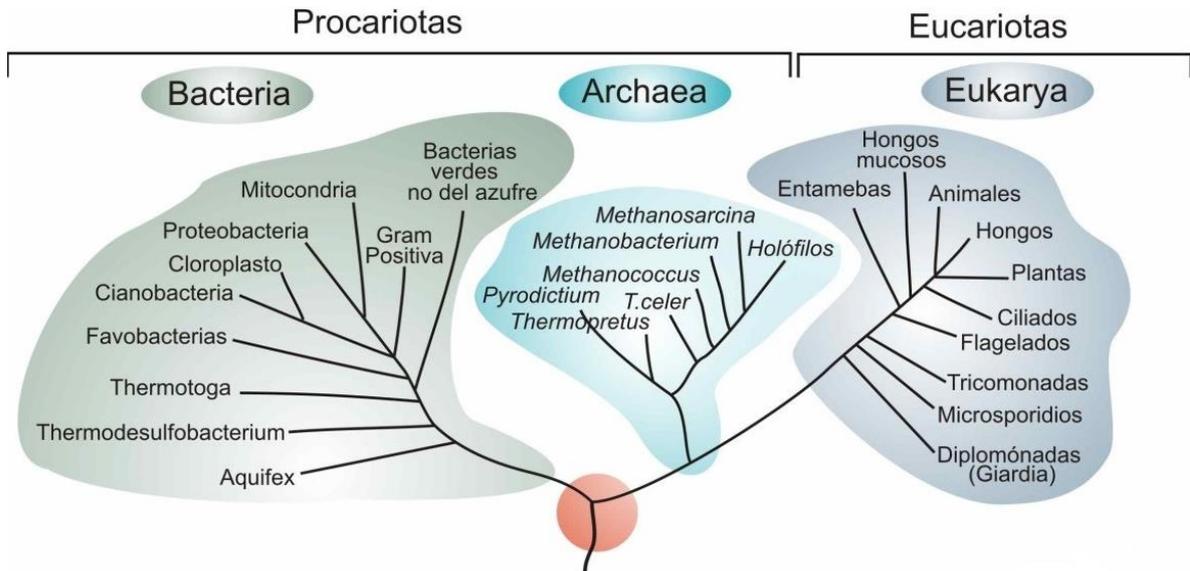


Figura 1. Árbol filogenético de la vida (Oren, 2008).

No todos los procariotas están relacionados estrechamente desde el punto de vista filogenético. El dominio *Archaea* tiene una relación más próxima con *Eukarya* que con *Bacteria*. Entonces a partir del ancestro común todas las formas de vida se diversificaron en dos direcciones: el dominio *Bacteria* y otra segunda línea evolutiva que originó el dominio *Archaea* y el dominio *Eukarya*. Como todas las células animales y vegetales son eucariotas, se asume que los microorganismos eucariotas fueron los antecesores de todos los organismos pluricelulares (Madigan *et al.*, 2009).

En el dominios *Eukarya* se encuentran los hongos, lo cuales pertenecen al Reino Fungi, son organismos eucarióticos, que producen esporas, no contienen clorofila y son heterótrofos, es decir que obtienen los alimentos por absorción. Tienen

paredes celulares compuestas de quitina (a diferencia de las plantas que son de celulosa), casi todos son multicelulares (levaduras son unicelulares; Madigan *et al.*, 2009). La mayoría de las especies están constituidas de filamentos delgados llamados hifas. Las hifas son estructuras cilíndricas o tubulares, generalmente ramificadas, cubiertas por una membrana que contiene el protoplasma, y por fuera la pared celular. Hay dos tipos de hifas cenocíticas y septadas. En los hongos considerados más primitivos, generalmente no se observan septos y en estas formas no septadas, las hifas contienen numerosos núcleos en una masa común de citoplasma y se les denomina cenocíticas. En hongos más desarrollados, las hifas están divididas en compartimentos o células mediante paredes que reciben el nombre de septos (Herrera & Ulloa, 1998). Las hifas de los hongos, ya sean cenocíticas o septadas, se desarrollan en abundancia, se ramifican, se entrelazan y anastomosando formando una estructura filamentosa llamada micelio. De acuerdo a su función puede haber micelios vegetativos o reproductores. Los vegetativos están formados por hifas que cumplen funciones de absorción, asimilación y fijación. Los micelios reproductores poseen hifas en las que se forman estructuras de reproducción, donde se generan los elementos que perpetúan la especie (Herrera & Ulloa, 1998).

La reproducción puede ser asexual o sexual. La reproducción asexual es aquella en la que no hay unión de micelios sexuales, de gametas o de gametangios. La reproducción sexual comprende dos procesos: la fecundación y la meiosis. A su vez la fecundación comprende dos fases: la plasmogamia (se unen los protoplasmas de las células sexuales y los núcleos de ambas se aproximan en uno al otro) y la cariogamia (los núcleos se fusionan formando uno solo; Herrera & Ulloa, 1998).

Los hongos cumplen un rol importante en el ecosistema pueden ser: saprófitos, parásitos, simbiontes. Al ser descomponedores y recicladores de desechos orgánicos transforman la materia devolviendo al medio C, N, P y otros nutrientes esenciales, asimilables por el resto de los seres vivos del medio. Tienen

gran importancia en medicina, alimentos e industrias. Son la principal causa de enfermedades en plantas, causando importantes pérdidas de cosechas. También causan enfermedades en animales. Las levaduras son esenciales en procesos industriales como: la fermentación de pan, vino, cerveza y quesos (Herrera & Ulloa, 1998).

Los hongos (Reino Fungi) se clasifican según Hibbett *et al.* (2007) en varias entidades taxonómicas incluidas en dos grupos:

a) los “Fungi basal” con los phyla: Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota (estos tres tradicionalmente designados como Chytridiomycota), Microsporidia, Glomeromycota y los 4 subphyla incertae sedis: Kickxellomycotina, Zoopagomycotina, Entomophthoromycotina y Mucoromycotina (que junto al phylum Glomeromycota fueron tradicionalmente designados como Zygomycota); y

b) el Subreino Dikarya con los 2 phyla, Ascomycota y Basidiomycota (Figura 2).

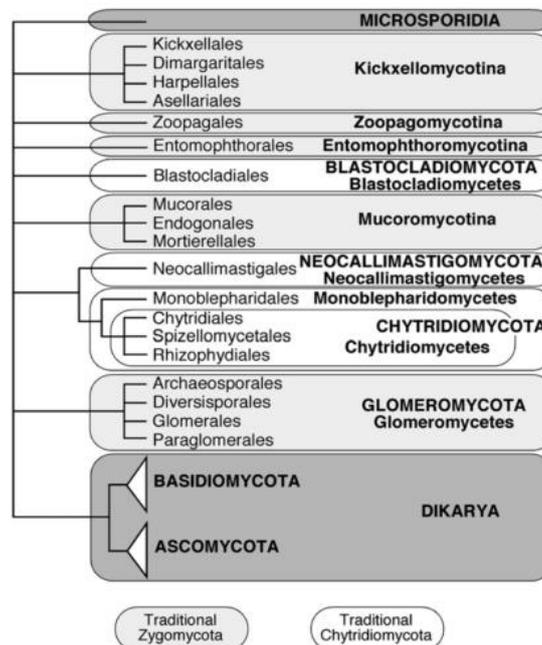


Figura 2. Filogenia y clasificación del Reino Fungi: “Fungi basal” y Dikarya (Hibbet *et al.*, 2007).

1.1. Pigmentos.

En muchos organismos se pueden identificar pigmentos que brindan una coloración característica a la estructura que la presenta. En las plantas se localizan en hojas, frutos, flores; en animales en la piel, ojos y otras estructuras; en hongos en estructuras vegetativas como hifas, esclerocios así como en estructuras reproductivas y en bacterias en la pared celular (Mínguez Mosquera *et al.*, 2005; Venil *et al.*, 2013). Los pigmentos sintéticos (obtenidos en laboratorios) y naturales (sintetizados por organismos) se utilizan en medicina, alimentos, cosméticas, ropa (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Los pigmentos naturales son de gran importancia existiendo diferentes tipos que difieren en su solubilidad: unos hidrosolubles (antocianinas y betalaínas), otros liposolubles (carotenoides) y otros insolubles tanto en soluciones acuosas como en solventes orgánicos (melaninas; Strack *et al.*, 2003; Mapari *et al.*, 2005; Mínguez Mosquera *et al.*, 2005; Turturica *et al.*, 2015).

En animales los pigmentos como la hemoglobina y mioglobina son necesarios para el transporte de oxígeno y dióxido de carbono, las melaninas presentes en la piel, ojos y pelos protegen contra la radiación (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

En las planta la clorofila, donde la energía lumínica absorbida por estos pigmentos verdes y su transformación en energía química es un proceso que forma parte de la fotosíntesis (Bieto & Talón). En este proceso también participan los carotenoides (pigmentos rojo, naranja y amarillo) los cuales son solubles en lípidos (Mínguez Mosquera *et al.*, 2005). Otros pigmentos vegetales son las antocianinas de colores rojo y azul y betalaínas en el Orden Caryophyllales dan tonalidades amarillo y rojo, ambos son hidrosolubles (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). También se ha reportado la presencia de melaninas (Solano, 2014; Urán & Cano, 2008).

En algas los pigmentos están vinculados a la fotosíntesis, y pueden ser: clorofila a y b (en Chlorophyta), a y c (en Crysohyta), carotenoides como la

fucoxantina (en Phaeophyta y Crysochyta), ficobilinas (ficocianinas en Cianophyta y ficoeritrinas en Rodophyta; Cook, 1945).

En bacterias los principales pigmentos son: melaninas y carotenoides (Nuñez-Cardona, 2003). Representantes del género *Pseudomonas* sintetizan, según la especie, distintos pigmentos como por ejemplo la piocianina que dan un color azul a los cultivos permitiendo su identificación. La fluoresceína en *Pseudomonas fluorescens* o pioverdina hace que las colonias adquieran un color verde fluorescente (Meyer, 2000).

Los pigmentos de hongos del SubReino Dikarya son: carotenoides, quinonas, betalainas y melaninas (Figura 1.1.1; Durán *et al.*, 2002). Los pigmentos característicos de plantas, clorofila y antocianinas, no están presentes en hongos. Los carotenoides, se encuentran en Ascomycota, entre ellos en *Cyttaria hariotti*, en Basidiomycota en *Cantharellus cinnabarinus* cuyo color se debe a los carotenoides que sintetizan (cantaxantina, que da el nombre al género) y también en *Rhodotorula glutinis* (Aksu & Eren, 2007; Rugolo *et al.*, 2015). Las antraquinonas, un tipo de quinonas, son sintetizadas por varios representantes del phylum Ascomycota como: *Aspergillus terreus*, *Curvularia lunata*, *Drechslera* sp., *Eurotium* sp., *Emericella falconensis*, *Emericella fructiculosa*, *Emericella purpure* y *Fusarium* sp. (Mapari, 2005; Fujii *et al.*, 1996). La presencia de naftoquinonas, otro tipo de quinona, se ha reportado en *Chlorociboria aeruginosa* y en *Fusarium solani* (Donner *et al.*, 2012). Algunas especies de hongos pertenecientes al phylum Basidiomycota (*Amanita*, *Hygrocybe*, y *Hygrosporus*) sintetizan dos tipos de betalainas, las betacianinas rojas y violeta y las betaxantinas naranjas y amarillas (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Las melaninas son sintetizadas por representantes de los phyla Ascomycota y Basidiomycota y han sido asociados a ambientes estresantes, como desiertos o regiones alpinas. Hay también hongos del phylum Chytridiomycota como *Synchytrium* que sintetizan melaninas asociadas a las esporas (Hampson *et al.*, 1996).

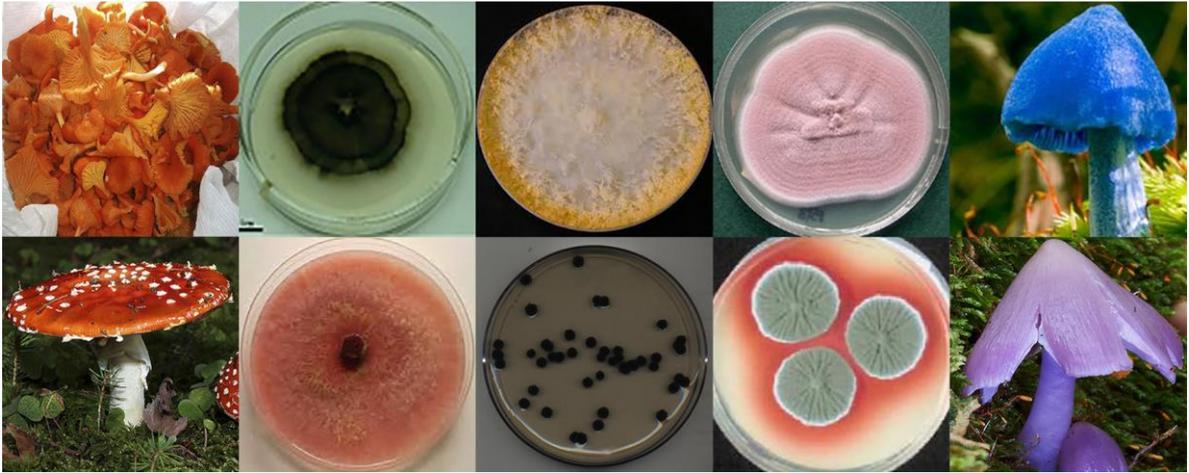


Figura 1.1.1. Diversidad de pigmentos en hongos.

Aunque la función biológica de muchos de los pigmentos no es clara, hay un gran interés en estos compuestos, debido a que pueden ser de importancia médica, industrial y/o agronómica (Calvo *et al.*, 2002).

Los pigmentos son moléculas que absorben la energía de la luz visible. El color de cada uno de ellos resulta de la absorción de ciertas longitudes de onda y la reflexión de otras (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

1.2. ¿Qué son las melaninas?

Las melaninas son pigmentos ampliamente distribuidos en los organismos. A partir de 1960 se sabe que se encuentran en los hongos (Langfelder *et al.*, 2003).

Las melaninas se han descrito como pigmentos oscuros, de color negro o marrón; si bien pueden presentar otras tonalidades. El término melanina hace referencia a un conjunto de sustancias, las que son consideradas como un grupo específico de cromóforos con propiedades comunes (Langfelder *et al.*, 2003). Las melaninas son, polímeros complejos sintetizados por la polimerización de compuestos de tipo indol o fenol. Las melaninas son moléculas con alto peso molecular, estables, insolubles en agua (soluciones acuosas) y solventes orgánicos, amorfas, con carga negativa, resistentes al ataque con ácidos pero susceptibles a la degradación con

bases fuertes (Henson *et al.*, 1999; Nosanchuk & Casadevall, 2003; Langfelder *et al.*, 2003; Urán & Cano, 2008).

Si bien se conocen algunas de las características de estos compuestos, como su naturaleza polimérica, insolubilidad y carácter amorfo, poco se sabe sobre la síntesis de sus precursores y los mecanismos involucrados en el proceso de polimerización lo que ha dificultado la identificación precisa de su estructura química (Nosanchuk & Casadevall, 2003).

1.3. Diversidad de melaninas.

De acuerdo a los precursores que dan origen a estos polímeros se han descrito varios tipos de melaninas: eumelaninas, feomelaninas, alomelaninas, piomelaninas, melaninas glutaminil-4-hidroxibenceno (GHB), melaninas p-aminofenol (PAP) y melaninas catecol (Tabla 1.3.1).

a) Las melaninas derivadas de la 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) se conocen como **eumelaninas** y son de color negro o marrón. Estas son características de los animales (piel, pelo y ojos) y de los hongos pertenecientes al phylum Basidiomycota. Estas melaninas son polímeros de dopaquinona, un intermediario altamente reactivo, cuya síntesis proviene de la oxidación del aminoácido tirosina, por medio de la enzima tirosinasa (Butler & Day, 1998; Figura 1.3.1).

b) Las melaninas amarillas o rojas se conocen como **feomelaninas**. Este grupo de pigmentos se forma también a partir de L- DOPA que incorpora grupos tioles de la cisteína o el glutatión y que forman principalmente cisteinildopa. Esta molécula vía reacciones espontáneas e involucrando como intermediario a la benzotiacina genera una estructura polimérica, la feomelanina (Wakamatsu & Ito, 2002).

Existe otro tipo de melanina, la neuromelanina, que es una mezcla de eumelaninas y feomelaninas, que se sintetiza a nivel del cerebro humano (Wakamatsu & Ito, 2002; Solano, 2014).

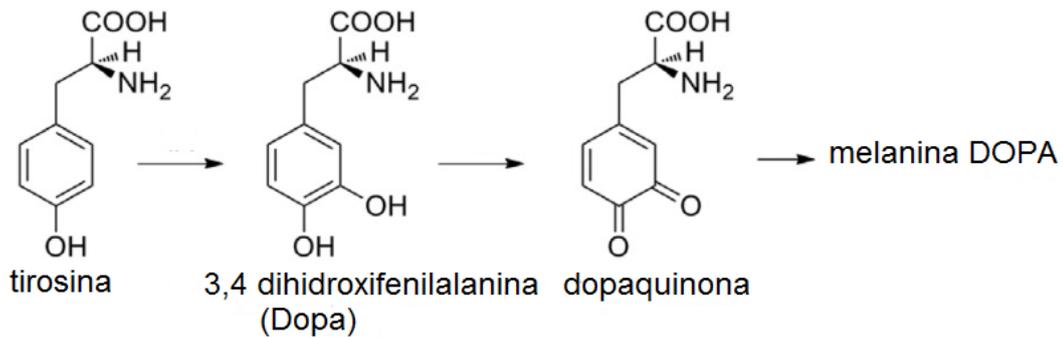


Figura 1.3.1. Ruta de síntesis de la melanina DOPA (Nosanchuk & Casadevall, 2003).

c) Las **alomelaninas** son también de color negro o marrón. Se conocen también como melaninas dihidroxinaftaleno (DHN) y derivan a partir de acetatos por la vía iniciada por la enzima policétido sintasa (Nosanchuk & Casadevall, 2003 y 2006; Kogej *et al.*, 2004; Urán & Cano, 2008; Figura 1.3.2). El precursor acetil-CoA o malonil-CoA forma por unión y ciclación de cinco de estos precursores la estructura de un anillo naftaleno base (Butler & Day, 1998). Esta reacción es catalizada por la enzima policétido sintasa (PKS) que genera 1,3,6,8 tetrahidroxinaftaleno (1,3,6,8 THN), una molécula que es reducida por la acción de una reductasa específica para producir escitalona. Posteriormente, la deshidratación de este intermediario forma 1,3,8 trihidroxinaftaleno (1,3,8 THN), el cual es reducido por una segunda reductasa a vermelona, el cual por la acción de una escitalona deshidratasa forma el 1,8-DHN, que es el monómero de este tipo de melanina (Eisenman & Casadevall, 2012). No hay consenso sobre el mecanismo de polimerización de las moléculas de 1,8-DHN ni tampoco sobre las enzimas que inician el proceso de polimerización, aunque una hipótesis es que participan fenoloxidasas. Este tipo de melanina se encuentra en representantes del phylum Ascomycota.

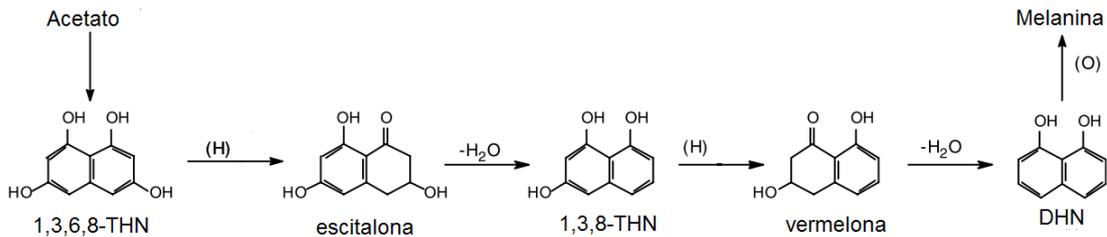


Figura 1.3.2. Ruta de síntesis de la melanina DHN (Kogej *et al.*, 2004).

d) Asimismo otros tipos de melaninas menos estudiadas son: las piomelaninas, las melaninas glutaminil-4-hidroxicincolina (GHB), las melaninas p-aminofenol (PAP) y las melaninas catecol.

Las **piomelaninas** que también son de color marrón, se sintetizan a partir del ácido homogentísico. Este metabolito deriva de la tirosina a través de una reacción de transaminación que forma el ácido p-hidroxifenilpirúvico, el cual es descarboxilado a p-hidroxiacetaldehído, que por oxidación genera ácido p-hidroxifenilacético, el cual es posteriormente oxidado a ácido homogentísico (Carreira *et al.*, 2001). La principal diferencia de este tipo de melaninas con las melaninas DHN y DOPA es que las piomelaninas son solubles (van de Sande *et al.*, 2007). Mientras que las piomelaninas se han asociado principalmente a bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (Yabuuchi & Ohyama, 1972), *Shewanella algae* (Turick *et al.*, 2002) y *S. colwelliana* (Coon *et al.*, 1994), también se han reportado en la levadura *Yarrowia lipolytica* (Ascomycota; Carreira *et al.*, 2001), en el patógeno humano *Madurella mycetomatis* (Ascomycota; van de Sande *et al.*, 2007), en *Aspergillus fumigatus* (Ascomycota; Schmalzer-Ripcke *et al.*, 2009) así como en *Cryptococcus neoformans* (Basidiomycota), siendo en los últimos dos casos dependiente del ácido homogentísico suplementado al medio (Frasés *et al.*, 2007).

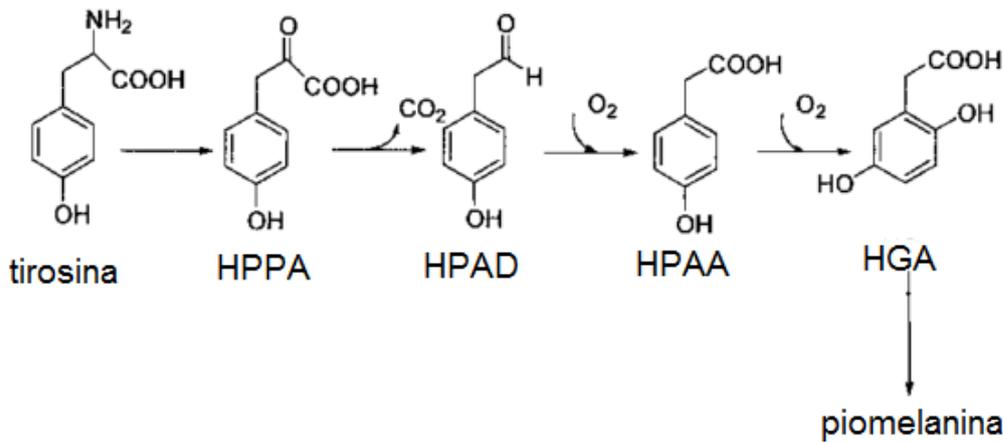


Figura 1.3.3. Ruta de síntesis de la piomelanina. HPPA, ácido p-hidroxifenilpirúvico, HPAD, p-hidroxifenilacetaldehído, HPA, ácido p-hidroxifenilacético, HGA, ácido homogentísico (Carreira *et al.*, 2001).

Las melaninas glutaminil-4-hidroxibenceno (GHB) también son de color marrón, se sintetizan a partir del precursor GHB, el cual deriva de la vía del shikimato. GHB es convertido por la acción de tirosinasas a glutaminil-3,4-dihidroxibenceno (GDHB) que luego se polimeriza (Figura 1.3.4 a). Este tipo de melanina se encuentra en las esporas de *Agaricus bisporus* (Basidiomycota; Butler & Day, 1998; Weijn *et al.*, 2013).

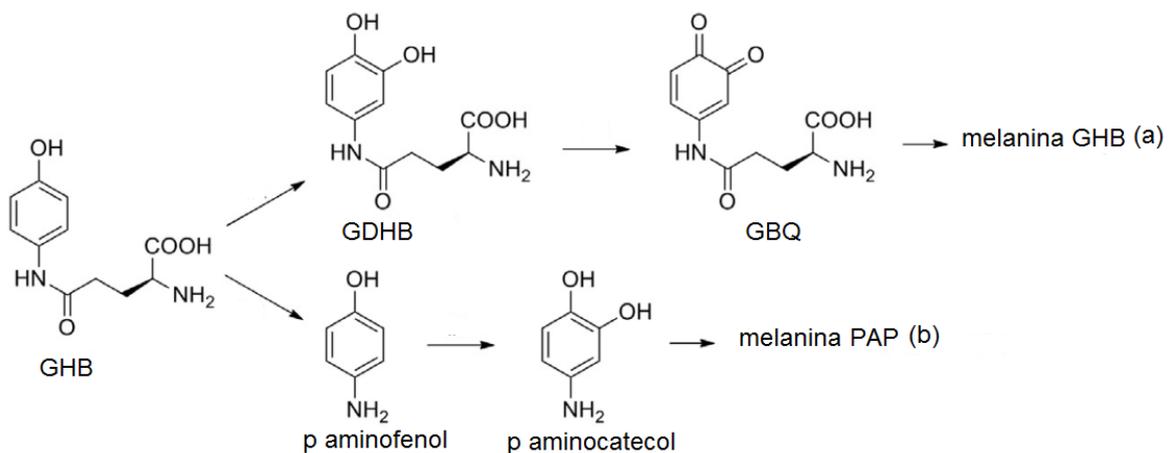


Figura 1.3.4. Ruta de síntesis de la melanina GHB (a) y PAP (b; Weijn *et al.*, 2013).

Las melaninas p-aminofenol (PAP) también se sintetizan a partir del precursor GHB derivado de la vía del ácido shikímico. En este caso el GHB es convertido por la actividad de glutaminiltransferasas en p-aminofenol y éste por acción de la tirosinasa

se transforma a p-aminocatecol, que luego se polimeriza (Figura 1.4 b). Estas melaninas se han encontrado en *Agaricus bisporus* (Weijn *et al.*, 2013).

Otras melaninas son las que tienen como precursor al catecol, del cual se desconoce su biosíntesis, aunque una hipótesis es que sería vía ácido shikímico (Bell & Wheeler, 1986; Chen *et al.*, 2015). Estas melaninas se sintetizan a partir del catecol que por la actividad de enzimas tirosinasas lo transforman a benzoquinona, un intermediario que luego se polimeriza espontáneamente (Figura 1.3.5). Este tipo de melaninas se encuentran en *Agaricus bisporus* (Solano, 2014), en las esporas de *Ustilago maydis* (Weijn *et al.*, 2013), en *Inonotus obliquus*, en *Phellinus robustus*, (Babitskaya & Shcherba, 2002), en *Rhizoctonia solani* (Frasas *et al.*, 2007) y en plantas (Schmaler-Ripcke *et al.*, 2009).

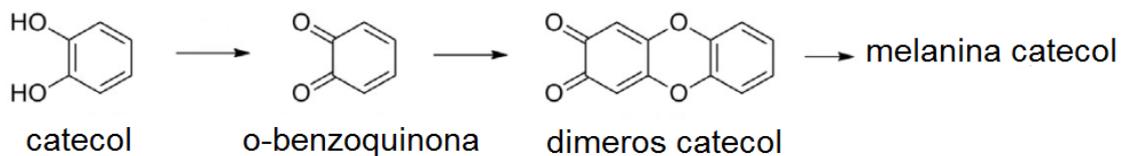


Figura 1.3.5. Ruta de síntesis de la melanina catecol (Weijn *et al.*, 2013).

Bell & Wheeler (1986) también mencionaron un grupo adicional de melaninas fúngicas que denominaron melaninas heterogéneas. Estas son pigmentos oscuros que se pueden encontrar en el medio extracelular de cultivo y que se forman a partir de fenoles solubles y la acción de enzimas (como tirosinasas, lacasas, peroxidases) secretadas por los hongos al medio. También se ha encontrado que en algunas especies de hongos las condiciones de cultivo y los componentes del medio conducen a la síntesis de diferentes tipos de melanina tal como en *C. neoformans*, el cual puede sintetizar melanina DOPA o piomelanina, siendo esta última detectada si se agrega ácido homogentísico al medio de cultivo donde el hongo crece (Frasas *et al.*, 2007). *Aspergillus fumigatus* sintetiza melanina DHN en los conidios (cuya síntesis es determinante de la virulencia) y piomelanina si se agrega el precursor al medio de

cultivo (Schmaler-Ripcke *et al.*, 2009). *Agaricus bisporus* sintetiza melanina GHB, melanina PAP, melanina catecol y melanina DOPA (Weijn *et al.*, 2013).

Tipos de melaninas	Precursor de la vía	Precursor fenólico inmediato al polímero	Color	Enzimas*
Eumelanina	tirosina	Dopa	negro-marrón	T
Feomelanina	tirosina	Dopa	amarillas-rojas	T
Alomelanina	acetil-CoA o malonil-CoA	DHN	negro-marrón	PKS, R, DH, O?
Piomelanina	tirosina	ácido homogentísico	marrón	TA, DC, O
GHB	GHB	GDHB	marrón	T
PAP	GHB	p-aminocatecol	marrón	GT T
Catecol	catecol	catecol	marrón	T

Tabla 1.3.1.Tipos de melaninas.

*Enzimas involucradas: T tirosinasas, PKS policetido sintasas, R reductasas, DH deshidratasas, TA transaminasas, DC descarboxilasas, O oxidasas, GT glutaminiltransferasas.

1.4. Características y propiedades de las melaninas.

Las melaninas presentan características que le son propias. Los polímeros esenciales para la vida de los organismos tales como proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos están químicamente bien caracterizados. Estos compuestos poseen diferentes unidades monoméricas, conectadas a través de enlaces covalentes específicos e hidrolizables, los cuales son separados fácilmente por métodos químicos o enzimáticos (Wakamatsu & Ito, 2002).

La lignina y los pigmentos como melaninas están compuestos por diferentes unidades monoméricas que se asocian radicalariamente generando enlaces covalentes carbono-carbono no hidrolizables, lo que les proporciona una considerable resistencia estructural que dificulta su caracterización y degradación (Wakamatsu & Ito, 2002).

Gran parte del conocimiento de las propiedades químicas del polímero melanina derivan de estudios realizados en la melanina sintética o en la melanina animal DOPA, la cual a diferencia de la melanina DHN, contiene nitrógeno y grupos carboxilo (Henson *et al.*, 1999). La implicancia de la melanina DOPA en cánceres de piel y en trastornos cerebrales, como la enfermedad de Parkinson, explica la gran cantidad de publicaciones sobre la estructura y bioquímica de las melaninas DOPA (1500 publicaciones sobre melaninas DOPA se pueden encontrar en la base de datos Scopus, mientras que solo 80 trabajos se citan sobre melaninas DHN). Debido a que las melaninas DOPA contienen estructuras aromáticas y grupos hidroxilos, estos compuestos han sido estudiados utilizando numerosas técnicas analíticas que sirvieron para cuantificarlos y caracterizarlos químicamente. Esta estrategia puede ser también de utilidad en el estudio de las melaninas DHN puesto que ellas también tienen en su estructura anillos aromáticos y grupos funcionales como hidroxilo (Henson *et al.*, 1999).

La mayor parte de los estudios de caracterización de las melaninas resulta del análisis físico-químico que incluye: espectroscopía UV-visible, espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (RPE), espectroscopía de resonancia paramagnética nuclear (RMN) en estado sólido (Duff *et al.*, 1988; Eisenman & Casadevall, 2012), y evaluación de la solubilidad del pigmento (en agua, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, solventes orgánicos, como etanol, metanol, acetona, cloroformo, hexano, acetato de etilo y benceno). Además estos pigmentos se pueden caracterizar con pruebas químicas como el ataque oxidativo (blanqueo) que utiliza agentes oxidantes (como peróxido de hidrógeno, permanganato de potasio, hipoclorito de sodio) y la realización de reacciones con cloruro férrico, ferricianuro de potasio y solución de nitrato de plata amoniacal (Kumar *et al.*, 2011).

Ajeno al tipo de precursor involucrado en la síntesis de melanina, este polímero está constituido por una mezcla estabilizada de quinonas, hidroquinonas y semiquinonas. Este tipo de organización estructural de grupos funcionales con diferentes estados rédox en resonancia con los dobles enlaces del anillo bencénico de sus unidades componentes determina la capacidad de las melaninas para absorber energía (Bell & Wheeler, 1986). Por ello, la melanina es uno de los pocos radicales libres estables conocidos, que puede actuar como esponja frente a otros radicales libres que resultan del estrés ambiental (Bell & Wheeler, 1986). Los radicales libres de la melanina pueden determinarse por espectroscopía de RPE, una técnica que detecta a estos radicales como partículas paramagnéticas.

Bertazzo *et al.* (1995) reportaron que la melanina DOPA del pelo humano, es una estructura constituida por oligómeros de entre 1,5 y 9 kDa. La determinación del tamaño de las melaninas naturales se dificulta por las moléculas asociadas y la interacción con las matrices. Por medio de la utilización de RMN en estado sólido Eisenman & Casadevall (2012) demostraron que la melanina purificada desde *C. neoformans* está unida covalentemente con polisacáridos que componen la pared celular. Recientemente Beltrán-García *et al.* (2014), utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF, reportaron una masa molecular no superior a 8000 Da para una melanina purificada de *Mycosphaerella fijiensis*, con 50 unidades componentes de 161,8 Da, un valor muy cercano a la masa teórica del monómero DHN.

A pesar de estas limitaciones, las características químicas de las melaninas se pueden inferir a través de la identificación de algunos de los intermediarios de la ruta de su síntesis mediante la utilización de técnicas como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC; Wakamatsu & Ito, 2002; Urán & Cano, 2008).

Otra estrategia en el estudio de melaninas es a través del uso de anticuerpos monoclonales que suelen tener reacción cruzada con melaninas de diferentes microorganismos (Urán & Cano, 2008).

Asimismo, existen alternativas metodológicas en la detección y caracterización de las melaninas, tales como las que involucran el uso de métodos de reducción de plata como Warthin–Starry o Fontana–Massons (Bell & Wheeler, 1986), y su interacción con el colorante azul A, el cual se puede usar para tinciones histológicas diagnósticas (Butler & Lanchance, 1986). La localización de la melanina se puede también realizar con microscopía de fluorescencia acoplada a reacciones oxidativas con peróxido de hidrógeno y luz que permite la detección indirecta de la melanina por la liberación de productos de degradación fluorescentes (Kayatz *et al.*, 2001).

1.5. Roles de las melaninas.

Las funciones de las melaninas resultan de sus propiedades físicas y químicas. Independientemente del tipo de melanina, estas propiedades están condicionadas por la estructura química y su organización a nivel molecular, supramolecular, así como por la capacidad de las mismas para formar agregados con proteínas o polisacáridos (Meredith & Sarna, 2006). Las melaninas se asocian con la resistencia a estreses generados por agentes físicos y químicos, con la patogénesis y la virulencia.

1.5.1 Resistencia a estreses ambientales.

Muchos microorganismos que sintetizan melaninas han sido asociado a ambientes estresantes, como desiertos o regiones alpinas, en base a esto se ha propuesto que las melaninas cumplen un rol de protección contra la energía radiante, el estrés impuesto por la pérdida de agua y las temperaturas extremas (Bell & Wheeler, 1986; Butler & Day, 1998).

Algunos hongos producen esporas melanizadas, éstas comparadas con unas hialinas, son más resistentes a la radiación UV, tal cual se ha demostrado en

aislamientos de *Alternaria alternata* (Kheder *et al.*, 2012), *Monilinia fructicola* (Rehnstrom & Free, 1996) y *Sporothrix schenckii* (Romero-Martinez *et al.*, 2000). Este comportamiento se ha asociado a la capacidad de las melaninas de absorber y disipar la energía de la radiación. Adicionalmente Bell & Wheeler (1986) consideraron que las melaninas protegen a la membrana citoplasmática del daño de la radiación.

Bell & Wheeler (1986) reportaron que los microsclerocios de mutantes albinos de *Verticillium dahliae* (Ascomycota) no sobrevivieron a la pérdida de agua, comparado a aquellos melanizados que resultaron latentes y capaces de germinar después de la hidratación del suelo. Estos resultados sugieren que las melaninas probablemente cumplen un rol clave en la supervivencia fúngica (Bell & Wheeler, 1986). En *M. fruticola* también se ha asociado a las melaninas a la protección contra la pérdida de agua (Rehnstrom & Free, 1996).

Ciertas estructuras melanizadas, como las hifas de *Gaeumannomyces graminis* (Ascomycota) y los conidios de *M. fruticola* (Ascomycota), toleran temperaturas más altas comparado a aquellas hialinas (Frederick *et al.*, 1999; Rehnstrom & Free, 1996). *Streptomyces galvus* (Actinobacteria) produce melaninas sólo cuando las temperaturas son muy elevadas (42–47°C), lo que además es acompañado por un incremento de hasta el 100% en el espesor de la pared celular (Filippova *et al.*, 1986). Es posible que los radicales libres de las melaninas atrapen el oxígeno liberado de sus membranas con el calentamiento y de esta manera protejan a las células (Jacobson, 2000; Urán & Cano, 2008).

Las melaninas también inmovilizan moléculas orgánicas e inorgánicas. Esto se debe a interacción de tipo iónica o covalente entre los grupos hidroxilo del anillo aromático de la estructura de la melanina con proteínas, polisacáridos, metales pesados, pesticidas y contaminantes (Henson *et al.*, 1999; Caesar-Tonthat *et al.*, 1995; Fogarty & Tobin, 1996; Solano, 2014). Se ha propuesto que distintos compuestos orgánicos con diferente acción biológica pueden asociarse con las melaninas a través

de reacciones rédox (Larsson & Tjälve, 1979). Debido a las propiedades rédox de la melanina, ésta puede actuar como aceptor o donador de electrones (Jacobson *et al.*, 1995; Henson *et al.*, 1999).

Asimismo, la interacción entre el ligando y la melanina depende de las condiciones fisiológicas del sistema (Butler & Day, 1998). Se ha reportado que los grupos funcionales de las melaninas que inmovilizan cobre cambian con el pH. Mientras que a un pH de 5 el cobre se une principalmente a los grupos carboxilos en la melanina catecol, los grupos hidroxifenilo son los que interactúan con el cobre a pH superiores a 6 (Fogarty & Tobin, 1996). Esto se ha asociado con la supervivencia fúngica bajo ciertas condiciones de cultivo. Si los metales son tóxicos para el organismo, la melanina puede bloquear su ingreso en la célula. Si ellos son esenciales para el metabolismo del hongo y están presentes en bajas cantidades en el medio, las melaninas pueden incrementar su disponibilidad (Butler & Day, 1998; Langfelder *et al.*, 2003). Algunas melaninas fúngicas son eficientes quelantes de cobre y algunos hongos producen más melanina en respuesta al nivel de cobre en el medio (Caesar-Tonthat *et al.*, 1995; Butler & Day, 1998).

1.5.2 Patogénesis y virulencia.

Las melaninas también han sido asociadas a la virulencia y/o la patogénesis de muchos hongos (Elliot *et al.*, 1995; Henson *et al.*, 1999). Uno de los roles más importantes probablemente es proteger a los componentes estructurales de la pared celular del hongo frente a la acción de enzimas hidrolíticas como glucanasas y proteasas liberadas por el hospedante. Las melaninas, además de inactivar estas hidrolasas, impiden el contacto físico y su interacción con el sustrato (Jacobson, 2000).

Estudios realizados en *Aspergillus nidulans* (Ascomycota; Kuo & Alexander, 1967), *M. fructicola* (Ascomycota; Rehnstrom & Free, 1996) y *Venturia inaequalis*

(Ascomycota, Hignett & Kirkham, 1967) confirman el rol protector de la melanina frente a la digestión de la pared celular fúngica por enzimas hidrolíticas. Asimismo, cuando las paredes celulares de hongos pigmentados son atacadas por microorganismos, las zonas degradadas son las que están libres o presentan menos melanina (Bell & Wheeler, 1986; Plonka & Grabacka, 2006).

Las melaninas fúngicas también han sido relacionadas con la patogénesis en plantas, como en el caso de *Colletotrichum lagenarium* el agente causal de la antracnosis del poroto y *Magnaporthe grisea* agente causal del tizón del arroz y en humanos, por ejemplo *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* y *Wangiella dermatitidis*. En *M. grisea* la melanina se localiza entre la membrana plasmática y la pared del apresorio, específicamente en la hifa modificada que permite la penetración en la cutícula de las células de la epidermis. En el apresorio se acumula el glicerol y así genera una baja del potencial agua, la que al ingresar genera una alta presión de turgencia que favorece la penetración de la cutícula por parte de la hifa infectiva, proceso que se ha demostrado es clave en la infección. Mutantes deficientes en melaninas no generan bajas de potencial que resulten en aumentos de turgencia en el apresorio y no son patogénicos (Langfelder *et al.*, 2003). Aunque algunos hongos como *A. alternata*, producen melanina DHN en su apresorio, se cree que ésta no se requiere para la penetración del hospedante ya que mutantes deficientes en melaninas no pierden su capacidad patogénica (Langfelder *et al.*, 2003). En los patógenos de humanos se cree que la melanina protege a las hifas y conidios, del sistema inmune del huésped, por medio de la inactivación de las especies reactivas de oxígeno o bloqueando la fagocitosis (Nosanchuk & Casadevall, 2003). En *C. neoformans* (Basidiomycota) cuando el hospedante es atacado por el patógeno, libera como parte de su mecanismo de defensa compuestos con actividad oxidativa y la melanina fúngica sería una respuesta a ese mecanismo de defensa (Jacobson & Tinnell, 1993). En patógenos de plantas, también la melanina protege al hongo de los radicales libres

de oxígeno que la planta genera como parte de su mecanismo de defensa (Henson *et al.*, 1999).

1.6. Sitios de deposición.

Como la melanina contiene grupos químicos reactivos y su síntesis involucra la formación de compuestos fenólicos y quinonas, muchos de éstos potencialmente tóxicos para el organismo, su formación en animales usualmente está restringida a compartimentos celulares, como los melanocitos (Franzen *et al.*, 2008; Bellono & Oancea, 2014). Estas células especializadas sintetizan las melaninas en organelas llamadas melanosomas y son transportadas a través de prolongaciones de los melanocitos hacia las células vecinas. En contraste, las melaninas de bacterias y hongos se asocian y localizan extracelularmente a nivel de la pared celular, a veces como una capa definida y otras veces como gránulos en la superficie celular. También pueden encontrarse como polímeros libres en los líquidos extracelulares de cultivos fúngicos (Bell & Wheeler, 1986).

Aunque es escasa la información disponible sobre la localización de la ruta de síntesis de la melanina fúngica, la naturaleza extracelular de la deposición de melanina en hongos es característica (Plonka & Grabacka, 2006).

Los hongos producen melanina en hifas y en otras estructuras diferenciadas tanto de resistencia y/o de dispersión como clamidosporas, esclerocios, conidios y apresorios, estructuras que de esta manera adquieren rigidez y contribuyen con su rol en el ciclo de vida del hongo (Bell & Wheeler, 1986).

1.7. Aplicaciones.

Las propiedades de las melaninas determinan que éstas tengan uso potencial en varias industrias así como en el campo de la medicina y biorremediación (Solano, 2014; Tarangini & Mishra, 2014).

Goncalves & Pombeiro-Sponchiado (2005) sugieren a la melanina de *Aspergillus nidulans* como un material prometedor para la industria cosmética en fórmulas que protejan la piel contra el posible daño oxidativo, ya que ésta resultó eficiente inactivando el ácido hipocloroso, un agente oxidante modelo. También es de interés su aplicación en cremas de protección solar (Tarangini & Mishra, 2014).

Las melaninas son un sistema estabilizado de radicales libres, que neutralizan los efectos deletéreos de la radiación confiriendo protección (Schweitzer *et al.*, 2009). Puesto que los tratamientos médicos que utilizan rayos en terapias de pacientes con cáncer dañan la médula ósea, provocando un debilitamiento general, este rol radioprotector de la melanina tiene una potencial utilidad en medicina. En este sentido, experimentos realizados con ratones como modelo demostraron que la melanina protege la médula ósea de los efectos de los rayos (Eisenman & Casadevall, 2012).

Las melaninas son hidrofóbicas y tienen carga negativa, lo cual les permiten unirse a un amplio espectro de sustancias. Basado en esto muchos hongos melanizados han sido propuestos como buenos candidatos en biorremediación, ya que estos organismos pueden ser efectivos en la remoción de metales pesados. El potencial de las melaninas fúngicas como agente detoxificador de sitios contaminados se ha asociado a su presencia en líquenes desarrollados en minas abandonadas con niveles elevados de metales pesados (Eisenman & Casadevall, 2012).

Por otro lado, además de las funciones biológicas, la naturaleza radicalaria de la melanina sugiere un potencial de estos polímeros como un semiconductor con interesantes propiedades biofísicas, por lo que se lo propuso también para nuevas aplicaciones biotecnológicas (Solano, 2014).

1.8. *Pseudocercospora griseola*: un hongo bajo estudio

Pseudocercospora griseola (Sacc.) Crous & U. Braun (estado anamórfico del género *Mycosphaerella*) pertenece al phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina, clase Dothideomycetidae, orden Capnodiales, familia Mycosphaerellaceae. Este hongo es el agente causal de la mancha angular, una enfermedad que causa severas pérdidas de rendimiento y por lo tanto económicas en los cultivos de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) en el NO argentino, como así también en muchos otros centros de producción a nivel mundial (Schwartz & Gálvez, 1980; Schwartz *et al.*, 1982; Cardona *et al.*, 1997; Balbi *et al.*, 2009). Entre las enfermedades fúngicas que afectan la producción de poroto en la región de cultivo de la Argentina, la mancha angular del poroto es la que presenta una mayor distribución, entre las enfermedades fúngicas, representa el 70-80% del total de las mismas (Stenglein *et al.*, 2003).

Este hongo pigmentado desarrolla conidióforos macronematosos, mononematosos y cespitosos o sinematosos. Los sinemas presentan color marrón que puede virar hacia el negro, de 100-500 μm de largo por 20-70 μm de ancho (Crous *et al.*, 2006). La célula conidiógena, tiene proliferación simpodial, integrándose hacia el ápice del conidióforo. Los conidios se forman holoblásticamente hacia el ápice de la célula conidiógena. Estos conidios son acrógenos, convirtiéndose en acropleurógenos, solitarios, cilíndricos a obclavados, redondeados hacia el ápice, truncados hacia la base, usualmente curvados, de color marrón oliváceo, con 1-6 septos, de 30-70 μm de largo por 1,5-8 μm de ancho (Schwartz & Pastor-Corrales, 1982; Stenglein *et al.*, 2003; Crous *et al.*, 2006; Herrera & Ascencio, 2015). Cuando *P. griseola* es cultivado en medios de cultivo es de crecimiento lento y produce pocos conidios. Las colonias comienzan a esporular a los 6-10 días de crecimiento y la conidiación es mayor en oscuridad total o con 12 h de luz (Schwartz *et al.*, 1982; Stenglein *et al.*, 2006).

Los conidios de *P. griseola* pueden germinar por cualquiera de los ápices, e incluso por los lados de estos (Monda *et al.*, 2001). Los tubos germinativos de los conidios que germinan sobre la superficie foliar de una planta susceptible de poroto crecen inicialmente entre las células epidérmicas, penetrando a través de los estomas. Luego, las hifas crecen entre los espacios intercelulares del parénquima en empalizada de la hoja, destruyendo las células pero sin penetrar en las nervaduras. Una vez que la hifa creció y colonizó los espacios intercelulares de la hoja, los conidióforos emergen a través de los estomas (Monda *et al.*, 2001). Los sinemas, asociación formada por los conidióforos, aparecen generalmente en la cara abaxial de las hojas (Monda *et al.*, 2001). El ciclo de la mancha angular del poroto es, como en otras enfermedades, el resultado de la interacción del hospedante, el patógeno y el ambiente del patosistema. Stenglein *et al.* (2003) propuso el siguiente esquema:



Figura 1.8.1. Ciclo de la mancha angular del poroto. (a) Manchas típicas de la enfermedad. (b, c) Sinemas observados con microscopio óptico. (d) Esporas observadas con microscopio óptico.

Como otros patógenos de *P. vulgaris*, *Pseudocercospora griseola*, evolucionó en paralelo con su hospedante, diversificándose en dos grandes grupos génicos o formas intraespecíficas: un grupo "Andino" (*P. griseola* f. *griseola*) y un grupo "Mesomericano" (*P. griseola* f. *mesoamericana*; Crous *et al.*, 2006).

Experimentos preliminares realizados por Saparrat *et al.* (2009) mostraron que el color oscuro de las colonias de dos aislamientos representativos de *P. griseola* correspondientes a los grupos génicos Andino y Mesoamericano no es afectado por el tratamiento con ácidos fuertes y por el calor. Aunque se reportó la capacidad de *P. griseola* para sintetizar melaninas de tipo DHN en base a ensayos de inhibición, no hay datos sobre la naturaleza físico-química de estos pigmentos ni se conoce como es la síntesis y menos aún como está regulada la misma, así como tampoco el rol que ellas cumplen en el hongo (Saparrat *et al.*, 2009).

Hipótesis de trabajo:

La supervivencia, virulencia y patogénesis de *P. griseola* está asociada a la capacidad de síntesis de pigmentos oscuros lo que además parece estar relacionado con el pool génico de origen.

Objetivo general:

Analizar la capacidad de los aislamientos de *Pseudocercospora griseola* correspondientes a los grupos génicos Andinos y Mesoamericanos para sintetizar melanina, las características de los pigmentos y el rol biológico que cumplen.

Objetivos específicos:

1. Evaluar, la variabilidad del crecimiento y la pigmentación en representantes de los grupos génicos, Andinos y Mesoamericanos, de *P. griseola* en medios de cultivo sólidos.
2. Localizar el pigmento melanina en las estructuras de los hongos representantes de los dos grupos génicos de *P. griseola* Andino y Mesoamericano utilizando técnicas microscópicas.
3. Caracterizar las melaninas de aislamientos seleccionados de *Pseudocercospora griseola* de ambos grupos génicos en base a técnicas espectroscópicas. Evaluar su rol como secuestrante de agentes oxidantes y metales.
4. Detectar actividad PKS involucrada en la síntesis de los monómeros de las melaninas en *P. griseola*.
5. Detectar actividad de enzimas oxidativas extracelulares.
6. Conocer y analizar la secuencia PKS en *P. griseola* y relacionarla con las secuencias de otros hongos.

7. Estudiar el comportamiento de dos aislamientos de *Pseudocercospora griseola*, uno de cada grupo génico y que difieren en su contenido de melanina, cuando son expuestos a diferentes condiciones de cultivo.

CAPITULO II. Variabilidad morfológica y deposición de melaninas en representantes de los grupos génicos de *Pseudocercospora griseola*.

2.1. Introducción

El término biodiversidad implica la variedad y variabilidad de los seres vivos y de los ecosistemas que estos integran. La misma abarca los distintos ecosistemas, especies, genes y su abundancia relativa (Crisci, 2001). Se estima que el número de especies fúngicas reconocidas hasta el momento es de 1,5 millones (Hawksworth, 2004), existiendo ejemplos representativos de especialización fisiológica entre representantes pertenecientes a una especie fúngica determinada (Elíades *et al.*, 2015).

Aunque existen procesos que generan variabilidad genética en los hongos que no diferencian estructuras sexuales (denominados anamorfos) tales como la mutagénesis y los ciclos parasexuales (Paccola-Meirelles & Azevedo, 1991), la reproducción sexual y sus estructuras diferenciadas son características diagnósticas en la designación de grupos taxonómicos de hongos, incluso cuando éstas están también sujetas a variación (Hibbett *et al.*, 2007). Esta caracterización de algunos hongos pleomorfos en base a rasgos asexuales es también dependiente de las condiciones de cultivo (Webster & Weber, 2007). La identificación molecular de estos hongos anamorfos es hoy en día una herramienta que facilita la asociación de dos o más estados morfológicos de un hongo aun cuando éstos no tienen valor taxonómico. La reproducción sexual da variabilidad, en el caso de organismos que no se reproducen sexualmente la variabilidad es menor (Burdon & Silk, 1997).

Pseudocercospora griseola es un hongo anamorfo, patógeno de poroto. Aunque no se ha reportado su asociación a algún teleomorfo (fase sexual), numerosos estudios han demostrado un alto grado de variabilidad de este hongo a nivel genético,

morfológico y fisiológico, incluso entre y dentro de una población (Guzmán *et al.*, 1995; Stenglein, 2007; Ddamulira *et al.*, 2014). La coexistencia en la naturaleza de las plantas hospedantes y sus patógenos sugiere que éstos han coevolucionado (Araya, 2003; Stenglein, 2007). La virulencia de los patógenos debe cambiar en busca de un equilibrio con la resistencia de los huéspedes, y viceversa, para que permita la supervivencia del patógeno y del hospedante (Stenglein, 2007). El poroto es una especie vegetal que se diferencia en dos grupos génicos, Andino y Mesoamericano, los cuales presentan diferencias morfológicas y bioquímicas, algunas de las características son de carácter adaptativo en relación con determinados hábitats (Araya, 2003; Galvan, 2006). En este sentido, existen entre las plantas pertenecientes a cada uno de estos grupos marcadas diferencias en las respuestas a la temperatura y el fotoperíodo (Galvan, 2006). Varios patógenos de *P. vulgaris*, como *P. griseola*, agente causal de la mancha angular del poroto, *Colletotrichum lindemuthianum* (phylum Ascomycota), agente causante de la antracnosis de poroto, y el organismo causal de la roya del poroto, *Uromyces appendiculatus* (phylum Basidiomycota), han evolucionado con el huésped y como en el caso del poroto, los patógenos se dividen en dos grupos: Andinos y Mesoamericanos (Araya, 2003; Crous *et al.*, 2006). En el patosistema del poroto, los patógenos tienen mecanismos de variabilidad genética que aceleran el proceso de adaptación a las diferentes condiciones ecológicas en las que se desarrolla el cultivo (Burdon & Silk, 1997).

Los hongos, durante su crecimiento y cuando diferencian estructuras reproductivas, sintetizan compuestos y generan estructuras hialinas y/ o pigmentadas.

Los pigmentos conocidos como melaninas son un grupo de metabolitos secundarios que están ampliamente distribuidos en los hongos dematiáceos. La presencia de estructuras pigmentadas en hongos puede tener estrecha relación con el rol que éste tiene en la naturaleza. Por ejemplo, *Colletotrichum* spp. y *Magnaporthe* spp. (phylum Ascomycota) son hongos que solo infectan a la planta huésped, poroto y

arroz respectivamente, si su apresorio está melanizado (Howard & Valent, 1996; Butler & Day, 1998).

En muchos hongos y bacterias estos pigmentos oscuros se localizan en la pared celular, ya sea formando parte de la matriz de la estructura interna de la pared o como una capa externa de la misma (Bell & Wheeler, 1986). En cultivos líquidos fúngicos estos pigmentos se han encontrado en suspensión como polímeros extracelulares formados en el medio (Bell & Wheeler, 1986). Esto puede resultar de la actividad de fenoloxidasas que el hongo secreta al medio líquido y de la polimerización de compuestos fenólicos secretados en el medio y otros componentes disponibles en el mismo que pueden autooxidarse para formar gránulos de melaninas (Bell & Wheeler, 1986; Saparrat *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2011). Sin embargo Butler & Day (1998), Langfelder *et al.* (2003) y Butler *et al.* (2009) han postulado que los gránulos de melanina dispersos en los cultivos incubados en agitación son el resultado de la ruptura de la matriz de la pared celular del hongo. Asimismo, San-blas *et al.* (1996) y Franzen *et al.* (2008) reportan en los hongos *Cladosporium carrioni* (phylum Ascomycota), *Fonsecaea pedrosoi* (phylum Ascomycota) y *Hormoconis resiniae* (phylum Ascomycota) la presencia de estructuras membranosas intracelulares “melanosomas”, consideradas como, análogas a las vesículas donde se sintetizan y acumulan las melaninas en las células animales (Franzen *et al.*, 2008; Urán & Cano, 2008; Bellono & Oancea, 2014).

Los patógenos de humanos pertenecientes al phylum Ascomycota, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum* presentan hifas y conidios pigmentados, tal como se ha demostrado a través de inmunolocalización utilizando anticuerpos monoclonales (Youngchim *et al.*, 2011). A través de microscopía electrónica se encontró en *Thielaviopsis basicola* (phylum Ascomycota) que la melanina se localiza como un material granular electródenso en

la pared celular de hifas, clamidosporas y ocasionalmente en los conidios (Wheeler & Stipanovic, 1979).

La pared de las esporas de *Cladosporium cladosporioides* (phylum Ascomycota), *Epicoccum nigrum* (phylum Ascomycota) y *Humicola grisea* (phylum Ascomycota) está compuesta por dos capas, una interna electróntránsfida y otra externa electróntránsfida, donde se localiza la melanina (Ellis & Griffiths, 1974; Latgé *et al.*, 1988). Mientras que la pared primaria y el septo de los conidios de *Alternaria alternata* (phylum Ascomycota), un patógeno de varias especies de plantas, presentan depósitos de melanina tal como se identificó por inmunolocalización con anticuerpos M1, no se detectó esta señal en la pared secundaria del conidio ni en la pared de la hifa vegetativa. Estos estudios se confirmaron a través de la obtención de un mutante albino que carecía de melanina en la pared y el septo de conidio, y que mantenía el carácter hialino de sus hifas vegetativas como el aislamiento de partida (Carzaniga *et al.*, 2002). Por otro lado en *Sporothrix schenckii* (phylum Ascomycota) el agente causal de la esporotricosis, una infección en humanos, también se encontró, utilizando anticuerpos monoclonales (Mabs), que sintetiza melanina en los conidios, pero no en las hifas (Romero-Martinez *et al.*, 2000; Morris-jones *et al.*, 2003). Un patrón similar se ha descrito en otros hongos dimórficos patógenos de humanos como *Blastomyces dermatitidis* (phylum Ascomycota), *Coccidioides posadasii* (phylum Ascomycota; Taborda *et al.*, 2008), *Histoplasma capsulatum* (phylum Ascomycota; Nosanchuk & Casadevall, 2003) y *Paracoccidioides brasiliensis* (phylum Ascomycota; Gomez *et al.*, 2001).

Bell & Wheeler (1986) sugirieron el estudio de la localización de la melanina utilizando inhibidores específicos, a través de su agregado a concentraciones no tóxicas al medio donde se cultiva el hongo pigmentado. Entre los compuestos utilizados, se encuentran, el ácido kójico, la sulcotriona y el fungicida Triciclazole (5-metil-1,2,4-triazol (3,4) benzotiazol), según el tipo de melanina que el organismo

sintetice (melanina DOPA, piomelanina, melanina DHN, respectivamente). La presencia de este inhibidor en el medio de crecimiento elimina o disminuye la aparición de gránulos electróndensos en la pared celular del hongo, como los que suelen corresponderse con los gránulos de melaninas, lo que permite inferir la localización del pigmento por comparación con cultivos libre de inhibidores.

Existen datos de la variabilidad a nivel morfológico y genético de distintos aislamientos de *P. griseola* (Stenglein, 2007). No obstante, es escasa la información sobre la caracterización de los aislamientos de *P. griseola* en base a la pigmentación de sus colonias y a la localización de sus pigmentos oscuros, un rasgo que puede tener valor adaptativo en el comportamiento de estos hongos dematiáceos. En este sentido, Saparrat *et al.* (2009), estudiando un aislamiento representativo de cada grupo génico establecieron una asociación entre la pigmentación y el crecimiento de *P. griseola*. Puesto que existen diferencias en el crecimiento de *P. griseola* según el grupo génico de procedencia, la pigmentación puede ser otro carácter variable entre los aislamientos de *P. griseola* y que probablemente lo es también dentro del mismo grupo génico. Asimismo, este análisis de la variabilidad en *P. griseola* puede tener también alguna relación con la ultraestructura de la pared celular de los hongos y la deposición del pigmento.

Objetivos:

- Evaluar, la variabilidad del crecimiento y la pigmentación en representantes de los grupos génicos, Andinos y Mesoamericanos, de *P. griseola* en medios de cultivo sólidos.
- Localizar el pigmento melanina en las estructuras de los hongos representantes de los dos grupos génicos de *P. griseola*, Andino y Mesoamericano, utilizando técnicas microscópicas.

Hipótesis:

Los representantes Andinos y Mesoamericanos de *P. griseola* difieren en el crecimiento y la pigmentación de sus colonias. El pigmento se localiza en la pared celular de *P. griseola* independientemente del grupo génico al que pertenecen los aislamientos.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Aislamientos de *Pseudocercospora griseola*.

Se utilizaron 10 aislamientos pertenecientes a los 2 grupos génicos de *P. griseola* (Tabla 2.2.1). Mientras que 6 de estos hongos corresponden a aislamientos obtenidos y analizados por Stenglein (2007), Pg 1, Pg 15, Ecu 6 y Ecu 3 fueron colectados y caracterizados por el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).

Grupo génico	Aislamiento*	Fuente de procedencia
Andinos	Ecu 6	Ecuador
	J2a	Jujuy
	J1a	Jujuy
	S3b	Salta
	Ecu 3	Ecuador
Mesoamericanos	S6a	Salta
	T2	Tucumán
	PG1	Tucumán
	PG15	Tucumán
	T4	Tucumán

Tabla 2.2.1. Aislamientos de *P. griseola* utilizados.

*Cada letra indica la provincia de origen: T (Tucumán), S (Salta), J (Jujuy); los números contiguos indican una hoja infectada de un genotipo; la letra minúscula muestra diferentes manchas de una misma hoja (Stenglein, 2007).

2.2.2. Conservación de los aislamientos.

La conservación de los aislamientos axénicos se realizó en papel de filtro de acuerdo con Stenglein (2007). Para lo cual se colocaron en cajas de Petri con medio de cultivo sólido agar-extracto de papa-glucosa (APG, 200 g de papas peladas y cortadas + 20 g de glucosa + 20 g de agar + 800 ml de agua destilada estéril,

esterilizado en autoclave) trozos estériles de papel de filtro de 1 cm² sobre la superficie, las que se inocularon con una suspensión de conidios. Las cajas se incubaron a 24 °C en oscuridad durante 10 días hasta que el desarrollo micelial cubrió el papel. Luego, los trozos de papel se dejaron secar bajo condiciones axénicas durante 8-12 días a 24 °C, almacenándose los mismos en sobres estériles a - 20 °C. La recuperación de los aislamientos se realizó tomando un trozo de papel colonizado con *P. griseola*, al cual se le agregaron 5 gotas de solución conteniendo peptona al 10% y sacarosa al 20%, y se sembró en el medio de cultivo.

2.2.3. Inoculación y condiciones de cultivo de los hongos.

Como inóculo se utilizó una suspensión acuosa de 200 conidios, que se obtuvo de cultivos de los aislamientos crecidos sobre medio APG, estimándose su concentración mediante el uso de la cámara de Neubauer. Se sembró la suspensión de conidios, distribuyéndolos en la superficie de la placa de Petri, luego las placas se incubaron durante 21 días a 24 ± 2°C y en oscuridad. En todos los casos se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

2.2.4. Estimación del crecimiento micelial.

El crecimiento del hongo se determinó cuantificando cada 7 días el diámetro de 4 colonias por cada placa con el programa Sigma Scan Pro 5. Con este fin se tomaron fotos en los momentos de la determinación y en estas fotografías de las placas se realizaron las determinaciones del diámetro.

2.2.5. Análisis de la pigmentación de las colonias.

La pigmentación de las colonias se determinó midiendo los niveles de oscuridad (K; con el programa Adobe Photoshop versión 8.0.1), de imágenes digitalizadas según Griffith *et al.* (2007). Para ello, tres placas correspondientes a 7, 14 y 21 días de crecimiento fueron fotografiadas a una distancia de 30 cm. Sobre la imagen de cada placa se seleccionaron 4 colonias representativas y en la porción central de cada colonia se cortó un cuadrado de 2,5 mm² que se redujo a cuatro píxeles. El nivel de oscuridad (darkness, "K") se calculó, promediando cada uno de los cuatro valores correspondiente a cada pixel para obtener un único valor para cada placa. En el caso de colonias con diámetros menores a 2,5 mm la estimación del K se hizo a través de un único valor por colonia.

2.2.6. Análisis microscópicos de *P. griseola* en cultivos sólidos y en la presencia de Triciclazole.

A partir de cultivos de *P. griseola* en medio APG a 24 °C en oscuridad durante un período de 21 días, se preparó una suspensión de conidios de dos representantes de cada grupo génico, *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b) y *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4). Se procedió a sembrar una alícuota de 200 conidios en 20 ml de medio de cultivo APG (control) y APG suplementado con 100 mg/L de Triciclazole (Saparrat *et al.*, 2009), las que se incubaron en oscuridad a 24 °C. Los conidios y/o el micelio correspondiente a cultivos de 21 días se observaron al microscopio óptico (MO), electrónico de transmisión (MET) y confocal (MC).

Las muestras se analizaron en un microscopio óptico Olympus BX51 equipado con una cámara digital Olympus E-330 empleando un aumento de 60X. A partir de las fotografías se midió el ancho y largo de los conidios y también el ancho de las hifas con el programa Sigma Scan Pro 5.

Para los análisis al MET las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2% durante 2 h a 4° C y se lavaron con buffer fosfato. Luego se postfijaron con tetróxido de osmio al 1% durante 2 h a 4° C. Una vez postfijadas se lavaron con buffer fosfato y se deshidrataron en una serie de alcoholes desde 50 % (v/v) hasta alcohol absoluto y finalmente acetona. Posteriormente las muestras se infiltraron e incluyeron en resina epoxi durante 36 h a 35°, 50° y 60° C para su polimerización. Los cortes ultrafinos de 60 nm de espesor, se realizaron con un Ultramicrotomo Reichert-J Super Nova. Luego se montaron sobre grillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo al 1% y citrato de plomo (Kogej *et al.*, 2006). Se realizaron las observaciones en un Microscopio Electrónico JEOL JEM 1200 – EX II y las micrografías fueron tomadas con una cámara digital Erlangshen ES 1000W. Se tomaron medidas del espesor de la pared celular de 7-10 fotografías de MET con el programa Sigma Scan Pro 5.

Para detectar *in-situ* la melanina en la pared celular las muestras fueron preincubadas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 6M y luz por 1 h y analizadas al MC de acuerdo con Kayatz *et al.* (2001). Se realizaron las observaciones en un Microscopio Olympus FV300 CM (Olympus Latin America) equipado con un objetivo de inmersión 60X 1.2 N.A. La fluorescencia de los productos de la degradación oxidativa de la melanina a nivel de la pared celular fue detectada con un láser de 488 nm y un filtro de emisión de 505-525 nm. Puesto que las muestras no expuestas al peróxido de hidrógeno y a la luz también mostraron vesículas intracelulares autofluorescentes, la señal fluorescente de la pared celular y de las vesículas en muestras tratadas y no tratadas oxidativamente se procesó y cuantificó de acuerdo a Ricardi *et al.* (2012).

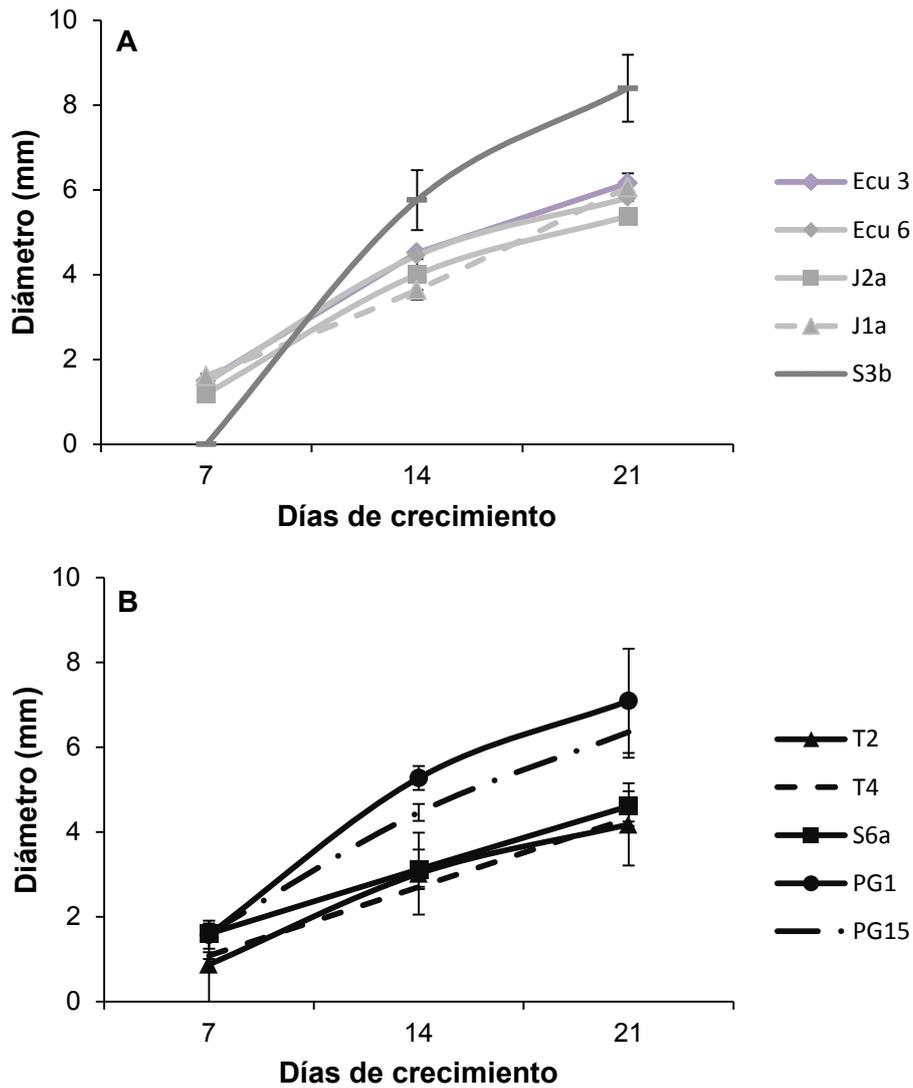
2.2.7. Análisis estadístico.

El diseño experimental fue enteramente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Por un lado se analizaron el crecimiento y la pigmentación correspondientes a cada grupo génico (Andinos y Mesoamericanos) utilizando el Test de Student's ($P < 0,05$). Por otro lado se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con los datos correspondientes a cada aislamiento. La comparación de medias, cuando el ANOVA resultó ser significativo al 0,05, se realizó con el test de Tukey al nivel de 0,05 de significancia. Las diferencias en las medidas del ancho y largo de conidios, ancho de hifas, espesor de pared entre los distintos tratamientos (control y Triciclazole) y cuantificación en MC fueron evaluadas utilizando el Test de Student's ($P < 0,05$; Statística 7.1). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Statística versión 7.1.

2.3. Resultados

2.3.1 Crecimiento y pigmentación de las colonias.

Diez aislamientos de *P. griseola* se cultivaron sobre APG, la Figura 2.3.1.1 muestra la evolución del diámetro y de la pigmentación durante 21 días de cultivo.



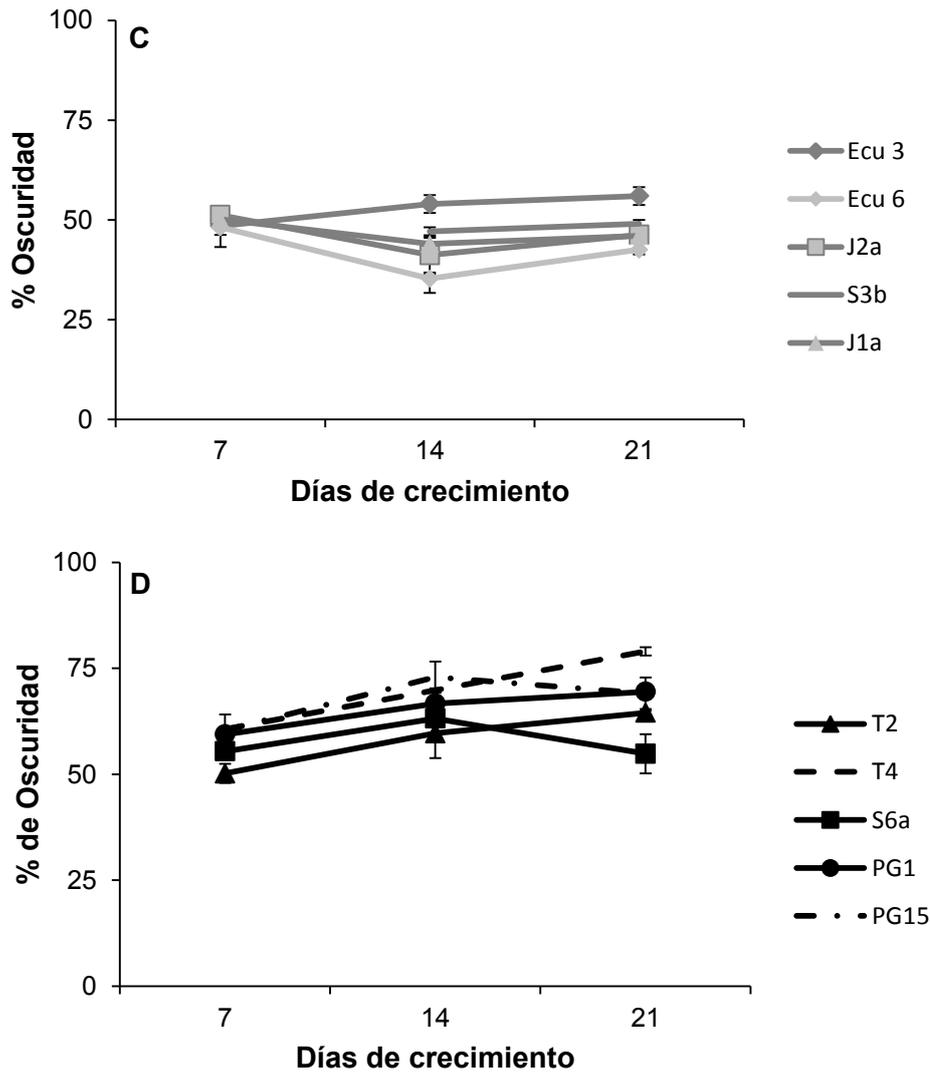


Figura 2.3.1.1. Diámetro (A y B) y pigmentación (C y D) de las colonias de aislamientos del grupo Andino (A y C) y del grupo Mesoamericano (B y D) sobre APG (medio basal) a los 7,14 y 21 días. Valores medios y desvíos estándar de tres repeticiones.

A los 7 días de crecimiento, los aislamientos correspondientes al grupo Andino no se diferenciaron en diámetro respecto a los Mesoamericanos. Esto cambió a los 14 y 21 días de incubación, ya que se observó que los aislamientos Andinos crecieron más que los aislamientos Mesoamericanos, lo que se evidenció por un mayor diámetro de las colonias (Test de Student's, $P < 0,05$; Tabla 2.3.1.1).

Grupo génico	7 días	14 días	21 días
Andinos	1,15 ± 0,62 ^a	4,47 ± 0,82 ^a	6,36 ± 1,24 ^a
Mesoamericanos	1,35 ± 0,35 ^a	3,71 ± 1,04 ^b	5,31 ± 1,36 ^b

Tabla 2.3.1.1. Crecimiento de los grupos génicos. Valores en cada columna con letras distintas denotan diferencias significativas (Test de Student's; P<0,05).

También se determinó la pigmentación de las colonias a los 7, 14 y 21 días y se encontraron diferencias en la pigmentación de los aislamientos del grupo Andino respecto a los Mesoamericanos (Tabla 2.3.1.2.).

Grupo génico	7 días	14 días	21 días
Andinos	49 ± 4 ^{aB}	44 ± 7 ^{aA}	48 ± 5 ^{aB}
Mesoamericanos	57 ± 5 ^{bA}	66 ± 6 ^{bB}	67 ± 8 ^{bB}

Tabla 2.3.1.2. Pigmentación de los grupos génicos. Valores en cada columna con letras minúsculas distintas denotan diferencias significativas (Test de Student's; P<0,05). Valores en cada hilera con letras mayúsculas distintas denotan diferencias significativas (Test de Student's; P<0,05).

Por otro lado, en los Andinos, la pigmentación de las colonias a los 7 días se diferenció de aquella estimada a los 14, aunque no respecto a los 21 días. En los Mesoamericanos la pigmentación a los 7 días fue menor que aquella a los 14 y 21 días, período durante el cual la pigmentación no varió.

La Tabla 2.3.1.3 muestra el diámetro de las colonias y pigmentación de diferentes aislamientos de *P. griseola* pertenecientes a los dos grupos génicos a los 21 días de cultivo sobre APG y la estimación de su velocidad de crecimiento. El aislamiento S3b fue el que presentó el mayor diámetro comparado con los otros Andinos analizados, aunque no mostró diferencias en su tasa de crecimiento respecto a aquella estimada para Ecu3 y Ecu6. Por otro lado, PG1 y PG15 mostraron los mayores diámetros de las colonias de los aislamientos Mesoamericanos, aunque este último aislamiento no se diferenció de S6a. En el otro extremo, aunque T2 y T4 revelaron el menor diámetro de los Mesoamericanos, tampoco se diferenciaron de S6a. No obstante, no se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento para los aislamientos Mesoamericanos. En cuanto a la pigmentación no se

observaron diferencias entre los aislamientos del grupo Andino a excepción de Ecu 3 que presentó colonias más pigmentadas que los demás del grupo. Entre los Mesoamericanos T4 presentó las colonias más pigmentadas, y S6a las menos pigmentadas. Entre T2, Pg1 y Pg 15 no se observaron diferencias en la pigmentación.

Grupo génico	Aislamiento	Diámetro (mm)	Pigmentación (K)	β (mm/día)
Andinos	Ecu 6	5,81 \pm 1,18 ^a	42 \pm 1 ^a	0,31 (0,86) ^{ab}
	J2a	5,38 \pm 0,23 ^a	46 \pm 2 ^a	0,29 (0,95) ^b
	J1a	6,06 \pm 0,32 ^a	46 \pm 4 ^a	0,32 (0,98) ^b
	S3b	8,41 \pm 0,78 ^b	49 \pm 1 ^a	0,59 (0,94) ^a
	Ecu 3	6,16 \pm 0,65 ^a	56 \pm 3 ^b	0,33 (0,94) ^{ab}
Mesoamericanos	S6a	4,60 \pm 0,36 ^{ab}	55 \pm 5 ^a	0,21 (0,95) ^b
	T2	3,84 \pm 0,09 ^a	64 \pm 1 ^b	0,24 (0,92) ^b
	PG1	7,09 \pm 1,23 ^c	69 \pm 1 ^b	0,39 (0,90) ^b
	PG15	6,36 \pm 0,60 ^{bc}	69 \pm 4 ^b	0,34 (0,96) ^b
	T4	4,40 \pm 0,20 ^a	79 \pm 1 ^c	0,23 (0,99) ^b

Tabla 2.3.1.3. Crecimiento, pigmentación y tasa de crecimiento en *P. griseola* a los 21 días de cultivo sobre APG. Valores con letras distintas implica que hay diferencias significativas entre ellos para cada grupo génico (Test de Tukey, P<0,05). β =tasa de crecimiento en mm/día. Entre paréntesis se indica el coeficiente de correlación.

La Figura 2.3.1.2 muestra las colonias a los 21 días de cultivo, donde se observa la variabilidad en crecimiento y pigmentación.

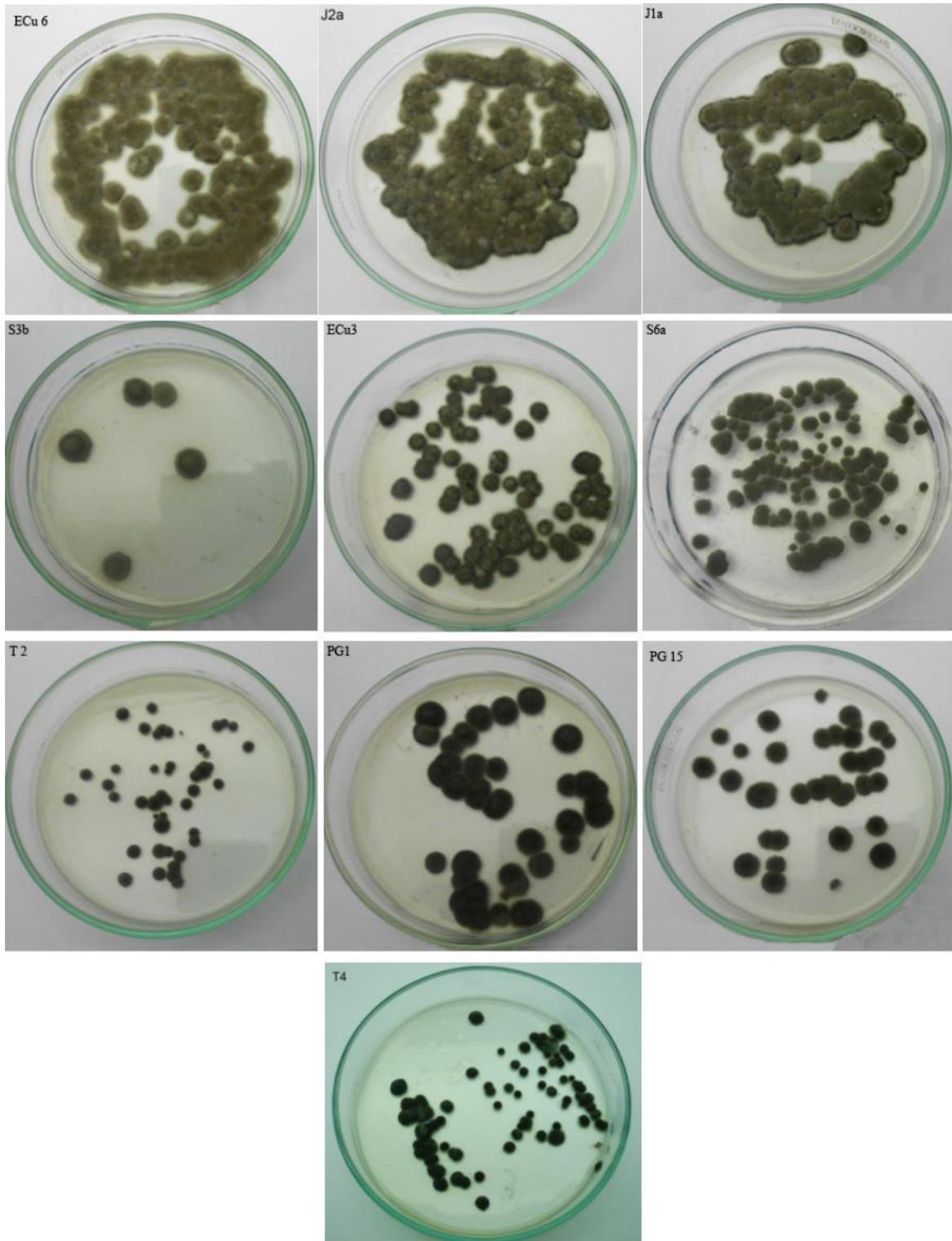


Figura 2.3.1.2. Colonias de aislamientos seleccionados de *P. griseola* después de 21 días de cultivo en el medio APG a 24°C.

2.3.2 Análisis microscópicos de *P. griseola* en cultivos sólidos y en la presencia de Triciclazole.

La pigmentación de los aislamientos desarrollados en medio APG y APG suplementado con 100 mg/L de Triciclazole después de 21 días de cultivo fue distinta. El aislamiento S3b que presentó colonias de coloración gris en el medio control cambió a marrón-rojizo en presencia de Triciclazole. El aislamiento T4 que en medio control presentó colonias de color negro, adquirió tonalidades de color gris en presencia del fungicida (Figura 2.3.2.1a-d). En virtud de estos resultados se procedió a hacer observaciones de las colonias descritas en el microscopio óptico.

Microscopía óptica.

En el análisis de las colonias de los aislamientos desarrollados en el medio APG se encontró que presentaron las siguientes características: el micelio estuvo formado por hifas pigmentadas de $2,20 \pm 0,55 \mu\text{m}$ en S3b y $3,59 \pm 0,60 \mu\text{m}$ en T4 de ancho, y los conidios que se observaron fueron acrógenos, solitarios, cilíndricos a obclavados, redondeados hacia el ápice, truncados hacia la base, curvados, de color marrón, y presentaron 1-3 septos y una longitud y ancho promedio de $27,73 \pm 4,56 \mu\text{m}$ y $4,75 \pm 0,92 \mu\text{m}$, respectivamente.

La presencia del Triciclazole no solo provocó una reducción en la pigmentación de las hifas y conidios sino que además alteró las características morfológicas de los aislamientos. En S3b se diferenciaron estructuras globulares asociadas al micelio y las hifas resultaron más anchas ($3,01 \pm 0,48 \mu\text{m}$; Test de Student's, $P < 0,05$, Figura 2.3.2.1e-f), mientras que en T4 éstas ($4,04 \pm 0,46 \mu\text{m}$) no fueron significativamente diferentes respecto al tratamiento control. No obstante, la presencia del inhibidor también provocó cambios en el ancho de los conidios de T4 a pesar que la longitud de los conidios no resultó afectada ($5,80 \pm 0,52 \mu\text{m}$ y $27,90 \pm 6,91 \mu\text{m}$; Figura 2.3.2.1 g-h).

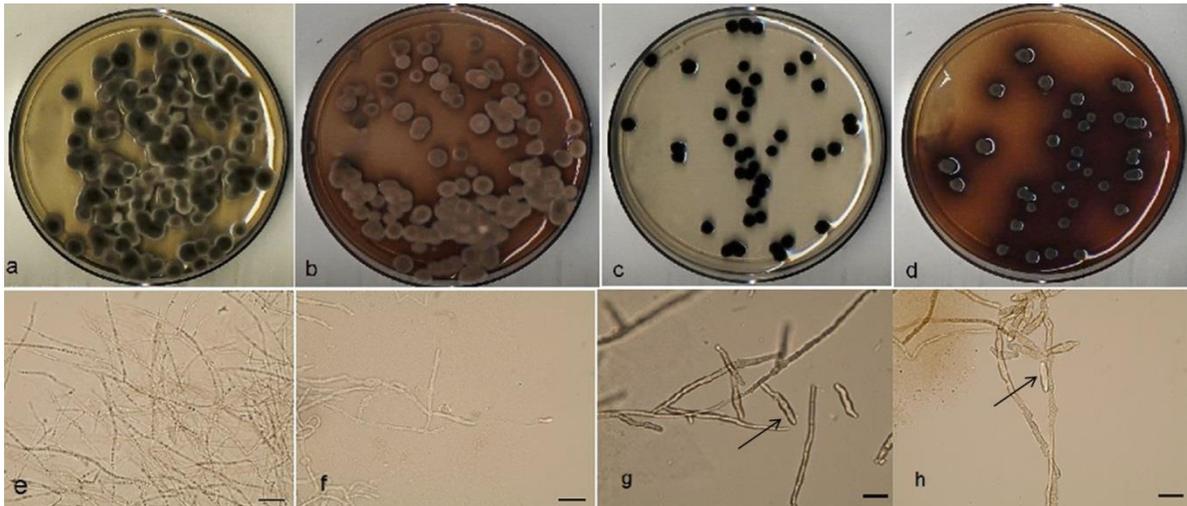


Figura 2.3.2.1. Colonias de *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b; a y b) y *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4; c y d) sobre APG (a y c) y APG + 100 mg/L de Triciclazole (b y d). Micelio y conidios de *P. griseola* (e-h). *P. griseola f. griseola* sobre APG (e) y APG + 100 mg/L de Triciclazole (f). *P. griseola f. mesoamericana* sobre APG (g) y APG + 100 mg/L de Triciclazole (h). Escala 20 μ m. Aumento 60x. Las flechas señalan conidios.

Microscopía electrónica de transmisión.

Los cultivos control y tratados de los aislamientos de S3b y T4 se observaron en el MET y se encontró que la pared celular se organiza en capas de diferente electrondensidad. Se observó una capa más externa de una aparente mayor electrondensidad que una capa interna. En la capa más externa estaría la melanina, ya que la adición del Triciclazole, un inhibidor de su síntesis, provocó una reducción de la capa de mayor electrondensidad (Figura 2.3.2.2). Además, se encontraron diferencias en el espesor de las paredes celulares.

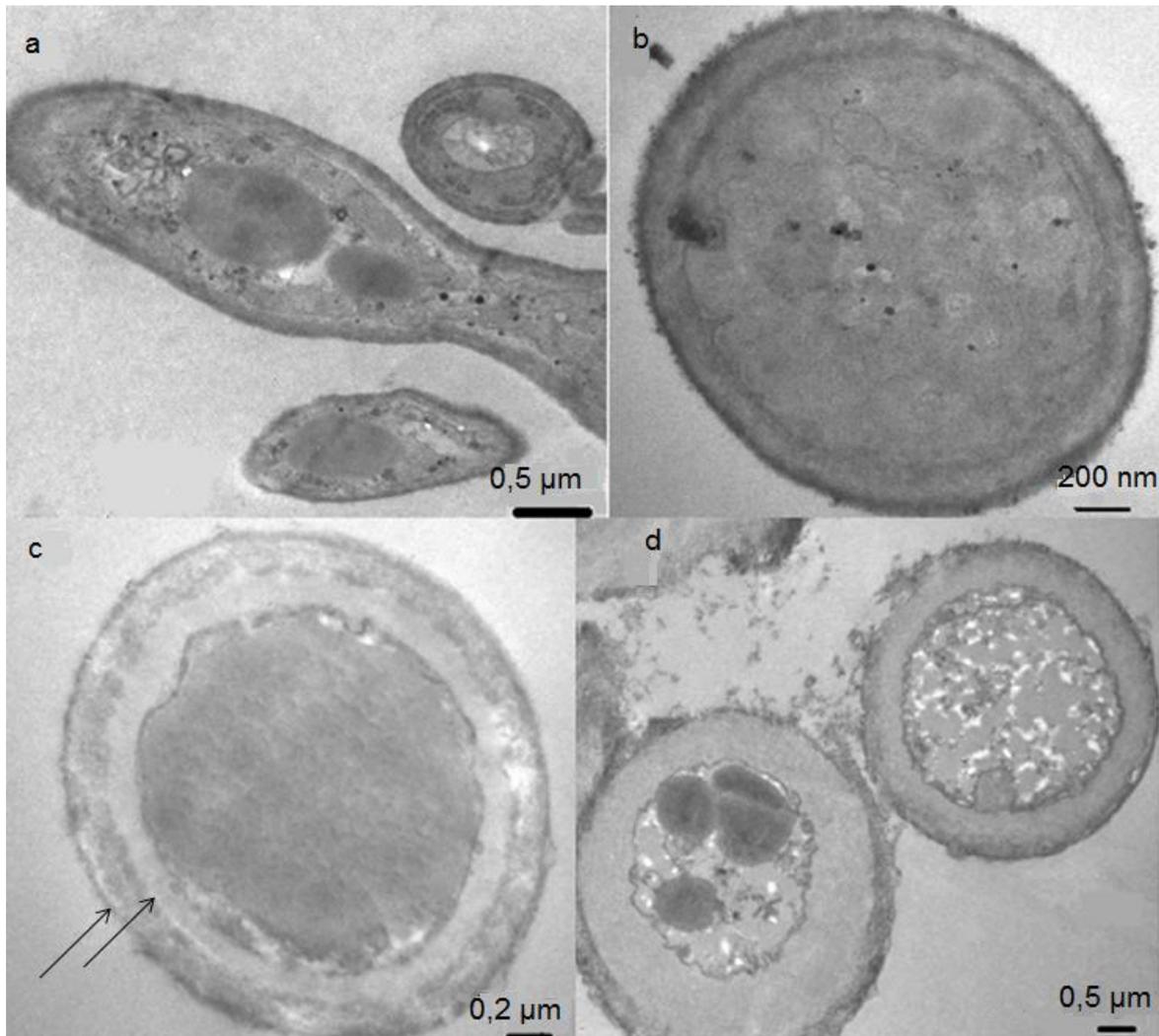


Figura 2.3.2.2. Hifas de *P. griseola* sobre APG (A y C) y APG + 100 mg/L de Triciclazole (B y D). *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b; A y B) y *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4; C y D). Las flechas indican capas de diferente electrondensidad.

Cuando S3b se cultivó en medio APG el hongo presentó una pared celular de menor espesor que el aislamiento T4. Sin embargo cuando los hongos se cultivaron en presencia de 100 mg/L de Triciclazole también se encontraron diferencias en el espesor de la pared entre los aislamientos. El aislamiento S3b presentó una pared de mayor espesor comparada a aquella observada en los cultivos sin inhibidor, sin embargo en el aislamiento T4 el agregado del inhibidor no modificó el espesor de la pared respecto al control (Tabla 2.3.2.1).

Aislamiento		Espesor de pared (nm)
S3b	APG	147,47 ± 35,42 ^{aA}
	APG+TRIC	217,92 ± 61,38 ^{bA}
T4	APG	371,23 ± 91,36 ^{cB}
	APG+TRIC	324,90 ± 71,92 ^{cB}

Tabla 2.3.2.1. Espesor de la pared celular de las hifas de *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b) y *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4) desarrollados sobre APG y APG+100 mg/L de Triciclazole después de 21 días de incubación. Valores correspondientes a cada aislamiento con letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (Test de Student's, $P < 0,05$). Valores correspondientes a cultivos sobre un mismo medio con letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas (Test de Student's, $P < 0,05$).

Microscopía confocal.

El material celular de los cultivos de *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4) en APG y APG+100 mg/L de Triciclazole tratados con peróxido de hidrógeno y luz fue observado al MC, siendo detectada una señal fluorescente a 520 nm a nivel de la pared del hongo (Figura 2.3.2.3, a2 y b2). Si bien en la pared celular de las muestras que no fueron tratadas con peróxido de hidrógeno no se observó fluorescencia, esta señal se detectó en vesículas citoplasmáticas (Figura 2.3.2.3, a 1 y b1). La pared de las hifas provenientes de hongos cultivados con Triciclazole presentó una disminución de la fluorescencia ante el tratamiento con peróxido de hidrógeno y luz. Al presentar estas muestras una disminución de la fluorescencia en la pared y contener vesículas intracelulares fluorescentes, se calculó la relación entre la fluorescencia de la pared y de las vesículas. Esta relación fue mayor en el material derivado de los cultivos control tratados con peróxido de hidrógeno y luz comparado a aquella correspondiente al material de cultivos con Triciclazole en las mismas condiciones (Figura 2.3.2.4).

También se observó en el MC el material celular correspondiente a *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b) tratado con peróxido de hidrógeno y luz, siendo tenue la señal fluorescente detectada (datos no mostrados).

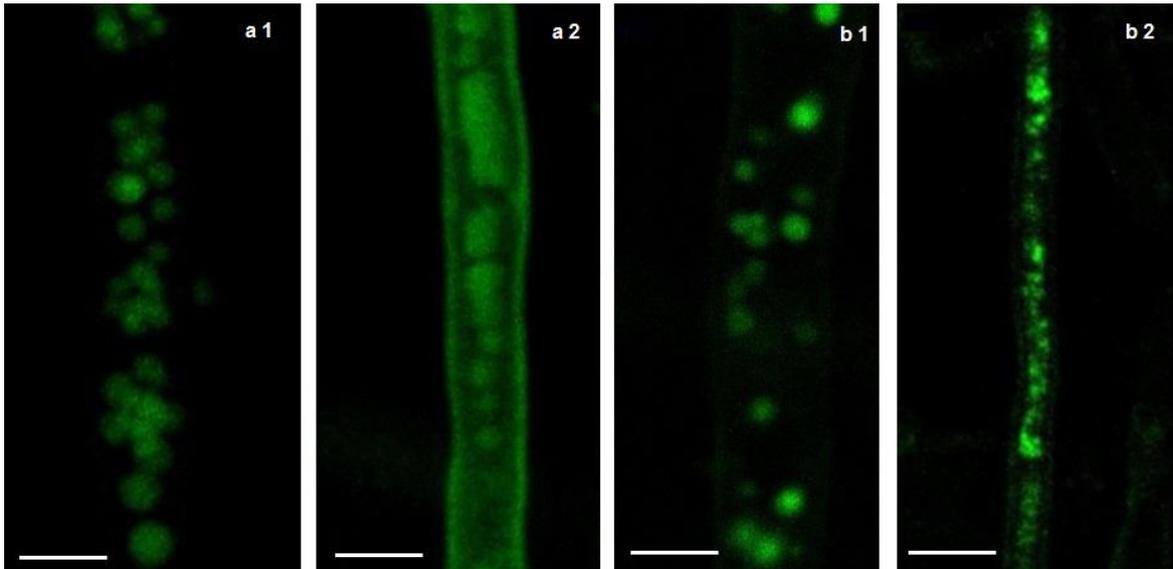


Figura 2.3.2.3. Hifas de *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4) de cultivos sobre APG (a) y sobre APG + 100 mg/L de Triciclazole (b) no tratados (1) y tratados con H_2O_2 6M y luz (2). Escala 5 μm .

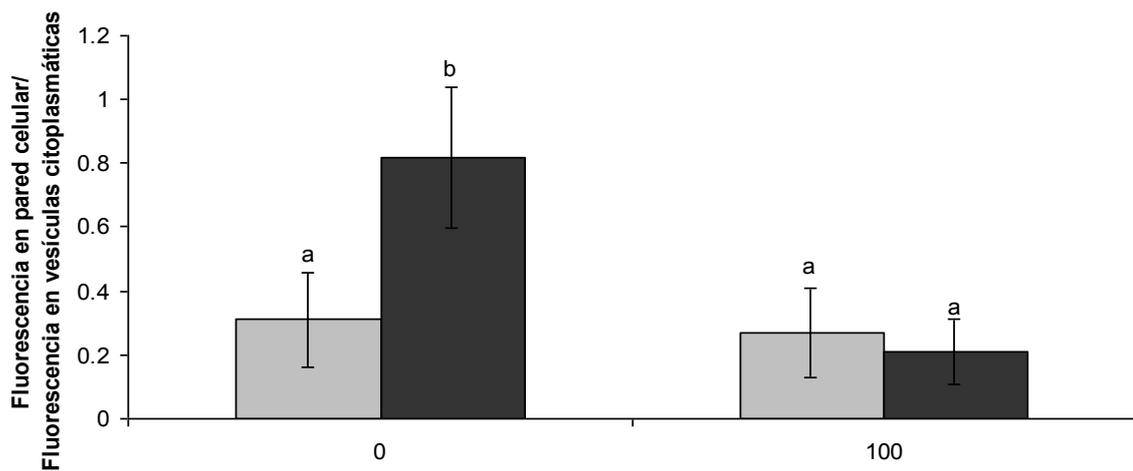


Figura 2.3.2.4. Relación de la señal fluorescente para el área media en la pared celular y vesículas intracelulares en cultivos de *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4) control (0) y cultivos suplementados con Triciclazole (100) tratados con H_2O_2 y luz (barras negras) y no tratados con H_2O_2 y luz (barras grises). Barras correspondientes a cada tipo de cultivo con distinta letra son significativamente diferentes (Test de Student's, $P < 0,05$).

2.4 Discusión

Pseudocercospora griseola es un hongo dematiáceo (pigmentado) de crecimiento lento (Stenglein *et al.*, 2006). Estudios previos mostraron que suplementando el medio de cultivo con mezclas ricas en aminoácidos (como la harina de amaranto) el hongo no cambia su hábito de crecimiento que es aparentemente una característica intrínseca de la especie (Stenglein *et al.*, 2006). Aunque esta limitada capacidad para crecer es común al comportamiento de los hongos meristemáticos, un grupo de hongos pigmentados que forman agregados celulares y que crecen sobre sustratos inorgánicos como roca, vidrio o metal (Sterflinger, 2006), *P. griseola* está usualmente asociado a material vegetal.

A pesar de la disponibilidad de un stock de 45 aislamientos de *P. griseola* conservados a -20 °C en papeles de filtro (Stenglein, 2007), solo 10 de éstos pudieron ser recuperados para evaluar en APG su crecimiento y pigmentación. Diferentes factores pueden explicar estos inconvenientes, incluyendo la pérdida de viabilidad del material presente en el papel de filtro posiblemente por su prologado tiempo de conservación. Según Nakasone *et al.* (2004) el tiempo de almacenamiento varía con cada método y según la especie fúngica, aunque generalmente es menor a 10 años, un periodo superado para los materiales bajo estudio que fueron aislados entre el 2001 y el 2003. No obstante, los cultivos recuperados revelaron a los 14 y 21 días de incubación un mayor crecimiento, que fue notorio, en los representantes Andinos comparado a aquel de los Mesoamericanos. Estudios utilizando los mismos aislamientos pero realizados en 2007 por Stenglein (2007) sobre APG a 24°C y en oscuridad revelaron un mayor crecimiento, sean hongos pertenecientes al grupo Andino como Mesoamericano, lo que confirma la pérdida en la capacidad de crecimiento de estos hongos en respuesta a su mantenimiento *in-vitro*. Asimismo no es posible descartar otras razones vinculadas a la composición del medio y al tipo de inóculo sembrado. Mientras que en este trabajo de tesis los conidios fueron las

unidades de partida de los hongos en los cultivos evaluados, Saparrat *et al.* (2009) utilizando colonias monospóricas de 2 mm de diámetro como inóculo reportaron que el representante del grupo Andino S3b mostró un diámetro de 17,5 mm después de 21 días de incubación y que el representante del grupo Mesoamericano T4, que resultó más pigmentado, reveló un diámetro de 9,9 mm. Los resultados aquí reportados coinciden también con Stenglein (2007) quien encontró diferencias además del crecimiento en la pigmentación entre los aislamientos de cada grupo, aunque no cuantificó el nivel de pigmentación. Aunque son notorias las diferencias en la pigmentación de los cultivos de los aislamientos Andinos comparados a la de los Mesoamericanos durante el periodo de 21 días de incubación, el patrón ontogenético de la pigmentación de cada aislamiento fue diferente. El incremento del color de las colonias de los aislamientos Mesoamericanos después de 7 días es acorde a una mayor densidad de las hifas pigmentadas en el centro de las colonias en crecimiento sobre el medio sólido. No obstante, limitaciones metodológicas relacionadas al tamaño de las colonias a los 7 días sumado a la sensibilidad del programa de análisis de las imágenes (Adobe Photoshop versión 8.0.1) pudieron conducir a la reducción de la pigmentación de las colonias de los aislamientos Andinos a los 14 días de cultivo.

Si bien la temperatura óptima de crecimiento de los dos aislamientos es de 24°C, los del grupo Mesoamericano son capaces de crecer por encima de los 30°C, temperatura en la que los Andinos no crecen (Crous *et al.*, 2006). Esto puede estar relacionado a las diferencias encontradas en la pigmentación de los aislamientos, siendo una ventaja para los representantes del grupo Mesoamericano en el ambiente con mayores temperaturas en el que pueden crecer. Asimismo, esto puede probablemente tener alguna vinculación a los ambientes de origen en los que sus huéspedes habitan. Singaravelan *et al.* (2008) encontraron que el contenido de melaninas en *Aspergillus niger* (phylum Ascomycota) es mayor cuando el hongo crece en suelos con mayor radiación solar. Resultados similares reportaron Sikorski & Nevo

(2005) analizando la bacteria *Bacillus simplex*. Según Colpaert *et al.* (2004) la diversidad funcional y plasticidad ecológica pueden estar afectadas por el origen del aislamiento fúngico.

Se sabe que algunos hongos pueden presentar variabilidad fisiológica entre aislamientos de la misma especie (Elíades *et al.*, 2015). En *Humicolopsis cephalosporioides* (phylum Ascomycota) dependiendo del medio y de la temperatura de incubación hay variación intraespecífica en el crecimiento y la actividad enzimática entre los distintos aislamientos estudiados (Elíades *et al.*, 2015). *Bipolaris sorokiniana* (phylum Ascomycota) tiene un alto grado de variabilidad fenotípica y genética entre aislamientos (Oliveira *et al.*, 2002). Se observó también una gran variabilidad en el crecimiento de distintos aislamientos de *Leptosphaeria lindquistii* (phylum Ascomycota), así como en otras especies relacionadas como *Phoma exigua*, *P. lingam* y *P. medicaginis* (phylum Ascomycota; Roustae *et al.*, 2000). Rapela *et al.* (2011) en aislamientos de *Cercospora kikuchii*, un hongo perteneciente a la familia Mycosphaerellaceae (al igual que *P. griseola*) con dificultad para crecer en medios artificiales, encontraron variabilidad fenotípica, genética y también geográfica.

Los representantes seleccionados con los que se realizaron los análisis microscópicos para estudiar la localización de la melanina fueron S3b y T4. Del grupo de los Andinos S3b fue seleccionado porque en cuanto al crecimiento es el que presentó mayor diámetro en sus colonias y en cuanto a la pigmentación el valor de K no se diferenció significativamente de los demás aislamientos del grupo. Por otro lado, del grupo Mesoamericano, T4 fue seleccionado por ser el más pigmentado y en cuanto al crecimiento por ser de los más pequeños del grupo (aunque T2 es el aislamiento que presentó el menor diámetro, no es significativamente distinto de T4). Además tanto S3b como T4 mostraron ser los aislamientos con mejor aptitud para realizar ensayos de cultivo en APG, respecto a los otros aislamientos utilizados en esta tesis.

Este aspecto se manifestó en la mayor capacidad de conservación y entonces así mayor facilidad para crecer comparados con los demás aislamientos disponibles.

La deposición de la melanina en capas es un factor que contribuye a la protección del organismo frente a condiciones ambientales adversas y por otro lado probablemente impacta en la translocación de sustancias a través de la pared celular (Mandal *et al.*, 2007).

En este capítulo se muestra que el agregado del Triciclazole, un inhibidor de la síntesis de melanina DHN, además de provocar una reducción en la pigmentación de las colonias de los aislamientos en estudio, afectó el tamaño de las hifas y conidios. A pesar que Kumar *et al.* (2015) detectaron una reducción del tamaño de los conidios de *Bipolaris sorokiniana* con el incremento de la concentración de Triciclazole en el rango entre 5 y 100 mg/L, se encontró un incremento en el ancho de los conidios de *P. griseola* T4 cuando la concentración de Triciclazole fue de 100 mg/L. Van de Sande *et al.* (2007) observaron que la disminución de la melanización de la pared de la hifa de *Madurella mycetomatis* por Triciclazole fue acompañada de una disminución en el ancho de la hifa fúngica, opuesto a lo que se observó en este trabajo. Las observaciones al MET y MC del material de *P. griseola* sugieren que la melanina está localizada en la pared celular. La pared celular de *P. griseola* presentó una capa más interna electróntransparente y otra externa electrondensa. Esta disposición en capas también se ha observado en las paredes de las esporas de *Cladosporium cladosporioides* y *Humicola grisea* (Latgé *et al.*, 1988; Ellis & Griffiths, 1974). Es interesante destacar que la aplicación de Triciclazole redujo la capa externa más electrondensa, sugiriendo esto que la reducción de la síntesis de melanina por el Triciclazole afecta principalmente a esta capa, probablemente porque es la que acumula melanina. Wheeler & Stipanovic (1979), Kogej *et al.* (2006) y Butler *et al.* (2009) también encontraron que el Triciclazole provocó una reducción en la deposición de gránulos electrondensos en la pared en las células de *Trimmatostroma salinum* y *T.*

abietis, en las clamidosporas de *Thielaviopsis basicola*, y en los esclerocios de *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*, aunque estos estudios se realizaron utilizando menores concentraciones del inhibidor (1-30 mg/L).

Según Madrid *et al.* (2011) el espesor de la pared celular está relacionado con la presencia de melanina. En *Cryptococcus neoformans*, un hongo donde la melanina presente en pared celular está asociada con un incremento en la virulencia y protección de compuestos antifúngicos, las cepas albinas tienen menor espesor de pared que las cepas pigmentadas (Mandal *et al.*, 2007). También en *Cenococcum geophilum*, un hongo ectomicorrizo de amplia distribución y gran habilidad para tolerar un amplio rango de factores ambientales, se ha demostrado que la melanización de la pared celular tiene efectos ventajosos en condiciones impuestas de estrés por agua (Fernandez & Koide, 2013). Se sabe que la melanina disminuye la porosidad de la pared celular pudiendo disminuir la pérdida de agua por la célula, y así aumentar el éxito del hongo bajo condiciones de estrés por agua. Puesto que la restitución repentina de la cantidad de agua en el suelo también puede llevar a incrementos bruscos en la presión de turgencia, lo cual puede causar la lisis celular, la melanización de la pared celular puede cumplir un rol soportando los cambios repentinos de presión (Fernandez & Koide, 2013). La melanina en el apresorio de *Colletotrichum* y *Magnaporthe* se ubica por fuera de la membrana plasmática otorgándole al apresorio una mayor rigidez y disminuyendo la permeabilidad de la pared celular, lo que permite la penetración de la hifa en la cutícula de las células de la epidermis vegetal (Butler & Day, 1998). También la presencia de melanina en las paredes celulares de los hongos ha sido asociada a su rol de protección contra la acción de enzimas hidrolíticas (Henson *et al.*, 1999). El aislamiento de *P. griseola* más pigmentado, T4, mostró tener una pared celular de mayor espesor que el aislamiento S3b, lo que sugiere que estos hongos podrían diferir en su respuesta a situaciones de estrés.

La fluorescencia de la melanina oxidada está asociada con la degradación del polímero (Kayatz *et al.*, 2001; Kerimo *et al.*, 2011). La fluorescencia encontrada en la pared de los materiales tratados con peróxido de hidrógeno y luz mediante MC sugiere la localización de la melanina en la pared celular de T4 y S3b. No obstante, la señal de fluorescencia en el caso del micelio de S3b fue débil, posiblemente relacionada al menor espesor de su pared celular comparado con lo observado para T4. Por otro lado, la menor detección relativa de fluorescencia en las muestras tratadas con peróxido de hidrógeno y luz pero derivadas de cultivo en presencia de Triciclazole indica que bajo las condiciones de cultivo probadas la síntesis de melanina y su deposición en pared no está totalmente bloqueada. Similarmente, Kayatz *et al.* (2001) utilizando microscopía fluorescente luego de unos minutos de oxidación detectan gránulos de melanina con una fluorescencia de gran intensidad en la membrana coroides de ojo humano. No obstante, la existencia de señal fluorescente en el material intracelular de *P. griseola* cultivado sobre APG y APG + 100 mg/L de Triciclazole (ya sean cuando las muestras fueron o no tratadas con peróxido de hidrógeno y luz) plantea el interrogante sobre la naturaleza de los compuestos que estas vesículas contienen y si ello tiene alguna relación con la síntesis de melanina en este hongo.

En este capítulo se confirmó que los grupos Andinos y Mesoamericanos de *P. griseola* difieren en su crecimiento y pigmentación, y que la melanina se localiza en la capa externa de la pared celular. Este es el primer trabajo en el que se estudió la deposición de la melanina en los aislamientos de *P. griseola* pertenecientes a los grupos Andino y Mesoamericano. Ambos grupos crecen lento en el medio de cultivo, probablemente a causa de la demanda de energía para la síntesis de melanina, tal como sugerido por Sterflinger (2006) para otros hongos dematiáceos.

CAPITULO III. Caracterización de las melaninas de *Pseudocercospora griseola*.

3.1 Introducción

La melanina es un polímero complejo de unidades de tipo indol o fenol (Henson *et al.*, 1999; Nosanchuk & Casadevall, 2003). Debido a su complejidad estructural, su naturaleza amorfa, insolubilidad y estrecha asociación a otros polímeros, su purificación requiere métodos químicos drásticos por lo que las melaninas son difíciles de caracterizar (Bell & Wheeler, 1986; Cheng *et al.*, 1994; Suryanarayanan *et al.*, 2004; Selvakumar *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2011; Goncalves *et al.*, 2012). Debido a esto la metodología frecuentemente utilizada en la caracterización de melaninas incluye el uso de técnicas como la espectroscopia UV-visible, la espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (RPE), la espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y la espectroscopía de masas (MALDI-TOF). Todo esto suele ser acompañado de reacciones o análisis diagnósticos tales como la reacción con agentes oxidantes e interacción con metales.

Las melaninas son cromóforos de color oscuro debido a que absorben todas las longitudes de onda visible, aunque además absorben más en la región UV, capacidad que decrece hacia las longitudes de onda cercana al rojo (Bell & Wheeler, 1986).

Mientras que las melaninas tienen reducida capacidad para fluorescer, los productos de la degradación oxidativa de estos polímeros fluorescen. La inducción de fluorescencia representa una herramienta histoquímica diagnóstica en la localización indirecta de la melanina (Elleder & Borovanský, 2001).

Las estructuras aromáticas en la melanina correspondientes a distintos grupos funcionales con heteroátomos como oxígeno y su capacidad para oxidarse, genera

subestructuras con electrones desapareados, lo que conduce a estos pigmentos como un reservorio de radicales libres, estabilizados por resonancia (Eaton *et al.*, 2010). Este pool radicalario con diferentes estados rédox, distintivo de las melaninas, determina su capacidad para inactivar otros radicales libres que resultan del estrés ambiental (Bell & Wheeler, 1986).

Beltrán-García *et al.* (2014) utilizando espectrometría de masas MALDITOF encontraron que la melanina de *Mycosphaerella fijiensis* tiene un peso molecular inferior a 8000 Da. En este estudio, se identificaron estructuras de 161,8 Da (que es un valor cercano a la masa teórica del monómero DHN) y su organización en 50 unidades de 1,8 DHN.

Las melaninas contienen en su estructura grupos funcionales de tipo carboxilo, fenol, hidroxilo y amino; éstos son potenciales sitios de unión de iones metales (Fogarty & Tobin, 1996).

Este tipo de pigmentos muestra propiedades antioxidantes (Gessler *et al.*, 2014). La melanina DHN de *Alternaria alternata* y *Wangiella dermatitidis* protegen a estos organismos de agentes oxidantes como el permanganato y el hipoclorito (Jacobson *et al.*, 1995). En *Magnaporthe oryzae* la melanina cumple un rol clave ya que protege al hongo de los radicales del oxígeno que se generan en las hojas de las plantas de arroz infectadas, siendo los mutantes de este hongo con la síntesis de melanina inhibida no patogénicos y susceptibles al daño por radicales de oxígeno (Butler & Day, 1998).

Saparrat *et al.* (2009) en estudios preliminares describieron los pigmentos oscuros de *P. griseola* en base a pruebas fisicoquímicas que sugirieron la naturaleza de las melaninas en este hongo (Tabla 3.1.1). Aunque los autores sugirieron que estos pigmentos son melaninas DHN no hay datos disponibles sobre las características estructurales y funcionales de estos polímeros asociados a *P. griseola*.

Test diagnóstico	Resultados
Solubilidad en agua	Insoluble
Solubilidad en KOH 1M	Soluble
Color	Gris-negro en fase sólida y marrón oscuro en solución alcalina (KOH)
Solubilidad en solventes orgánico	Insoluble
Reacción con H ₂ O ₂	Decoloración
Precipitación en HCl 3N	Inmediata
Espectro de absorción UV-visible	Pico de absorbancia a 230 nm
Log ₁₀ Abs. vs long de onda (nm)	0,0029 a 0,0037
Reacción para polifenoles	Formación un precipitado rojo-naranja
Reacción con solución de nitrato de plata amoniacal	Formación de un precipitado color plata sobre las paredes del tubo de ensayo

Tabla 3.1.1. Características fisicoquímicas de los pigmentos oscuros de *P. griseola*

(Saparrat *et al.*, 2009).

Objetivos: Caracterizar las melaninas de aislamientos seleccionados de *Pseudocercospora griseola* de ambos grupos génicos en base a técnicas espectroscópicas.

Evaluar su rol como secuestrante de agentes oxidantes y metales.

Hipótesis: Las melaninas de *P. griseola* tienen en su estructura grupos químicos que determinan su actividad como antioxidante y quelante de metales, carácter que está en función de la procedencia del grupo génico.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1. Cultivos de *Pseudocercospora griseola*.

Se utilizaron dos representantes de los grupos génicos de la colección disponible, *P. griseola f. griseola* (S3b) y *P. griseola f. mesoamericana* (T4).

3.2.2. Extracción de los pigmentos.

La extracción de los pigmentos oscuros de ambos aislamientos de *P. griseola* fue realizada a partir de cultivos desarrollados en medio líquido papa-glucosa (PG) durante 21 días (Figura 3.2.1; Gadd *et al.*, 1982; Saparrat *et al.*, 2009). La biomasa fúngica se filtró y se llevó a estufa a 80°C hasta obtener material seco. Posteriormente, este material se congeló con nitrógeno líquido y se trituró en un mortero de porcelana. Mientras que parte de la muestra triturada se conservó a temperatura ambiente libre de humedad, 100 mg del material se resuspendió en 5 ml de hidróxido de sodio 1M y se autoclavó (121°C, 1 atm, 20 min; Gadd *et al.*, 1982). Esta última mezcla se enfrió y se centrifugó a 5.000 x *g* durante 10 min a 4°C. El sobrenadante conteniendo los pigmentos oscuros se pasó por filtros de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore). El pigmento soluble se precipitó adicionando ácido clorhídrico 3M. Luego de dejar en reposo por un espacio de 12 h, se centrifugó a 5.000 x *g* durante 10 min; se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó tres veces con agua destilada. El precipitado, que es el pigmento oscuro, se colocó en una placa de Petri y se secó en estufa a 40°C y se mantuvo en una atmósfera libre de humedad hasta el momento de proceder a su análisis.



Figura 3.2.1. Secuencia de los pasos de extracción de melanina.

3.2.3. Espectroscopía UV-visible.

La caracterización de los pigmentos oscuros en solución alcalina (previamente ultrafiltrada) se llevó a cabo analizando los espectros UV-visible. El pigmento purificado (1 mg) fue disuelto en hidróxido de sodio 0,1 M y diluido 10 veces. Se registró el espectro UV-visible en el rango de 200-800 nm en un espectrómetro Shimadzu. La medición se realizó dos veces con tres repeticiones cada una.

3.2.4. Espectroscopía de fluorescencia.

Se determinó el espectro de fluorescencia de soluciones alcalinas de mezclas de reacciones oxidativas del pigmento oscuro y del micelio de los aislamientos S3b y T4. Para ello una alícuota de 10 mg del pigmento del aislamiento T4, una cantidad inferior a 1 mg del pigmento de S3b o 10 mg de micelio seco de cada hongo se incubó en presencia de peróxido de hidrógeno 6M y luz por 15 min (Kayatz *et al.*, 2001), y a la mezcla resultante se agregó 1 ml de hidróxido de sodio 1M. En el caso de las mezclas con micelio debido a su naturaleza insoluble, previo a la realización del espectro de

fluorescencia se llevó a cabo una centrifugación de 5 min a 5.000 x g. Los espectros de fluorescencia fueron registrados en un espectrofluorómetro RF-1501 Shimadzu, entre 200-800 nm, con una velocidad de escaneo media.

3.2.5. Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica.

A partir del stock de los pigmentos oscuros extraídos de ambos aislamientos de *P. griseola* se tomaron alícuotas que se colocaron en tubos capilares. Los pigmentos en estado sólido (1,5 mg en el caso de T4 y 1 mg en el caso de S3b) y en solución alcalina de hidróxido de sodio 1M (16,6 mg/ g de solución en el caso de T4 y 26,6 mg/ g de solución en el caso de S3b) se utilizaron para generar el espectro RPE. Se registraron en un espectrómetro Bruker EMX-Plus a temperatura ambiente. Los parámetros instrumentales fueron los siguientes: frecuencia de microondas, 9,87 GHz; potencia de microondas, 3 mW; modulación de campo, 0,5 G.

3.2.6. Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier.

Para obtener los espectros FT-IR de las dos muestras se elaboraron dos tipos de pastillas, unas con pigmentos extraídos de cultivos en medio PG y otras con la biomasa seca de *P. griseola*, cuya composición fue 2 mg de cada muestra y 20 mg de bromuro de potasio grado infrarrojo. También se elaboraron pastillas blanco con sólo 22 mg de bromuro de potasio. Los espectros de absorción FT-IR fueron registrados entre 4000 y 400 1/cm empleando un espectrómetro modelo *Spectrum* (Perkin- Elmer-Instruments). El análisis espectral se realizó a una velocidad de 1 cm/ s con 4 1/cm de resolución bajo atmósfera de aire seco (cámara con silicagel), siendo obtenido un espectro promedio resultado de 64 escaneos. Las mediciones se realizaron dos veces por triplicado. Para el procesamiento de los datos se utilizó el software EZ-OMNIC y se llevó a cabo la corrección de cada espectro sustrayendo automáticamente el espectro correspondiente a la pastilla blanco con bromuro de potasio, obtenido inmediatamente

antes y después del registro de cada muestra. Se seleccionaron bandas índices y regiones espectrales dentro de las ventanas indicadas en la Tabla 3.2.1, reflejando grupos funcionales característicos de compuestos poliméricos con grupos cromóforos, los cuales se asignaron siguiendo a Babitskaya *et al.* (2000), Saparrat *et al.* (2009) y Tavzes *et al.* (2009).

λ (1/cm)	Grupos funcionales	Referencia
3440-3300	Estiramiento de los enlaces O-H y N-H.	(Tavzes <i>et al.</i> , 2009 ; Babitskaya <i>et al.</i> , 2000).
2920-2850	Estiramiento de los enlaces C-H de los grupos CH ₂ y CH ₃ .	(Babitskaya <i>et al.</i> , 2000; Tavzes <i>et al.</i> , 2009)
1800-1730	Estiramiento de los enlaces C=O en cetonas y ácidos carboxílicos libres no conjugados con anillos bencénicos.	(Tavzes <i>et al.</i> , 2009)
1700	C=O cetonas, ésteres de ácidos carboxílicos.	(Saparrat <i>et al.</i> , 2009)
1670-1600	Dobles enlaces conjugados C=O, COOH, conjugados con C=C o anillos bencénicos, estructuras quinoides conjugadas; C=O en la composición de aminas secundarias.	(Babitskaya <i>et al.</i> , 2000; Tavzes <i>et al.</i> , 2009)
1550	Deformaciones de C-N y N-H en amidas II	(Tavzes <i>et al.</i> , 2009)
1500	Enlaces C-C aromáticos.	(Saparrat <i>et al.</i> , 2009)
1480-1350	Grupos amida y amino y cambios deformacionales del enlace C-H adyacentes a grupos COOH y OH, y C=O de quinonas.	(Tavzes <i>et al.</i> , 2009; Babitskaya <i>et al.</i> , 2000)
1280-1240	Estiramientos C-O de grupos ácidos, ester y fenoles y del grupo acetilo de polisacáridos	(Babitskaya <i>et al.</i> , 2000; Tavzes <i>et al.</i> , 2009; (Simonovic <i>et al.</i> , 2011)
1100-1050	Vibraciones de los grupos C-O de alcoholes alifáticos.	(Tavzes <i>et al.</i> , 2009)

Tabla 3.2.1. Bandas de identificación del espectro FT-IR del pigmento.

3.4.7. Determinación de grupos fenólicos.

La cantidad de fenoles totales asociada a la materia seca micelar y a la melanina de los aislamientos S3b y T4 se determinó utilizando el método de Folin-

Ciocalteau (Arrua *et al.*, 2012). Para esto dos muestras, una de 1 mg y otra de 10 mg, se mezclaron con 200 μ l del reactivo de Folin (diluido una vez con agua destilada) y 1200 μ l de agua destilada; la mezcla resultante fue incubada por 3 min a 25 °C. Posteriormente se agregó 1500 μ l de 2% carbonato de sodio en 0,1 N hidróxido de sodio. La mezcla que se agitó vigorosamente, se incubó a 25 °C durante 1 h y luego se centrifugó durante 10 min a 10.000 \times g para estimar la absorbancia de los sobrenadantes a 760 nm en un espectrofotómetro Shimadzu. Se realizó una curva de calibración con solución de ácido tánico (0,005- 0,02 g/ ml). Los resultados se calcularon a partir de la ecuación de regresión de la curva de calibración ($y= 17,07 x+ 0,01$, $R^2=0,99$) y se expresaron como μ g de fenoles por muestra. Las mediciones se realizaron por triplicado.

3.2.8. Identificación de intermediarios de la síntesis de melanina por UV-MALDI MS.

Se cultivó el aislamiento T4 durante 21 días en APG solo y suplementado con 100 mg/L de Triciclazole. Este es un compuesto que inhibe la síntesis de melanina DHN (Figura 3.2.2 y Figura 3.3.6). A partir de estos cultivos se realizó una extracción adicionando al material fúngico 5 ml de acetato de etilo, siendo la mezcla resultante incubada a 4 °C por 24 h (Wheeler & Klich, 1995). Una alícuota de los dos extractos de cada uno de los cultivos fue medido en tres medidas independientes con UV-MALDI. Como referencia también se usó una solución etanólica de Triciclazole (2 mg/ml). Las muestras fueron analizadas por espectrometría de masas desorción/ionización de la matriz asistida por láser (UV-MALDI MS) con un espectrómetro de masas Bruker Ultraflex Daltonics TOF/TOF. El espectro de masas se obtuvo en modo iónico positivo y negativo lineal. La calibración de masa externa se realizó con β -ciclodextrina (MW

1134) con 9H-[3,4b] piridoindol (norharmano, nHo) y ácido 3,5-dihidroxibenzoico (ácido gentísico, DHBA) como matriz en modo iónico positivo y negativo. Las soluciones de muestra fueron colocadas en una placa de acero pulido MTP 384 de Bruker Daltonics. La solución matriz fue preparada por disolución de nHo o ácido gentísico en agua (1mg/ ml). El método de preparación de la muestra en gota o sándwich en seco se utilizó de acuerdo a Nonami *et al.* (1997), cargando 0,5 µl de solución matriz, solución analito y solución matriz después de secar cada capa a atmósfera normal y temperatura ambiente. La relación matriz-analito fue 3:1 (v/v). La ionización/desorción se obtuvo usando un láser Nd:YAG láser (355-nm). La potencia del láser se ajustó para obtener una alta relación señal/ ruido garantizando la mínima fragmentación de los iones patrones y cada espectro de masa fue generado por un promedio de 100 pulsos de láser. Los espectros se obtuvieron y analizaron con los programas FlexControl y FlexAnalysis, respectivamente.

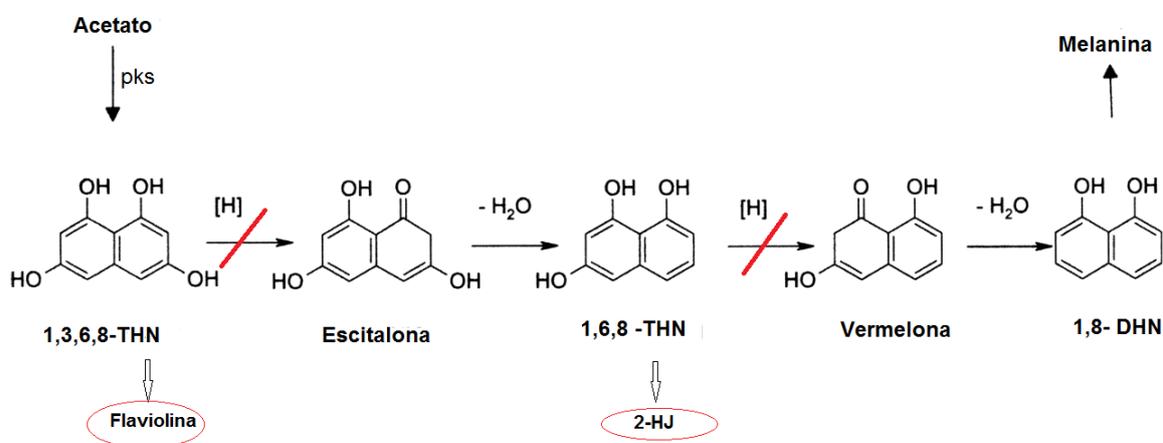


Figura 3.2.2. Ruta de síntesis de la melanina dihidroxinaftaleno (DHN). Las líneas señalan los puntos donde actúa el Triclazole inhibiendo las enzimas reductasas. Los círculos señalan los metabolitos secundarios acumulados (Butler *et al.*, 2005).

3.2.9. Actividad antioxidante de melaninas.

La capacidad antioxidante de la melanina aislada de T4 y S3b se determinó según el método del molibdato de amonio (Huang *et al.*, 2010). La melanina y el

antioxidante de referencia butil-hidroxitolueno (BHT) son agentes (reductores) que reducen el Mo de VI a V. El molibdato reducido forma un complejo con el fosfato de color verde a pH ácido. A 2 ml de una suspensión de melanina (0,5 mg/ ml) en buffer fosfato (0,2 M, pH 6,6) se agregó 2 ml de la solución reactivo (0,6 M ácido sulfúrico, 28 mM fosfato de sodio y 4 mM de molibdato de amonio). Los tubos se taparon e incubaron en baño térmico a 95°C por 120 min. Luego la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se centrifugó por 10 min a 10.000 x g y se determinó la absorbancia a 695 nm. Las lecturas se realizaron cada 30 min. La actividad antioxidante se expresó como la absorbancia de la muestra, utilizándose como antioxidante de referencia el BHT (0,5 mg en solución alcohólica). Además una mezcla control sin melanina ni BHT fue también analizada. Las mediciones se realizaron por triplicado.

3.2.10. Actividad quelante de melaninas.

Se evaluó según Farhan *et al.* (2012) la habilidad de la melanina para competir con la ferrocina en el efecto quelante del ion hierro (II). Diferentes cantidades de melanina (2-15 mg) se incubaron con 0,6 mM de ferrocina y 0,12 mM de sulfato de hierro (II) por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las mezclas se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min y sobre el sobrenadante se estimó la absorbancia a 562 nm. La habilidad de la melanina para quelar el ión ferroso se calculó en relación al control (fe y ferrocina), con la siguiente fórmula:

Ion ferroso-habilidad quelante (%) = $\frac{((\text{abs. Control} - \text{abs. muestra}))}{(\text{abs Control})} * 100$.

También se realizaron paralelamente mezclas con Edta-sodio que se usó como referencia ya que inhibe completamente la formación del complejo Fe (II)-ferrocina. Las mediciones se realizaron por triplicado.

3.2.11. Análisis estadístico.

El diseño experimental fue completamente al azar. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con los datos del contenido de fenoles, la actividad antioxidante y la habilidad quelante de las melaninas. La comparación de medias, cuando el ANOVA resultó significativo al 0,05, se realizó con el test de Tukey al nivel de 0,05 de significancia. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Statistica versión 7.1.

3.3 Resultados

Se obtuvieron $1,66 \pm 0,64$ mg de melanina por g de material seco de *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b) cultivado 21 días en el medio PG y una cantidad considerablemente mayor $4,07 \pm 0,89$ mg/g en el caso de *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4).

3.3.1. Espectroscopía UV-visible.

Los espectros de absorbancia UV-visible (200-800 nm) de los pigmentos purificados de S3b y T4 mostraron un pico de absorbancia característico a 230 nm. Dicha absorbancia disminuyó progresivamente con el incremento de la longitud de onda (Figura 3.3.1). Las pendientes del gráfico \log_{10} de la absorbancia (200-800 nm) versus la longitud de onda fueron de -0,0039 y -0,0049 en S3b y T4 respectivamente (recuadro en la Figura 3.3.1). A pesar del similar espectro para ambas melaninas, se detectaron menores niveles de absorbancia relativa en T4 respecto a lo observado para S3b.

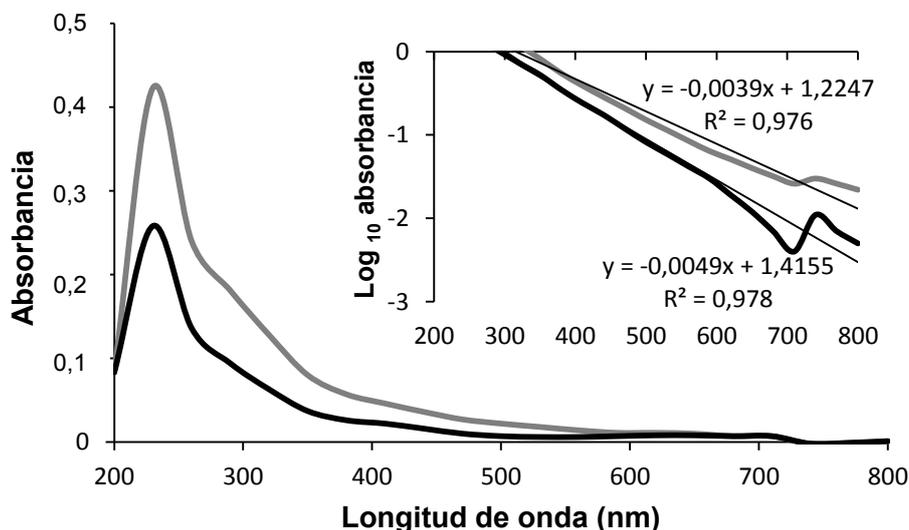


Figura 3.3.1. Espectro de absorción de 1 mg del pigmento purificado disuelto en hidróxido de sodio 0,1 M. En el recuadro se observa el gráfico lineal con las pendientes negativas. La línea negra corresponde a *P. griseola f. mesoamericana* (T4) y la gris al aislamiento *P. griseola f. griseola* (S3b).

3.3.2. Espectroscopía de fluorescencia.

Se analizó la capacidad para fluorescer de los productos alcalino-solubles de la degradación oxidativa de la melanina y del micelio de S3b y T4 (Figura 3.3.2 y Figura 3.3.3). La solución alcalina de la mezcla de reacción oxidativa conteniendo el micelio de T4 demostró tener un pico de emisión a 433 nm y uno de excitación a 361 nm. Mientras que la solución alcalina resultante de la mezcla de reacción conteniendo la melanina de T4 no reveló ninguna señal de fluorescencia, cuando ésta se diluyó 10 veces se detectó un pico de emisión a 529 nm y uno de excitación a 469 nm. Con respecto al aislamiento S3b, la solución alcalina de la mezcla de reacción con el micelio seco y con la melanina aislada presentó un pico de emisión a 494 y 470 nm y uno de excitación a 431 y 391 nm respectivamente. Soluciones alcalinas de mezclas de reacción con la melanina aislada de T4 sin peróxido de hidrógeno (control) no mostraron fluorescencia, incluso después de diluirlas (datos no mostrados).

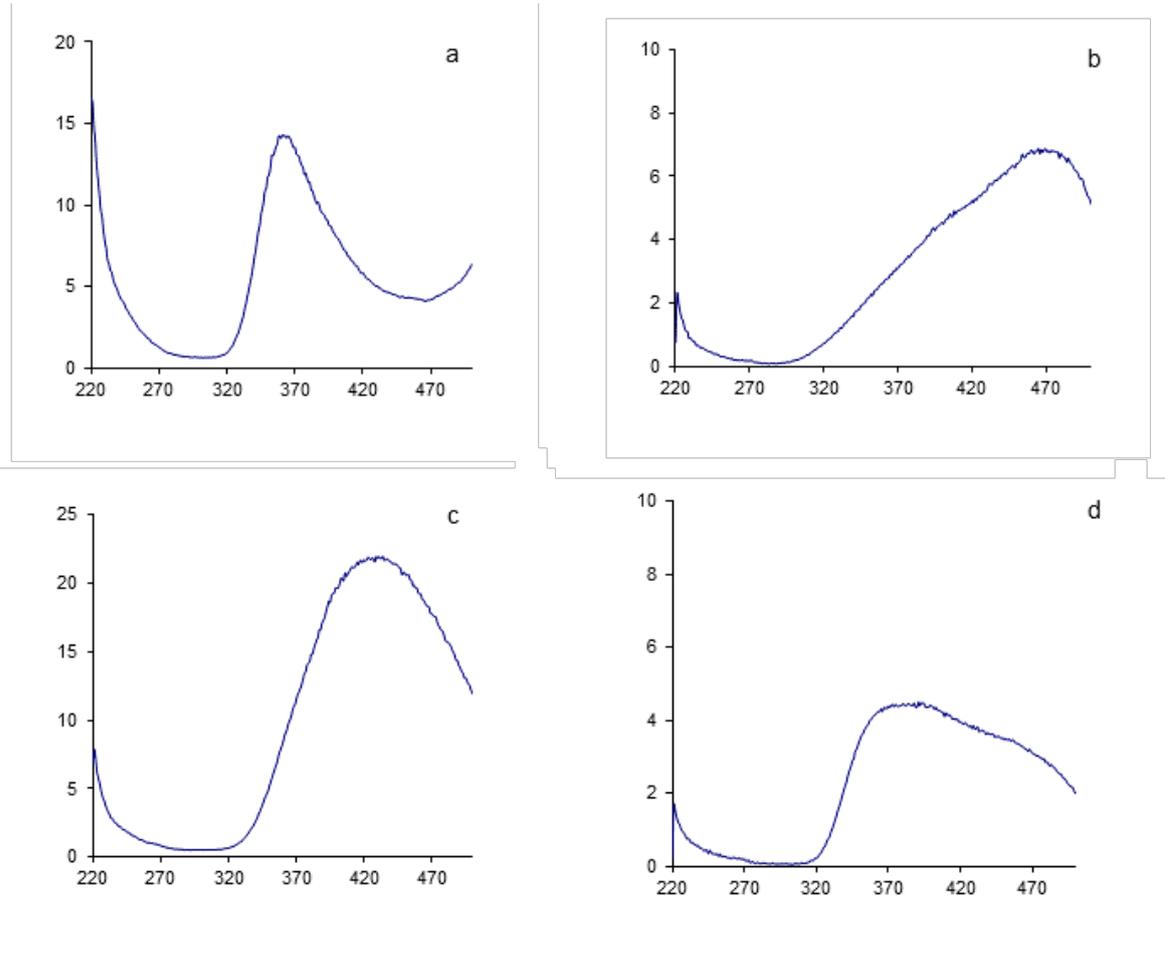


Figura 3.3.2. Espectros de fluorescencia de los productos de degradación oxidativa de las muestras: espectro de excitación de: micelio y melanina de T4 (a y b) y micelio y melanina de S3b (c y d). En el eje x se indica la longitud de onda (nm) y en el eje y la intensidad.

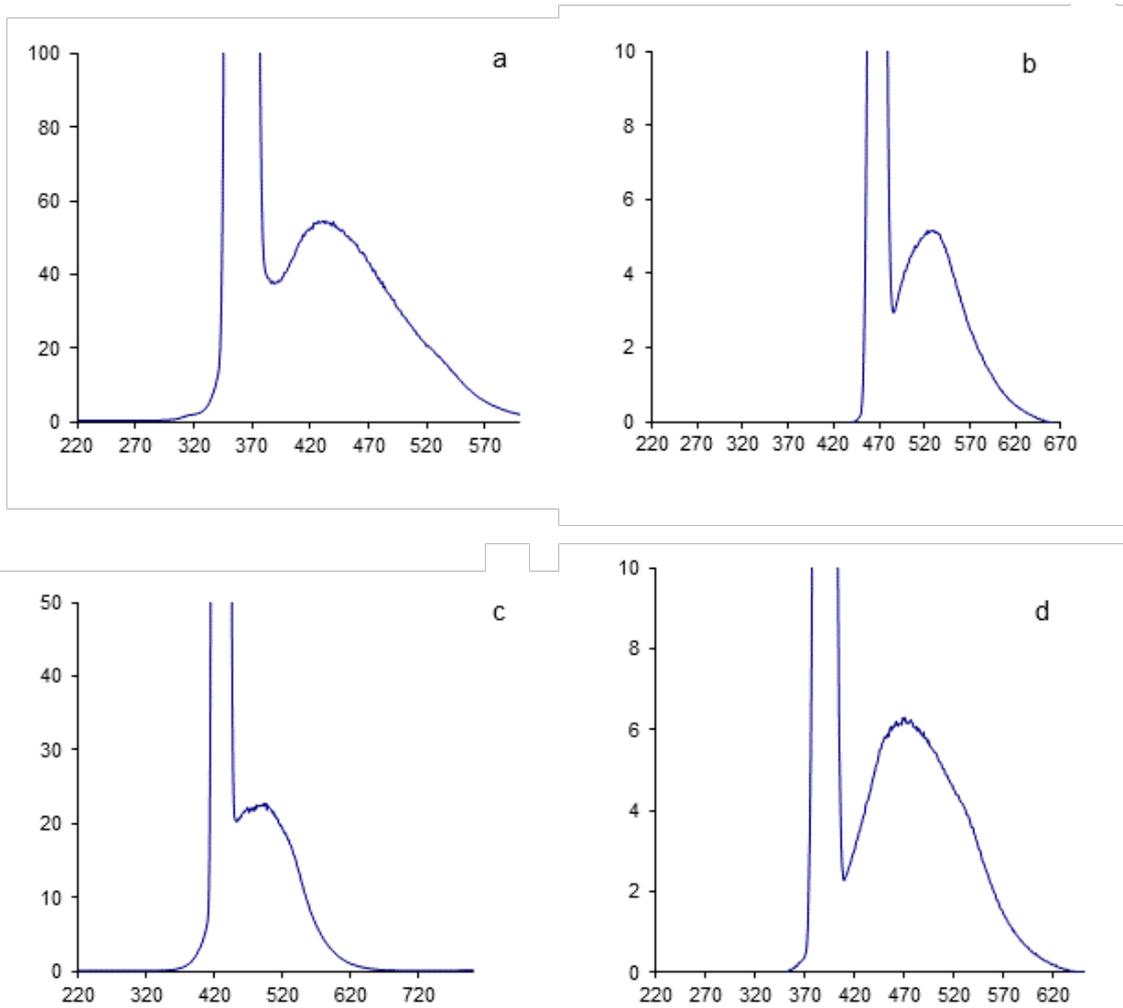


Figura 3.3.3. Espectros de fluorescencia de los productos de degradación oxidativa de las muestras: espectro de emisión de: micelio y melanina de T4 (a y b) y micelio y melanina de S3b (c y d). En el eje x se indica la longitud de onda (nm) y en el eje y la intensidad.

3.3.3. Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica.

El espectro de RPE de los pigmentos de ambos aislamientos en fase sólida y en solución mostró una señal de $g = 2,006$, una característica compatible a la existencia de radicales libres estables en la estructura del pigmento (Figura 3.3.4).

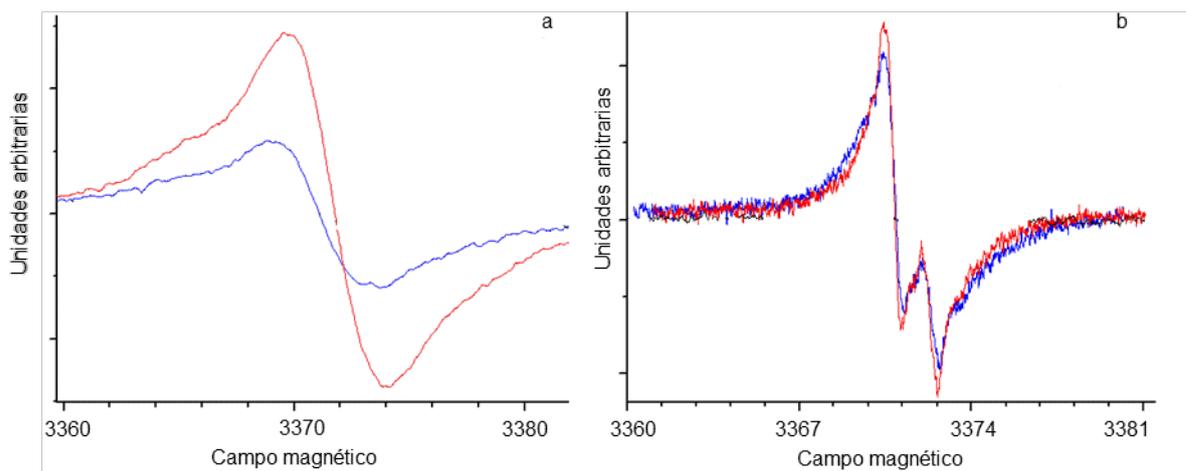


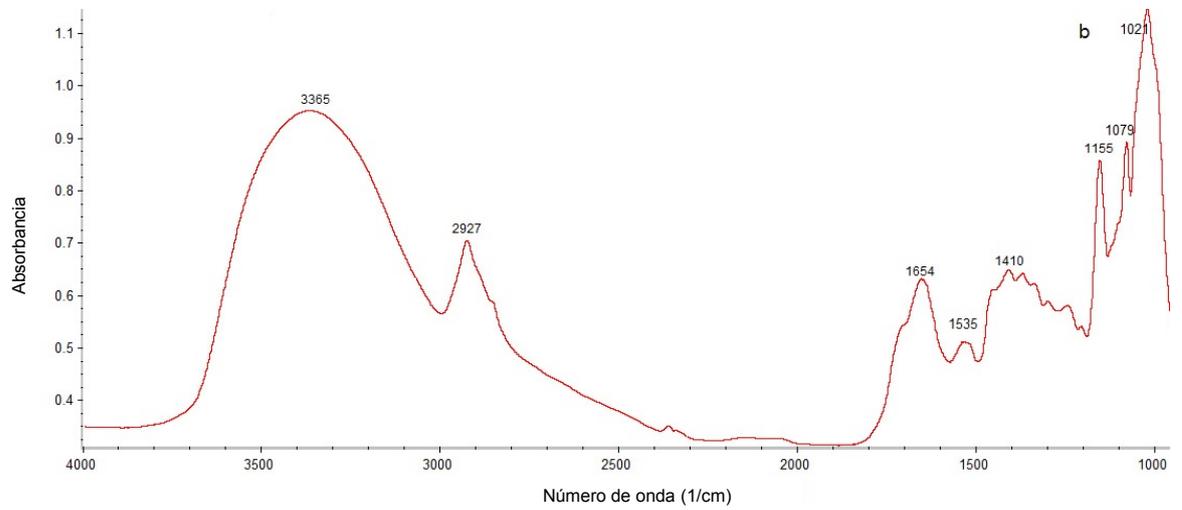
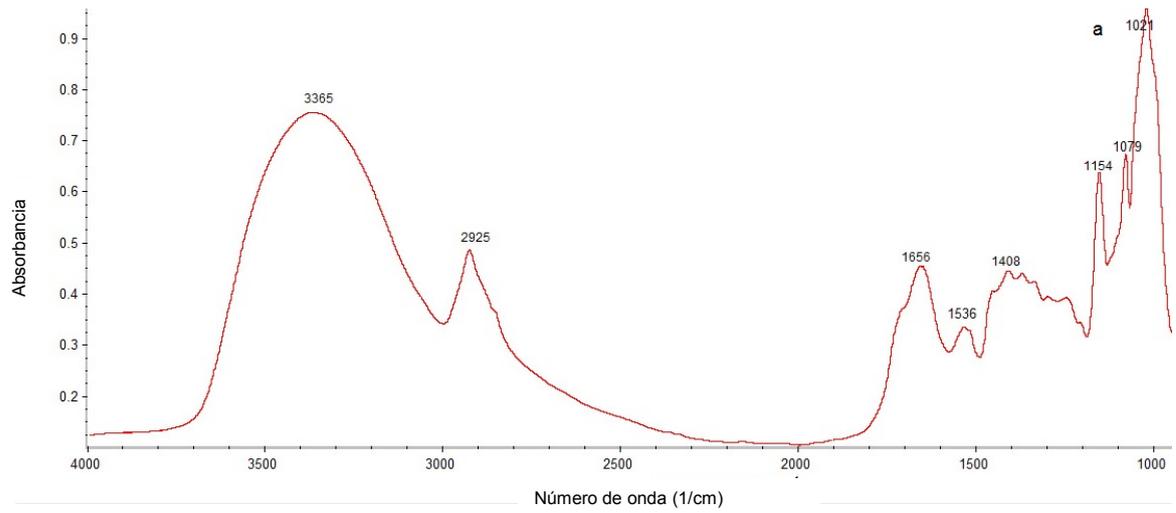
Figura 3.3.4. Espectro RPE de muestra sólida (a) y en solución alcalina (b) de la melanina extraída de *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b, línea azul) y *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4, línea roja).

3.3.4. Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier.

La Figura 3.3.5 muestra los espectros FT-IR de la melanina extraída y de la biomasa seca de *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b) y de *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4). La melanina de los dos aislamientos se caracterizó por presentar un patrón de bandas de absorción característico. Este está compuesto por 1) una banda de absorción amplia entre 3440-3300 $1/\text{cm}$, que se asigna a los estiramientos de los enlaces O-H y N-H. La marcada intensidad de la banda se atribuye a la presencia de grupos N-H en proteínas asociadas a la melanina; 2) banda entre 2920-2850 $1/\text{cm}$ que se asigna al estiramiento de los enlaces C-H de los grupos metilo y metileno; 3) una banda de absorción a 1644-1656 $1/\text{cm}$ que corresponde a los

dobles enlaces conjugados C=C y C=O de los anillos aromáticos y C=O en aminas secundarias. Esta banda, es típica de estructuras quinoides conjugadas, por lo que es clave como elemento de identificación de melanina; 4) una banda entre 1536-1553 que corresponde a deformaciones de grupos C-N y N-H en amidas II; 5) una banda de 1370-1410 $1/\text{cm}$ que corresponde a la absorción de vibraciones de grupos C-H adyacentes a grupos COOH y OH, y C=O de quinonas; 6) una banda intensa entre 1100 y 1050 $1/\text{cm}$, que representa las vibraciones de los grupos C-O de alcoholes alifáticos. A diferencia de los espectros obtenidos con las melaninas aisladas, aquellos correspondientes a la biomasa (Figura 3.3.5c y d, S3b y T4 respectivamente) mostraron bandas de absorción a 1746 $1/\text{cm}$ y a 1241-1246 $1/\text{cm}$, asignadas a estiramientos C=O en ésteres y estiramientos C-O de grupo fenol del anillo aromático y del grupo acetilo de polisacáridos. Además en los espectros de biomasa de S3b la relación entre la banda a 1651 y 1746 fue mayor que la misma relación en la biomasa de T4.

CAPITULO III



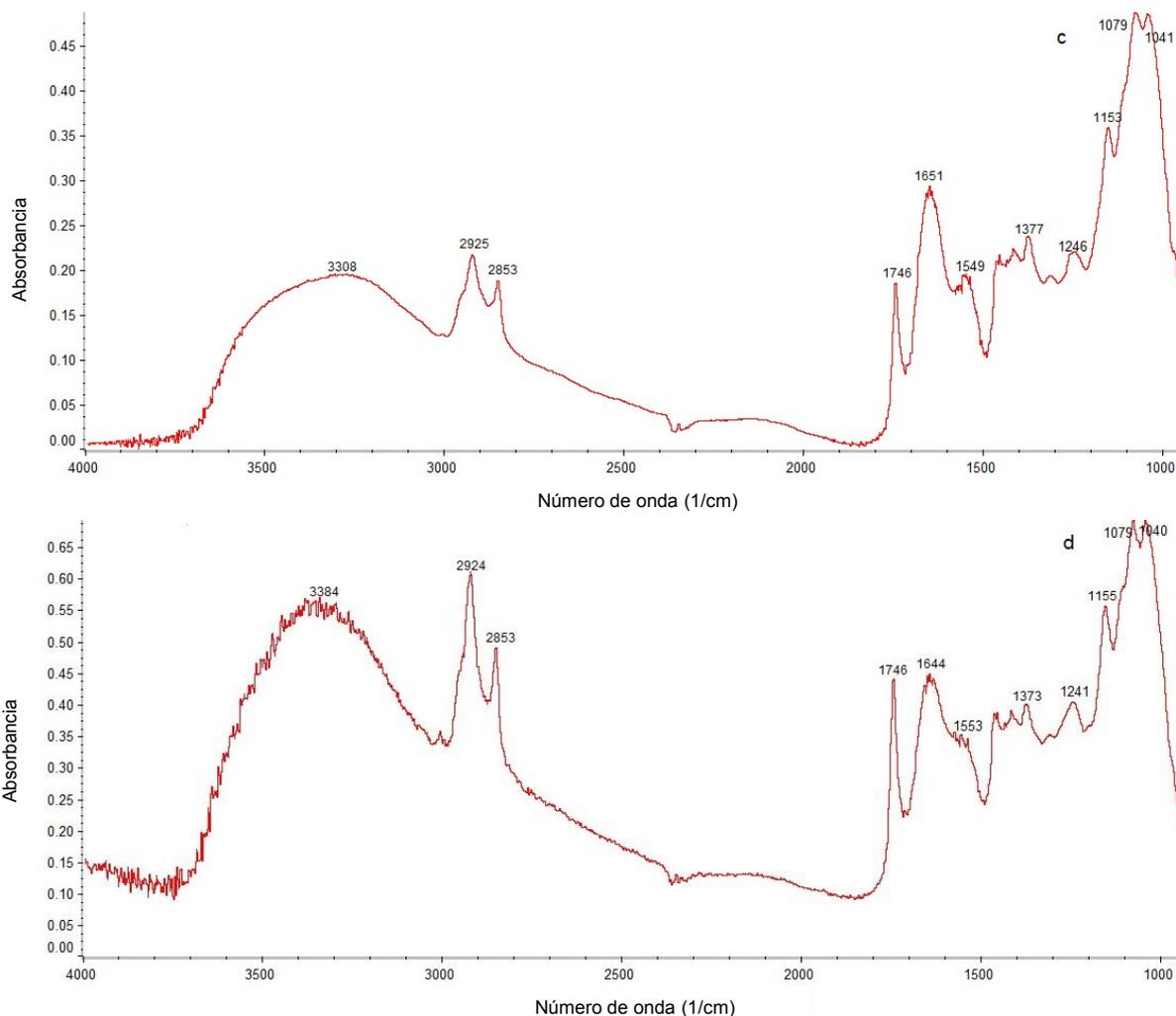


Figura 3.3.1. Espectro Infrarrojo con transformación de Fourier (FT-IR) de la melanina extraída de *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b) (a) y *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4) (b), y de la biomasa de *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b) (c) y *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4) (d).

3.3.5. Determinación de grupos fenólicos.

El contenido de grupos fenólicos en las muestras de micelio seco y de melaninas es dependiente del tamaño de muestra (Tabla 3.3.1). Mientras que el contenido fenólico en el micelio del aislamiento T4 fue mayor que aquel en S3b usando tanto 1 o 10 mg de muestra de partida, similares niveles de fenoles se estimaron en las muestras de 1 mg de melanina para ambos aislamientos. Sin embargo, una mayor cantidad de fenoles se encontró en los 10 mg de melanina de S3b comparado a aquellos de T4. Asimismo, la carga de fenoles mostró un patrón

diferencial según el tipo de muestra de partida, su masa y/o el aislamiento. En el aislamiento S3b a igual cantidad de muestra el contenido de fenoles fue mayor en las muestras de melanina comparado a aquella encontrada en el micelio. Contrariamente, en el aislamiento T4 similares contenidos de fenoles se encontraron en muestras de 1 mg de micelio y melanina, aunque éste fue superior en el micelio cuando la muestra fue de 10 mg.

Aislamiento	Muestra	mg de muestra	Cont.fenoles (μg)
T4	micelio	1	425 ± 43^b
		10	1956 ± 47^e
	melanina	1	517 ± 48^b
		10	1513 ± 82^d
S3b	micelio	1	136 ± 16^a
		10	909 ± 120^c
	melanina	1	582 ± 53^b
		10	1870 ± 37^e

Tabla 3.3.1. Contenido de grupos fenólicos expresado en μg por muestra en *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b) y *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4). Valores con letras distintas indican diferencias significativas entre ellos (Test de Tukey, $P < 0,05$).

3.3.6. Identificación de intermediarios de la síntesis de melanina por UV-MALDI MS.

El análisis de espectrometría de masas UV-MALDI de los extractos de acetato de etilo de *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4) estuvo orientado a identificar precursores de la melanina DHN. La Figura 3.3.7 muestra los espectros de masas UV-MALDI de extractos de acetato de etilo correspondientes a cultivos de 21 días del aislamiento T4 creciendo sobre APG y APG suplementado con 100 mg/L de Triciclazole (Figura 3.3.7 a y b, respectivamente). Se detectó en los espectros correspondientes a cultivos en presencia de Triciclazole una señal de $m/z = 206,52$, compatible con el compuesto flaviolina (2,5,7-trihidroxi-1,4-naftoquinona, masa exacta 206,02, Figura 3.3.6 b), el cual es un producto de oxidación del 1,3,6,8-

tetrahidroxinaftaleno (1,3,6,8-THN). El espectro MS/MS confirmó el resultado ya que detectó el ión $[M^+, C_{10}H_6O_5]$ y su patrón de fragmentación (Figura 3.3.8 y Figura 3.3.9). La señal de $m/z = 206,52$ no se detectó en la muestra del control (cultivos sobre APG; Figura 3.3.7 a) como así tampoco en la matriz cluster (Figura 3.3.7 c). Por otro lado es importante destacar que el micelio y el medio extracelular analizado de los cultivos realizados en presencia de Triciclazole tienen una coloración rojiza (Figura 2.3.2.1 c y d, del Capítulo II). Además y también en presencia del inhibidor se detectó una señal $m/z = 190,39$. Para determinar si ésta última señal corresponde al intermediario 2-hidroxijuglone (2-HJ; masa exacta = 190,02) o al Triciclazole protonado (masa exacta = 190,04), se procedió a determinar el espectro de masa del Triciclazole (Figura 3.3.7 d). Como se esperaba, se encontró el Triciclazole protonado ($m/z = 190,15$), con sodio ($m/z = 212,14$) y con potasio ($m/z = 228,21$). Además, el espectro de masa UV-MALDI MS/MS del ion con $m/z=190$ observado en el espectro de Triciclazole (Figura 3.3.10 b) y en el espectro de los extractos de acetato de etilo del aislamiento T4 creciendo sobre APG suplementado con 100 mg/L de Triciclazole (Figura 3.3.10 a) presentó un patrón de fragmentación similar indicando que la señal anterior (Figura 3.3.7, b) corresponde a la fracción de Triciclazole.

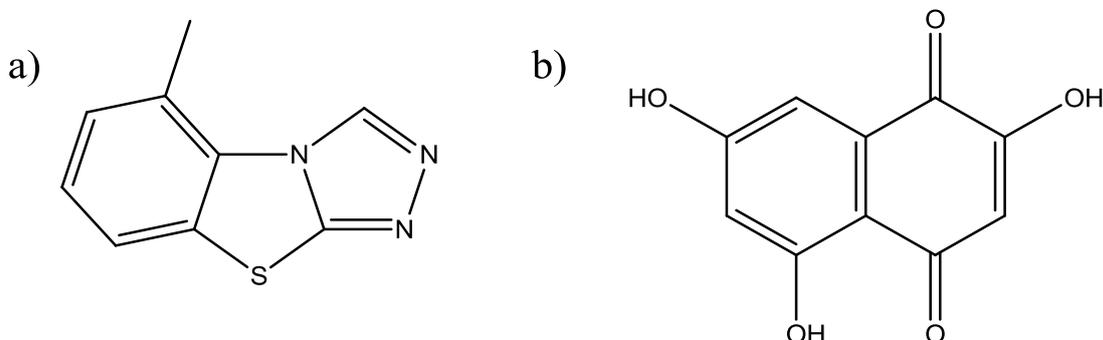


Figura 3.3.2. Estructura química de a) Triciclazole, inhibidor de la síntesis de melanina-DHN, y b) flaviolina, producto derivado de la inhibición de la melanina de *P. griseola f. mesoamericana* (T4) por el Triciclazole.

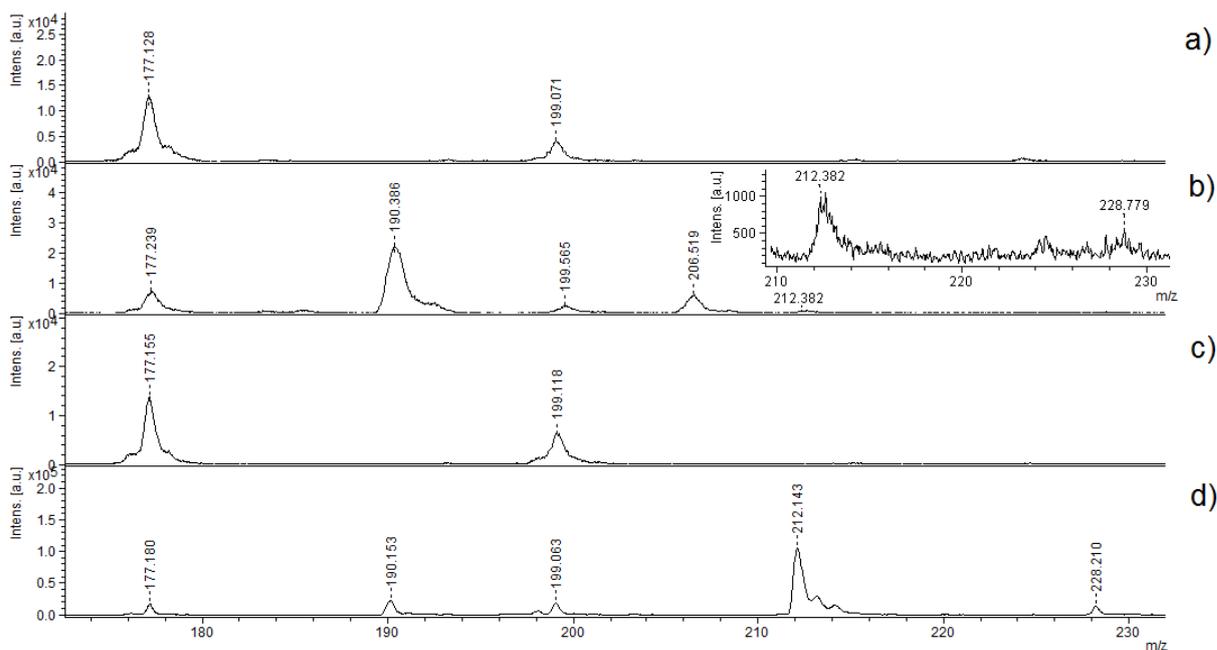


Figura 3.3.3. Espectro de masas MALDI en modo positivo de extractos correspondientes a cultivos de 21 días de crecimiento de T4 sobre APG: a) control 24 h y b) APG+ 100 mg/L Triciclazole 24 h, se incluye un recuadro que muestra la región m/z 210-230 con aumento; c) ácido gentsísico (matriz) y d) Triciclazole. Picos asignados: m/z = 190 [Triciclazole +H]⁺; m/z = 206 [flaviolina +H]⁺; m/z = 212 [Triciclazole +Na]⁺; m/z = 228 [Triciclazole +K]⁺.

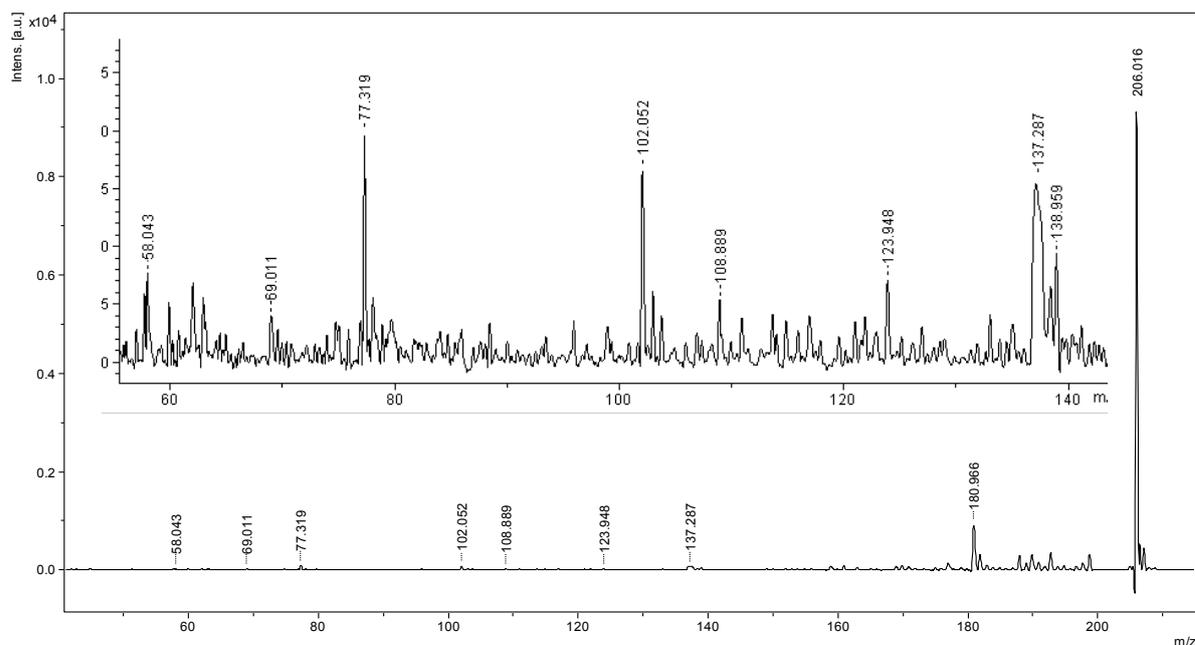


Figura 3.3.4. Espectro MS/MS MALDI de la señal m/z 206 obtenida desde extractos de acetato de etilo correspondientes a cultivos de 21 días de T4 crecido sobre APG+ 100 mg/L de Triciclazole (ver figura 3.3.7 b). En el recuadro: región m/z 55-145.IÓN

precursor, m/z 206 [M^+ ; $C_{10}H_6O_5$]; fragmentos observados: m/z 180, [$M^+ - 26$; $C_8H_4O_5$]; m/z 137 [$M^+ - 69$; $C_7H_5O_3$]; m/z 108 [$M^+ - 98$; $C_6H_4O_2$] y m/z 69 [$M^+ - 137$; C_3HO_2].

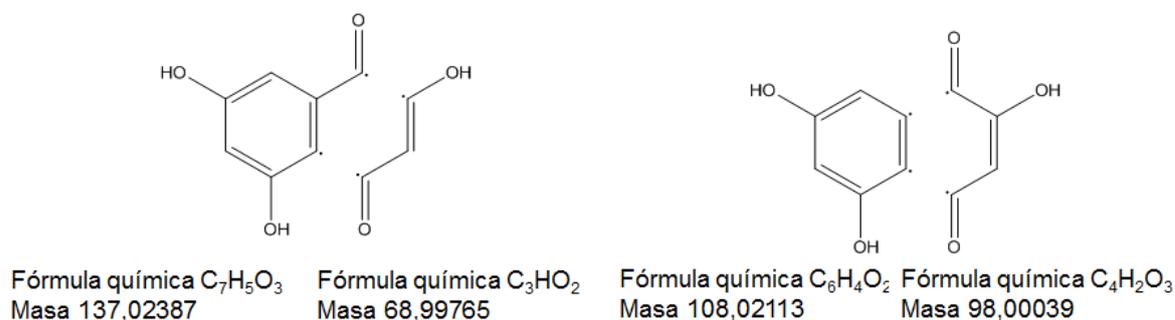


Figura 3.3.9. Estructura y masa propuesta de algunos fragmentos formados desde el ión molecular flaviolina [M^+ ; m/z 206].

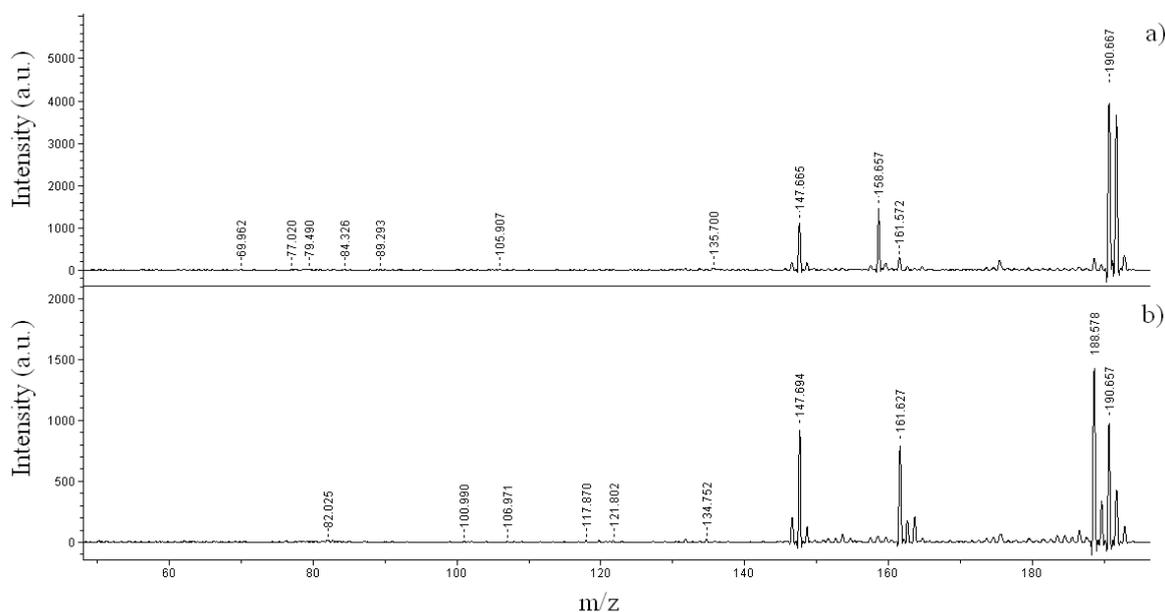


Figura 3.3.10. Espectro de masas UV-MALDI MS/MS ión positivo del ión [$M+H$] $^+$ con m/z 190 desde a) extracto de acetato de etilo correspondiente a cultivos de 21 días de T4 sobre APG+ 100 mg/L Triciclazole 24 h y b) Triciclazole de referencia.

3.3.7. Actividad antioxidante de melaninas.

Aunque la melanina aislada de los cultivos de T4 y S3b mostró actividad antioxidante (Figura 3.3.11), ésta fue comparativamente inferior al BHT. Asimismo, la melanina correspondiente a T4 mostró una mayor actividad antioxidante comparado a lo observado con aquella de S3b en los diferentes tiempos de reacción analizados.

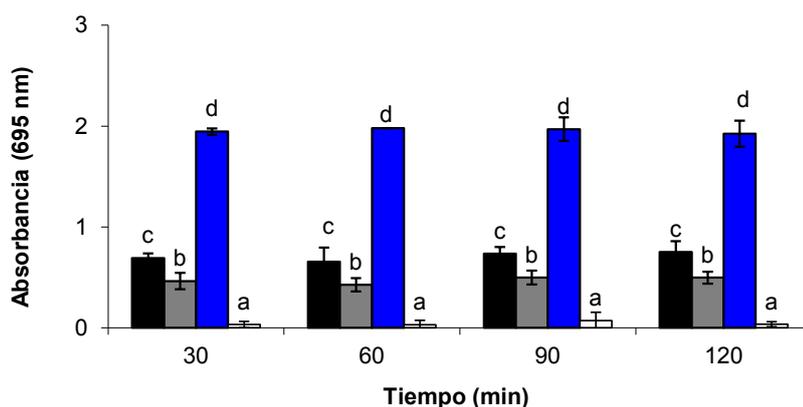


Figura 3.3.11. Actividad antioxidante total de la melanina de T4 (barras negras) y S3b (barras grises) y del BHT (barras azules). Las barras blancas corresponden a la mezcla control. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes (Test de Tukey, $P < 0,05$).

3.3.8. Actividad quelante de melaninas.

Se evaluó la capacidad competitiva de las melaninas para inmovilizar hierro (II) respecto a la ferrocina. Mientras que 15 mg de melanina de T4 tuvo una actividad quelante equivalente al 55%, 10 mg de melanina de S3b secuestró un 18% de hierro. El EDTA mostró una capacidad quelante del 98 %, ya que inhibe la formación del complejo hierro-ferrocina (Figura 3.3.12).

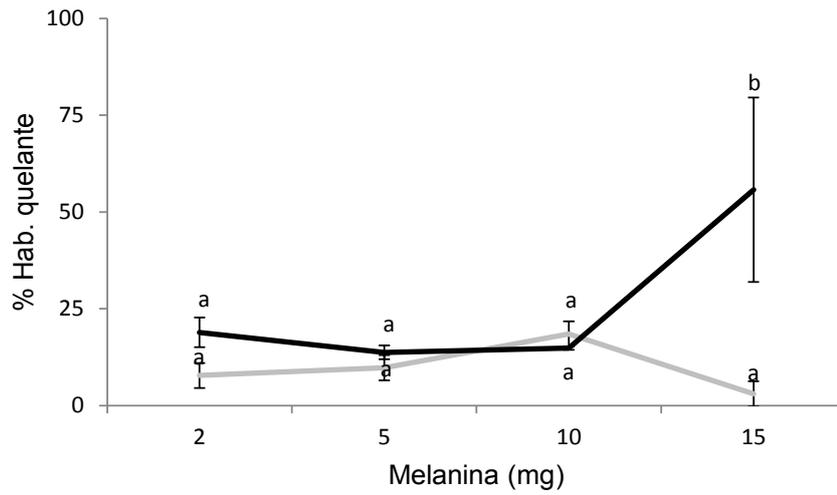


Figura 3.3.12. Porcentaje de capacidad de la melanina de T4 (línea negra) y S3b (línea gris) para quelar el hierro. Letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey, $P > 0,05$).

3.4 Discusión

El contenido de melanina de los hongos es variable (Babitskaya *et al.*, 2000; Goncalves *et al.*, 2012; Beltrán-García *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015). Se encontró que *P. griseola* tiene melanina en cantidades superiores a *Mycosphaerella fijiensis* (0,008 mg de melanina por g de biomasa; Beltrán-García *et al.*, 2014), pero menor que *Aspergillus carbonarius* (108 mg/ g de biomasa) y *Paecilomyces variotii* (77,6 mg/g) (Babitskaya *et al.*, 2000), *Aspergillus nidulans* (94 mg/ g de biomasa; Goncalves *et al.*, 2012) y *Rhizoctonia solani*, (aunque en este último caso la cantidad de melaninas es por peso fresco de micelio 27 mg/g de biomasa; Chen *et al.*, 2015).

Las melaninas presentan un espectro UV-visible característico y que se ha observado en pigmentos obtenidos de *Aspergillus bridgeri* (Kumar *et al.*, 2011), *A. flavus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. terreus*, y *A. tamarii* (Pal *et al.*, 2014), *Lachnum singerianum* (Ye *et al.*, 2011), *Mycosphaerella fijiensis* (Beltrán-García *et al.*, 2014) y *Phyllosticta capitalensis* (Suryanarayanan *et al.*, 2004). Kumar *et al.* (2011) han sugerido que la absorción de las melaninas en la región UV está asociado a la presencia de grupos fenólicos. En este sentido las fracciones de la melanina de S3b mostraron una mayor presencia de grupos fenólicos en relación a la melanina de T4. No obstante, la reacción de Folin, usada en la estimación de grupos fenólicos, resultó dependiente de la cantidad de muestra. La pendiente de los gráficos del \log_{10} de la absorbancia de las melaninas de S3b y T4 versus la longitud de onda estimada en este trabajo resultó diferente a las reportadas por Saparrat *et al.* (2009). No obstante, puesto que Ellis & Griffiths (1974) reportaron que esta pendiente puede cambiar con el tiempo posiblemente por alteración oxidativa de la melanina en solución alcalina, las pendientes correspondientes a diferentes procesos de extracción no pueden ser comparadas.

Los espectros de fluorescencia de excitación y emisión de la melanina del aislamiento T4 fueron similares a los encontrados por Kayatz *et al.* (2001) en la

melanina sintética oxidada y en los melanosomas bovinos aislados. En cambio, la melanina de S3b presentó espectros diferentes, aunque estas diferencias podrían ser el resultado de la baja cantidad de melanina utilizada. Con respecto a los espectros de fluorescencia de los micelios de ambos aislamientos, éstos son diferentes de los de las melaninas, lo que probablemente refleje diferencias en la composición. Durante el proceso de extracción de la melanina se eliminan diversos componentes de la pared que probablemente modifican las características de los espectros de absorción.

En relación a varios cromóforos orgánicos muchas características de la emisión de melanina son atípicas. Entre éstos se destaca, la dependencia de la energía de excitación en el espectro de emisión, la ruptura de la regla de que los espectros son imágenes especulares (Riesz, 2007). Todas estas características atípicas sugieren un desorden químico, que podría originarse en la mezcla de especies químicamente diferente en este polímero (Riesz, 2007).

La detección de un pico en el espectro RPE correspondiente a la presencia de radicales libres estables en la estructura de las melaninas de S3b y T4 es una característica diagnóstica en este tipo de pigmentos (Enochs *et al.*, 1993). Espectros RPE similares se reportaron para las melaninas extraídas de *Aspergillus bridgeri* (Kumar *et al.*, 2011), *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. tubingensis* y *A. tamaritii* (Pal *et al.*, 2014), *Cladosporium cladosporoides* (Llorente *et al.*, 2012), *Cryptococcus neoformans* (Rosas *et al.*, 2000), *H. capsulatum* (Nosanchuk & Casadevall, 2003), *Paracoccidioides brasiliensis* (Gomez *et al.*, 2001), *Phyllosticta capitalensis* (Suryanarayanan *et al.*, 2004) y *Sporothrix schenckii* (Morris-jones *et al.*, 2003).

La información obtenida con FTIR sobre los grupos funcionales presentes en la melanina de *P. griseola* sugiere que el pigmento posee una estructura quinoide conjugada típica, así como también un componente melanoproteico, rasgos que son característicos de las melaninas (Bell & Wheeler, 1986). La detección de grupos con nitrógeno en la estructura del material analizado por FTIR probablemente se deba a la

interacción de las proteínas de la pared celular que se acomplejan con la melanina DHN (Beltrán-García *et al.*, 2014). No obstante, en estas muestras de melaninas no se encontraron las bandas 1320-1390 que corresponden a enlaces C-N. Estas bandas, sin embargo, aparecen en las muestras de biomasa, aunque con una intensidad bastante baja, lo que estaría sugiriendo que esas bandas podrían corresponder a proteínas que son eliminadas durante la extracción de melaninas. Goncalves *et al.* (2012) han propuesto que las bandas 1320-1390 corresponden a la presencia de grupos indol en la estructura de melaninas. No obstante, según Butler & Day (1998) la espectroscopía FTIR no es útil para distinguir entre los tipos de melaninas, aunque la melanina GHB de *A. bisporus* sería una excepción ya que tiene características en su espectro IR que no se ven en otros tipos de melaninas (Pierce & Rast, 1995).

En el espectro FTIR de la melanina de *Phyllosticta capitalensis* (Suryanarayanan *et al.*, 2004), *Aspergillus bridgeri* (Kumar *et al.*, 2011), *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. terreus*, *A. tamarii* (Pal *et al.*, 2014) y *Fonsecaea pedrosoi* (Alviano *et al.*, 1991) también se identificaron picos similares a los que se detectaron en este trabajo en *P. griseola*.

Aunque los resultados de los espectros de absorción, de fluorescencia, de RPE y de FTIR muestran que los pigmentos presentan todas las características propias de la melanina, no permiten determinar el tipo de melanina que sintetiza *P. griseola*. Es así que para obtener información sobre la estructura de los intermediarios de la ruta de síntesis de la melanina de este hongo se utilizó el análisis de MALDI-TOF. Esta última es una herramienta clave para la identificación de la naturaleza química de compuestos de bajo peso molecular, tales como los metabolitos intermediarios incluidos en la síntesis de melanina. Se encontró en los extractos analizados un compuesto que mostró un espectro de MS/MS con un patrón de fragmentación típico similar al de la flaviolina (McLafferty & Turecek, 1993). La flaviolina es un compuesto que resulta de la autoxidación del 1,3,6,8-THN debido a que el Triciclazole inhibe a las

reductasas (Zeng *et al.*, 2012). Esto es una evidencia que *P. griseola* sintetiza melaninas por la vía DHN, lo que ya ha sido sugerido por Saparrat *et al.* (2009). En los extractos de acetato de etilo del micelio de T4 desarrollado en presencia de Triciclazole no se detectó ni siquiera trazas de 2HJ. El 2HJ es un compuesto proveniente de la autoxidación de 1,3,6-THN por la inhibición de otra reductasa por el Triciclazole que suele también ser utilizado como elemento para identificar la melanina DHN (Butler & Day, 1998). En contraposición con los resultados descritos en ensayos de inhibición de la melanina DHN con Triciclazole en *Alternaria solani* se detectó el metabolito 2HJ mientras que no se encontró flaviolina, cuando el hongo creció en presencia de altas concentraciones de Triciclazole (Lazarovits & Stoessl, 1988). En *Verticillium dahliae*, un rango entre 1-20 mg/L del inhibidor provocó un incremento en la producción de 2HJ y una disminución en el nivel de flaviolina (Lazarovits & Stoessl, 1988). De acuerdo a Lazarovits & Stoessl (1988) el tipo de melanina y los productos acumulados resultantes de su inhibición por Triciclazole son dependientes tanto de la concentración de este fungicida y del hongo testeado. Puesto que en este trabajo los metabolitos se extrajeron a partir de cultivos que se desarrollaron solo a una concentración de Triciclazole (100 mg/L), es probable que la presencia de flaviolina y la ausencia de 2HJ en estos cultivos se deba a la inhibición diferencial de las reductasas específicas de la ruta de las melaninas de *P. griseola*.

En síntesis, los resultados sugieren que la reductasa de *P. griseola f. mesoamericana*, que cataliza la conversión de 1,3,6,8 -THN a escitalona, tiene mayor sensibilidad al Triciclazole que la reductasa que genera vermelona. Kogej *et al.* (2004) reportaron también en *Colletotrichum lagenarium* y *Magnaporthe grisea* que la reductasa incluida en los diferentes pasos de la síntesis de melanina mostró diferente sensibilidad al Triciclazole.

Aunque las melaninas de *P. griseola*, tanto de los aislamientos S3b y T4, revelaron capacidad para inactivar especies radicalarias así como también para quelar

hierro, en el aislamiento T4 esta capacidad resultó superior comparado a la melanina de S3b. La capacidad antioxidante y/o quelante de metales de la melanina se ha asociado a su posible rol protector. Estudios realizados en *Aspergillus nidulans* (Goncalves & Pombeiro-Sponchiado, 2005) han demostrado que la melanina localizada en los conidios actúa protegiéndolos de agentes oxidantes. También en *Aspergillus bridgeri* (Kumar *et al.*, 2011), *Alternaria alternata*, *Aspergillus carbonarius*, *Paecilomyces variotii*, *Inonotus obliquus* y *Phellinus robustus* (Shcherba *et al.*, 2000) se ha reportado la actividad antioxidante de sus melaninas.

Todos estos resultados confirman la naturaleza química y las características estructurales de la melanina de *P. griseola*. Este es el primer trabajo en el que se estudiaron las propiedades antioxidantes y quelantes de las melaninas en los aislamientos de *P. griseola* pertenecientes a los grupos Andino y Mesoamericano. Se caracterizaron varios aspectos del pigmento encontrando diferencias de acuerdo al grupo génico, que podrían relacionarse con un comportamiento diferente frente a distintas condiciones ambientales.

CAPITULO IV. Enzimas involucradas en la síntesis de melaninas.

4.1 Introducción

Muchos hongos sintetizan melaninas a partir de precursores fenólicos o indólicos (Butler & Day, 1998; Langfelder *et al.*, 2003). Mientras que la melanogénesis DHN es dependiente de la actividad de diversas enzimas, la síntesis de melaninas de tipo DOPA, con tirosina como precursor, involucra la participación de enzimas lacasas y/o tirosinasas y transformaciones espontáneas (Eisenman & Casadevall, 2012). La síntesis de melanina del tipo dihidroxinaftaleno (DHN) involucra varias reacciones, cuyo precursor es el acetil-CoA o también el malonil-CoA, ambos derivados del metabolismo intermediario (Eisenman & Casadevall, 2012). Estos precursores forman por unión y ciclación la estructura de un anillo naftaleno base (Butler & Day, 1998) que es catalizado por la enzima policétido sintasa (PKS) y genera 1,3,6,8 tetrahidroxinaftaleno (1,3,6,8 THN). Esta molécula que es reducida por la acción de una reductasa específica produce escitalona que por una reacción de deshidratación forma 1,3,8 trihidroxinaftaleno (1,3,8 THN), el cual es reducido, por una segunda reductasa a vermelona. Este último metabolito por la acción de una escitalona deshidratasa forma el 1,8-DHN, que es el monómero que polimeriza y forma la melanina DHN (Eisenman & Casadevall, 2012; Figura 4.1.1).

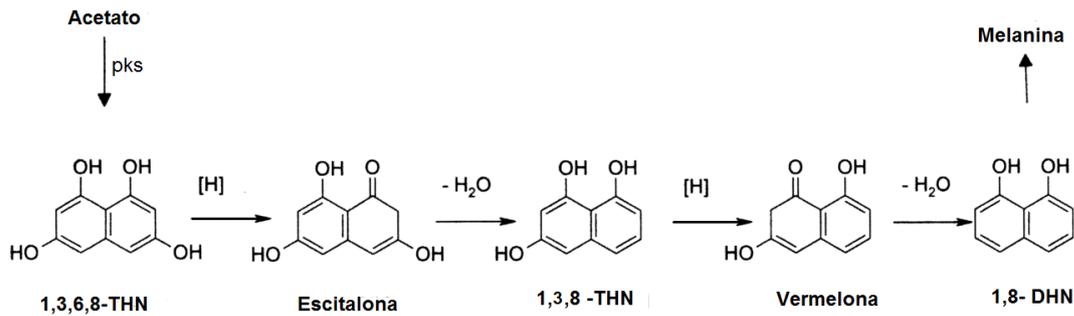


Figura 4.1.1. Síntesis de melanina DHN (Kogej *et al.*, 2004): precursor y reacciones involucradas.

Además de tener un rol en la síntesis de melaninas DHN, las PKSs son enzimas intracelulares que se han asociado a la producción de otros metabolitos secundarios de tipo policétido, como aflatoxina, toxina-T, lovastatina y ácido 6-metilsalicílico (Schumann & Hertweck, 2006). Las enzimas PKS están presentes tanto en bacterias, hongos, plantas e insectos (O'Hagan, 1995), siendo los hongos una fuente de muchos de los metabolitos descritos, los que son de interés farmacológico y agrícola (Bingle *et al.*, 1999).

Las PKSs fúngicas son enzimas multifuncionales, que tienen 8 dominios funcionales conservados (acil transferasa, AT; acil carrier, ACP; cetosintasa, KS; cetoreductasa, KR; enoil reductasa, ER; deshidratasa, DH; tioesterasa, TE y metiltransferasa, MT; Bingle *et al.*, 1999; Fuji *et al.*, 2002). De acuerdo a la presencia o ausencia de los dominios cetoreductasa (KR) y deshidratasa (DH), Schumann & Hertweck (2006) han dividido a las PKSs fúngicas en tres subclases, designadas como: unas no reductoras, otras parcialmente reductoras y un tercer grupo de las altamente reductoras. Las PKSs "no reductoras" (también denominadas tipo WA) sintetizan policétidos con una estructura química no reducida y generalmente cíclica (aromática). Entre éstos se encuentran pigmentos fúngicos como las melaninas DHN y otros pigmentos de esporas y las toxinas del tipo de las aflatoxinas. Esta clase de PKSs se caracteriza por contener solamente los dominios KS, AT y ACP; éstos

catalizan un conjunto de reacciones que generan la estructura general del policétido (Figura 4.1.2). Por otro lado, las PKSs “parcialmente reductoras” que sintetizan policétidos parcialmente reducidos, también denominadas tipo-MSAS, están involucradas en la síntesis de policétidos con varias reducciones químicas en su estructura como el ácido-6-metilsalicílico (un metabolito con actividad antibiótico en *Penicillium patulum*; Fujii *et al.*, 1996) y el inhibidor de la biosíntesis del colesterol, la lavostatina (*Aspergillus terreus*, Kroken *et al.*, 2003). Estas PKSs se caracterizan por poseer además de los dominios funcionales típicos: KS, AT, ACP, los dominios KR y DH (Figura 4.1.2). El grupo de PKSs tipo reductoras son aquellas involucradas en la síntesis de policétidos altamente reducidos (HR). La mayoría de las PKSs-HR posee los tres dominios (KR, DH y ER) necesarios para realizar reducciones. Estos tres dominios catalizan reacciones de reducción como la del grupo β -ceto a un grupo hidroxilo, la de deshidratación que ocurre cuando se produce la reducción de grupos hidroxilos a grupos enoils y la reducción del grupo enoilo al grupo alquilo, respectivamente (Figura 4.1.2).

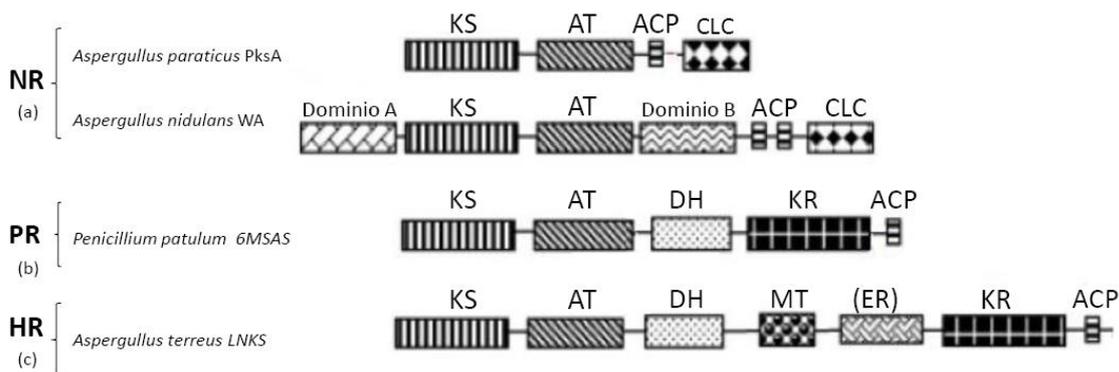


Figura 4.1.2. Arquitectura de las PKS fúngicas: KS, β -cetoacil sintasa; AT, aciltransferasa; DH, deshidratasa; KR, cetoreductasa; ER, enoil reductasa; MT, metiltransferasa; ACP, proteína acil carrier; CLC, ciclasa tipo Claisen. a) NR: no reductoras; b) PR: parcialmente reductoras; c) HR: altamente reductoras (Schumann & Hertweck 2006).

Si bien la ruta de síntesis de melaninas DHN se conoce en diferentes especies de hongos, aún no hay consenso sobre el mecanismo de polimerización de las

moléculas de DHN ni tampoco sobre las enzimas que inician el proceso. La hipótesis que predomina propone la participación de fenoloxidasas tipo lacasa (Bell & Wheeler, 1986; Edens *et al.*, 1999; Eisenman & Casadevall, 2012; Sapmak *et al.*, 2015).

Las enzimas oxidativas, como las lacasas (*p*-difenol: dioxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) son fenoloxidasas cúpricas sintetizadas por algunas bacterias, hongos, plantas e insectos (Thurston, 1994). Estas enzimas, predominantemente extracelulares, en presencia de oxígeno molecular catalizan la oxidación de un amplio espectro de compuestos, incluyendo unidades fenólicas en polímeros, compuestos aromáticos simples como fenoles solubles e iones inorgánicos, tanto en procesos de degradación como de polimerización (Thurston, 1994; Chefetz *et al.*, 1998). Por otra parte, en los hongos causantes de la pudrición blanca sobre madera, estas enzimas son consideradas diagnósticas de ligninólisis. Adicionalmente estas enzimas pueden tener otros roles vinculados con la síntesis de pigmentos y otros procesos morfogénéticos de los hongos tales como la pigmentación de conidios, la formación de la pared celular fúngica, de rizomorfos y esclerocios así como estar involucradas en reacciones de detoxificación (Saparrat *et al.*, 2010). Aunque existen formas constitutivas de estas enzimas un amplio espectro de compuestos y/o condiciones de cultivo modulan sus niveles de expresión, mediante la regulación transcripcional y activación enzimática (Saparrat *et al.*, 2010).

Puesto que *P. griseola* sintetiza melanina DHN, se llevaron a cabo estudios acorde a la detección de actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de este tipo de melaninas. A pesar de la naturaleza multienzimática de la síntesis de melanina DHN, en este trabajo se analizaron dos actividades enzimáticas: una es la actividad PKS involucrada en la formación del intermediario 1,3,6,8 THN, que conduce a la síntesis del monómero de la melanina, y la otra, la actividad oxidativa extracelular vinculada con la polimerización de estos monómeros.

Objetivos:

- Detectar actividad PKS involucrada en la síntesis de los monómeros de las melaninas en *P. griseola*.
- Detectar actividad de enzimas oxidativas extracelulares.
- Conocer y analizar la secuencia PKS en *P. griseola* y relacionarla con las secuencias de otros hongos.

Hipótesis:

P. griseola sintetiza melaninas DHN, cuyos monómeros se forman mediante la actividad de enzimas PKSs. Los monómeros de la melanina de *P. griseola* se polimerizan por la actividad de enzimas oxidativas extracelulares.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Detección de actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de melaninas.

4.2.1.1 Actividad Policétido sintasas (PKS)

Obtención del extracto enzimático:

Para obtener el extracto enzimático, micelio de cultivos líquidos de *Pseudocercospora griseola* f. *mesoamericana* (aislamiento T4) cultivados durante 21 días en medio PG se procesaron siguiendo el protocolo de Okamoto *et al.* (2001). El micelio se congeló en nitrógeno líquido y se pulverizó en mortero al que se le colocó buffer de extracción conteniendo inhibidores de proteasas (50 mM de fosfato de potasio pH 7,5, 30% glicerol, 2 mM β -mercaptoetanol, 1 mM EDTA, 0,1 mM de PMSF y 0,1 mM iodoacetato de sodio) en una relación 1:5 (1 g de micelio/ 5 ml de buffer). Al homogenato se le adicionó 0,8 g de Polyclar VT (PVPP, agente adsorbente de fenoles), y se mantuvo en hielo por 1 h. Posteriormente la suspensión se filtró a través de 4 capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 5000 x g durante 20 min. Se volvió a filtrar a través de membranas de 0,22 μ m de tamaño de poro y el extracto se utilizó como fuente de enzimas. Este último se fraccionó en alícuotas de 1 ml y se conservó a -20°C.

Detección de actividad PKS:

Esta actividad se detectó a través de la formación de flaviolina, resultante de la autoxidación del producto de catálisis enzimática 1,3,6,8-THN utilizando como sustrato malonyl-CoA (Okamoto *et al.*, 2001; Figura 4.2.1). La mezcla de reacción (255 μ l) se llevó a cabo en presencia de buffer fosfato de potasio pH 7,2 y DMSO (1,96 %) con una solución de sustrato 0,098 μ M y una alícuota de extracto enzimático (50 o 100 μ l), siendo incubado por 1 h a 24 °C. Posteriormente, la mezcla se incubó a 100 °C por 20

min para favorecer la autooxidación del producto de reacción y se conservó a -20°C para su posterior análisis por UV-MALDI MS. Paralelamente a la incubación de las mezclas incluyendo el extracto enzimático, se llevó a cabo una mezcla control negativo (sin extracto enzimático).

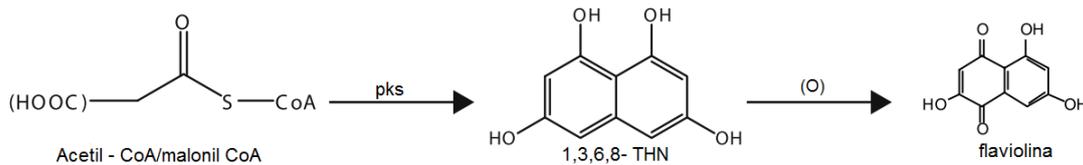


Figura 4.2.1. Reacción modelo catalizada por una enzima PKS.

Detección de flaviolina por UV-MALDI MS:

Las mezclas de reacción correspondientes a reacciones PKS y mezclas control negativo fueron analizadas por espectrometría de masas desorción/ionización de la matriz asistida por láser (UV-MALDI MS) con un equipo Ultraflex Daltonics TOF/TOF (Bruker) y ácido gentsico (AG) como matriz. Los espectros de masas se obtuvieron en modo iónico lineal positivo y negativo. La calibración de masa externa se hizo usando β -cyclodextrina (peso molecular de 1134) con norharmano (nHo) y AG como matriz en modo iónico positivo y negativo. La solución matriz se ubicó en una placa de siembra de acero inoxidable, realizándose la transferencia por el método sándwich o de capas sucesivas, de acuerdo a Nonami *et al.* (1997). Se realizaron cargas sucesivas de $0,5 \mu\text{l}$ de solución matriz, solución analito y solución matriz, secando cada capa a atmósfera normal y temperatura ambiente. La relación entre la matriz y el analito fue 3:1 (v/v). Se usó un láser Nd: YAG I (355-nm) para obtener la desorción/ionización. El espectro fue obtenido con el programa FlexControl y analizado con FlexAnalysis.

Determinación de proteínas totales:

El contenido de proteínas del extracto enzimático se determinó utilizando el método de Bradford (1976) que se basa en la unión del colorante Coomassie Blue G-250 a las proteínas generando un desplazamiento del máximo de absorbancia del colorante (estado libre) de 465 nm a 595 nm (complejo colorante-proteína; Bradford, 1976). Se realizó una curva de calibración utilizando como patrón seroalbúmina bovina en el rango de 100-1000 µg/ml. A 10 µl de muestra se les adicionaron 990 µl del reactivo de Bradford y luego de 15 min a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Shimadzu. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.2.1.2 Actividad oxidativa extracelular

Obtención de la fuente de enzimas:

Para obtener la fuente de enzimas, *Pseudocercospora griseola* f. *griseola* (aislamiento S3b) y *Pseudocercospora griseola* f. *mesoamericana* (aislamiento T4) se cultivaron en Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml del medio de cultivo líquido PG. Cada Erlenmeyer se inoculó con una suspensión de conidios, en tres réplicas por tratamiento. En base al posible carácter inducible de las lacasas, se evaluó también el efecto del agregado de sulfato de cobre 400 µM al medio de cultivo líquido sobre los niveles de actividad lacasa luego de un período inicial de crecimiento del hongo de 7 días. Todos los cultivos se mantuvieron en agitación a 150 rpm a 24 °C y en oscuridad por 21 días.

A los 7 y 14 días de cultivo se tomó en condiciones axénicas una alícuota del líquido de cada cultivo para utilizar como fuente de enzimas. Luego de 21 días el líquido de cada cultivo se filtró a través de un papel Whatman y se fraccionó en alícuotas que se utilizaron también como fuente de enzimas. Algunas de estas

fracciones fueron suplementadas con los inhibidores de proteasas iodoacetato de sodio 100 mM y PMSF 100 mM.

Determinación de actividad enzimática oxidativa:

Esta actividad se determinó en base a la cinética de la oxidación del ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)] 3 mM, en buffer fosfato de potasio - ácido cítrico 50 mM de pH 3 (Saparrat *et al.*, 2000), estimándose a través del incremento lineal de la absorbancia de la mezcla de reacción (1 ml) en un espectrofotómetro a 436 nm (ϵ_{436} : 29.300 M⁻¹cm⁻¹). A fin de evaluar la presencia de enzimas con actividad peroxidasa en el líquido de cultivo, se realizaron también cinéticas de oxidación de ABTS en presencia de los líquidos de cultivos y peróxido de hidrógeno 0,1 mM (Troncozo *et al.*, 2015).

La actividad enzimática oxidativa se expresó en miliunidades por mililitro de líquido de cultivo (mU/ml). Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de ABTS oxidado/min.

4.2.2 Identificación de secuencias génicas que codifican el dominio KS de PKSs involucradas en la síntesis de pigmentos oscuros.

4.2.2.1. Extracción de ADN y cuantificación:

Se aisló el ADN genómico de los aislamientos S3b y T4 de *Pseudocercospora griseola* cultivados sobre el medio APG, utilizando el método CTAB modificado (Borner & Branchord, 2001). Trescientos mg de micelio de cada hongo se homogeneizaron con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana estéril y a la mezcla resultante se le agregó 800 μ l de buffer CTAB (100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl), 200 μ l de solución de CTAB al 10% precalentado a 60°C, 1 μ l de β -mercaptoetanol y 1% PVPP (polivinilpirrolidona). Esta preparación se homogeneizó y se pasó a un tubo Eppendorf,

incubándose a 60°C durante 30 min. Luego este homogeneizado se lavó con un volumen de cloroformo-isoamilalcohol (600 µl), se mezcló por inversión y centrifugó 5 min a 10.000 x g. El sobrenadante acuoso (fase superior) se transfirió a otro tubo Eppendorf para precipitar el ADN en presencia de 2/3 de volumen de isopropanol frío (600 µl) y se incubó en freezer a -20°C por 24 h. Posteriormente, se centrifugó 10 min a 10.000 x g y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó con etanol 75% - acetato de amonio 10 mM y posteriormente se centrifugó a 10.000 x g por 10 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet se secó al vacío y se resuspendió en 150 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) y 1-2 µl de RNAsa (10 µg/µl). Luego, se incubó 1 h a 37°C, de manera de obtener el ADN soluble y limpio, el que se conservó en el freezer a -70°C hasta su utilización. La cantidad y calidad del ADN extraído se estimó mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,7 % con bromuro de etidio, utilizando como patrón interno el marcador molecular 1Kb DNA Ladder (Promega). La visualización de las bandas de ADN se realizó por irradiación con luz UV. Los geles se documentaron utilizando el analizador de imágenes Syngene y el software Genetools.

4.2.2.2. Amplificación de la secuencia nucleotídica que codifica el dominio KS:

La reacción de amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) fue llevada a cabo en un termociclador Minicycler TM MJ Reserch según el protocolo de Llorente *et al.* (2012) utilizando cebadores que amplifican un segmento del dominio conservado cetosintasa (KS) de la enzima Policétido Sintasa (Figura 4.2.2). La mezcla de reacción consistió en un volumen final de 15 µl conteniendo: dNTPs (deoxinucleósido trifosfato) en una concentración de 0,2 mM, 0,15 ng de cada cebador (Tabla 4.2.1), 1 U de ADN polimerasa (0,15 µl) (Taq, Highway), 2,5 mM de cloruro de magnesio y 20 ng/µl de ADN genómico.

Denominación	Secuencia	Referencia
LC1F	5'- GAYCCIMGITYTTTYAAYATG -3'	Bingle <i>et al.</i> (1999)
LC2R	5'- GTICCICTICCRTGCATYTC -3'	Bingle <i>et al.</i> (1999)

Tabla 4.2.1. Secuencia de los cebadores utilizados.

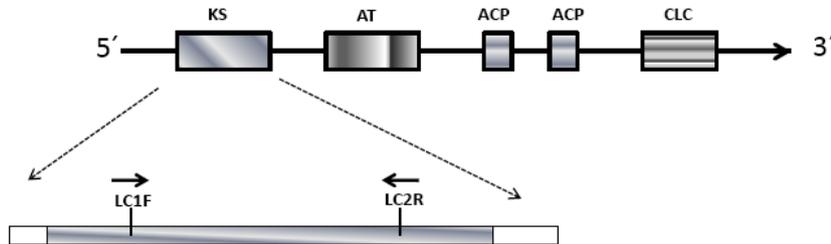


Figura 4.2.2. Posición relativa de los cebadores utilizados en la secuencia nucleotídica que codifica el dominio KS de la PKS (Bingle *et al.* 1999).

El programa de amplificación consistió en: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 33 ciclos de amplificación a 94°C durante 1 min, un paso de hibridación a 57°C por 1 min, y una extensión final de la cadena de DNA durante 1 min a 72°C (temperatura óptima de elongación de la Taq polimerasa). Un control de reacción sin ADN en la mezcla de reacción fue incorporado.

El producto de la reacción fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) con bromuro de etidio (0,2 µg/µl) a 90 V y visualizado mediante el uso de un trans-iluminador UV. Para determinar el tamaño molecular de las bandas se utilizó el marcador de peso molecular Lambda Hind III. Los geles se documentaron utilizando el analizador de imágenes Syngene y el software Genetools.

4.2.2.3. Secuenciación de fragmentos amplificados:

Los fragmentos amplificados fueron purificados de acuerdo al protocolo propuesto por Glenn (2001). En primer lugar se adicionaron 50 µl de una solución de polietilenglicol (PEG) al 20% y cloruro de sodio 4 M a la mezcla de reacción conteniendo el producto a secuenciar, y se incubó a 37°C por 15 min. Se centrifugó a 15.000 x g durante 15 min. Se descartó el sobrenadante, quedando un pellet de ADN

adherido a la pared del tubo. Se lavó adicionando 125 μ l de etanol 70%. Luego de eliminar el alcohol, el pellet se secó a 37°C por 10-15 min. Finalmente, el pellet se disolvió en 25 μ l de agua destilada estéril. Los productos de PCR fueron secuenciados en el laboratorio Macrogen Inc. Seúl, Korea. Las hebras de ADN de los fragmentos amplificados se secuenciaron en ambos sentidos utilizando los cebadores forward y reverse (Tabla 4.2.1), por medio de la reacción de secuenciación cíclica con el BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit. El método de secuenciación automática utilizado fue el desarrollado por Sanger (1977), el cual se basa en la síntesis de ADN en presencia de moléculas análogas a los dNTPs, denominadas didesoxinucleósidos (ddNTPs), que detienen la síntesis de las cadenas de ADN cuando son incorporadas a la cadena de ADN en crecimiento.

Con cada secuencia amplificada se realizó una búsqueda utilizando la herramienta de alineamientos locales de secuencias nucleotídicas (nucleotide basic local alignment tool, BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias fueron depositadas en GenBank con el número de acceso KC460221 y KR148941 (aislamiento S3b y T4, respectivamente).

4.2.2.4. Alineamientos múltiples y análisis filogenético:

La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia amplificada de nucleótidos que codifica el dominio KS de S3b y T4 de *P. griseola*, disponible en Gen Bank, se alineó con otras 35 secuencias de aminoácidos (de tipo reductor y no reductor) obtenidas desde la base de datos del Gen Bank y que corresponden a diferentes PKSs sintetizadas por diferentes hongos (Tabla 4.2.2). Como grupo externo (outgroup) se utilizaron las secuencias aminoacídicas de los genes homólogos *aveA4* y *aveA2* de *Streptomyces coelicolor* (Actinobacteria) ya que se asume que tiene una divergencia temprana en la evolución del gen *pks*, acorde a lo propuesto por Zhang *et al.*, 2013. El alineamiento se realizó mediante CLUSTAL W, versión 1.83 (Thompson *et*

al., 2000). El análisis se realizó utilizando el software Bioedit Sequence Alignment Editor (BioEdit versión 7.0.0). Las longitudes de las secuencias alineadas quedaron establecidas por la distancia entre los cebadores utilizados para la amplificación de dicha secuencia. El árbol filogenético de máxima parsimonia fue construido utilizando el programa MEGA (versión 5.01). Se utilizó la medida de bootstrap que corresponde al porcentaje de veces que aparece un grupo entre los árboles comparados, de manera de cuantificar el grado de apoyo de los clusters en los árboles.

Organismo	Gen	Nro de acceso gen bank	Región KS
<i>Aspergillus flavus</i>	"pksA"	AAS89999	375-803
<i>Aspergillus fumigatus</i>	"alb1"	AAC39471	378-806
<i>Aspergillus nidulans</i>	"wa"	CAA46695	379-807
<i>Aspergillus oryzae</i>	"pksL1"	BAC45240	375-803
<i>Aspergillus parasiticus</i>	"wa"	CAB44699	1-216
<i>Aspergillus parasiticus</i>	"pksL1"	AAC41675	375-803
<i>Aspergillus parasiticus</i>	"wa"	CAB44698	1-212
<i>Aspergillus terreus</i>	"lovB"	Q9Y8A5	1-449
<i>Ascochyta fabae</i>	"pks1"	ACS74441	1-207
<i>Ascochyta pinodes</i>	"pks1"	ACS74443	1-207
<i>Bipolaris maydis</i>	"pks18"	AAR90272	373-802
<i>Bipolaris oryzae</i>	"pks1"	BAD22832	373-802
<i>Byssosclamyces nivea</i>	"6msas"	AAK48943	35-457
<i>Cladosporium phlei</i>	nr	AFP89392	104-329
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	"pks1"	AEV59802	1-217
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	"pks1"	BAA18956	385-813
<i>Didymella rabiei</i>	"pks1"	ACS74449	213-642
<i>Exophiala dermatitidis</i>	"pks1"	AAD31436	369-798
<i>Fungal endophyte</i> sp. CR61	"pks1"	AAP68704	1-229
<i>Fungal endophyte</i> sp. CR475	"pks1"	AAP68701	1-229
<i>Fusarium fujikuroi</i>	"pks2"	CAD19100	30-451
<i>Fusarium fujikuroi</i>	"pks1"	CAC44633	7-435
<i>Humicolopsis cephalosporioides</i>	"pks1"	AGH27151	5-213
<i>Penicillium griseofulvum</i>	"wa"	CAB44712	1-216
<i>Penicillium griseofulvum</i>	"msas"	CAA39295	35-457
<i>Pertusaria hymenea</i>	nr	AAY00101	1-206
<i>Pertusaria lecanina</i>	nr	AAY00108	1-209
<i>Phoma</i> sp. C2932	"wa"	CAB44719	1-217
<i>Phoma</i> sp. C2932	"pks 1"	AAO62426	32-455
<i>Pseudocercospora fijiensis</i>	nr	EME80693	2-423
<i>Pseudocercospora griseola</i> (S3b)	"pks1"	AGI04994	1-207
<i>Pseudocercospora griseola</i> (T4)	"pks1"	ALF44675	1-235
<i>Ramularia collo-cygni</i>	"pks"	ADZ14597	1-213
<i>Streptomyces coelicolor</i>	"aveA4"	AGO88723	36-459
<i>Streptomyces coelicolor</i>	"aveA2"	AGO88719	2682-3106

Tabla 4.2.2. Genes *pks* de organismos utilizados en el análisis filogenético: denominación, número de acceso en Gen Bank y posición aminoacídica relativa del dominio KS. Nr; nombre del gen no reportado.

4.2.3. Análisis estadístico.

El diseño experimental fue enteramente al azar. Los tratamientos contaron con tres repeticiones. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de los datos correspondientes a la actividad enzimática oxidativa. La comparación de medias, cuando el ANOVA resultó significativo al 0,05, se realizó con el test de Tukey al nivel de 0,05 de significancia. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Statistica versión 7.1.

4.3 Resultados

4.3.1 Detección de actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de melaninas.

4.3.1.1 Actividad Policétido sintasa (PKS)

El análisis de la mezcla de reacción con malonyl-CoA y extractos enzimáticos de *P. griseola* (aislamiento T4) reveló por espectrometría de masas UV-MALDI la presencia del metabolito flaviolina (2,5,7-trihidroxi-1,4-naftoquinona) que no se encontró en las mezclas control. La Figura 4.3.1.b y c muestra el espectro de masas de la mezcla de reacción con 50 y 100 μ l del extracto enzimático, donde las flechas marcan la señal detectada a $m/z=205,12$ compatible con la flaviolina. Esta señal estuvo ausente en el control (Figura 4.3.1.d) y en la matriz (Figura 4.3.1.a). La baja intensidad de la señal no permitió la realización de espectros MS/MS en este caso. Asimismo el extracto enzimático analizado reveló una concentración de proteínas de $235 \pm 13 \mu\text{g/ml}$.

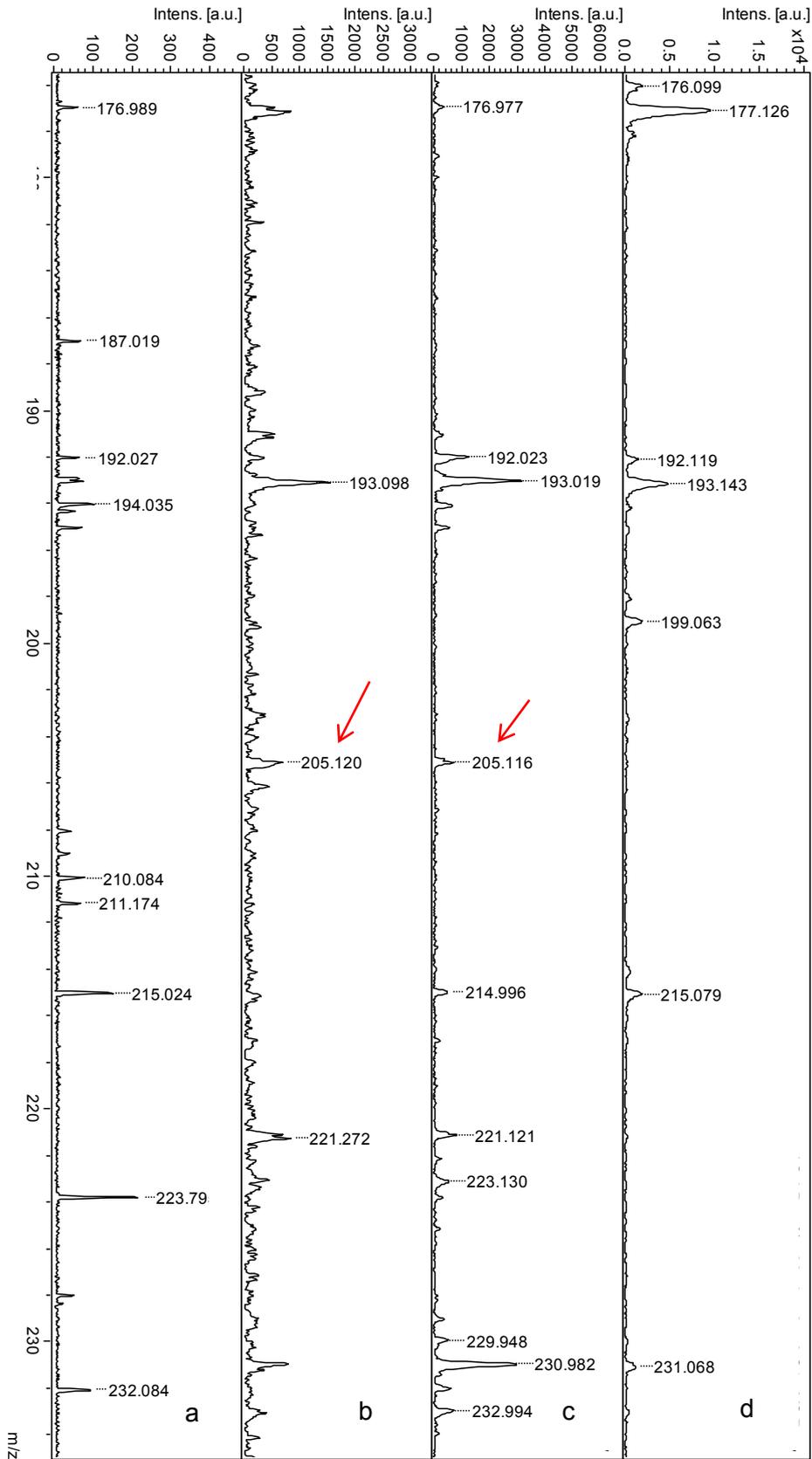


Figura 4.3.1. UV-MALDI MS (matriz AG). a) matriz; b) mezcla de reacción conteniendo 50 µl extracto enzimático, c) mezcla de reacción conteniendo 100 µl extracto enzimático; d) mezcla de reacción control negativo.

4.3.1.2 Actividad oxidativa extracelular:

Mientras que no se detectó actividad oxidativa sobre ABTS dependiente de peróxido de hidrógeno (actividad peroxidasa), ambos aislamientos presentaron actividad lacasa extracelular cuando fueron cultivados en medio basal (MB). Aunque a los 7 días de cultivo S3b y T4 presentaron valores de actividad similares, a los 14 y 21 días de cultivo el aislamiento T4 mostró niveles más altos de actividad lacasa (Tabla 4.3.1). El suplemento de sulfato de cobre (II) no provocó un incremento en la actividad en ninguno de los aislamientos.

Aislamiento	Tratamiento	7 días	14 días	21 días
S3b	MB	1,00± 0,66 ^a	1,16± 0,88 ^a	0,85± 0,50 ^a
	MB+Cu (II)	1,21± 0,44 ^a	1,47± 0,06 ^a	0,27± 0,21 ^a
T4	MB	1,51± 1,00 ^a	10,42± 1,82 ^b	7,85± 3,92 ^b
	MB+Cu (II)	1,18± 0,54 ^a	9,58± 1,96 ^b	12,33± 2,18 ^b

Tabla 4.3.1. Actividad lacasa extracelular de *P. griseola f griseola* (S3b) y *P. griseola f mesoamericana* (T4). En medio basal (MB) y en la presencia de sulfato de cobre (II), a diferentes tiempos de incubación (7, 14 y 21 días). Medias ± desvíos estándar. Valores con letras distintas, implica que hay diferencias significativas entre ellos, para cada fecha (Test de Tukey; P<0,05).

4.3.2 Identificación de secuencias génicas que codifican el dominio KS de PKSs involucradas en la síntesis de pigmentos oscuros.

4.3.2.2. Amplificación de la secuencia nucleotídica que codifica el dominio KS:

Los cebadores degenerados LC1/LC2 amplificaron un fragmento de 731 y 724 pares de bases, en S3b y T4, respectivamente (Figura 4.3.2).



Figura 4.3.2. Fragmentos amplificados por PCR utilizando los cebadores LC1/LC2 sobre el ADN genómico de *P. griseola*. 1) Producto de amplificación de *P. griseola f. griseola* (S3b). 2) Producto de amplificación de *P. griseola f. mesoamericana* (T4). 3) Control de PCR sin ADN. 4) Marcador de peso molecular.

La secuencia de aminoácidos deducida de *P. griseola f. griseola* (S3b) y de *P. griseola f. mesoamericana* (T4) reveló un 97% de identidad sobre una cobertura de 99% con la secuencia deducida del gen *pks* de *Ramularia collo-cygni*, ambas especies pertenecen a la fam Mycosphaerellaceae, luego la secuencia deducida del gen *pks* de *Pertusaria hymenea* (97% de identidad y un 96% de cobertura), seguida de la secuencia deducida del gen de *P. lecanina* (96% de identidad y un 96% de cobertura), y de una proteína putativa de *Pseudocercospora fijiensis* (99% de identidad y un 99% de cobertura).

4.3.2.3 Alineamientos múltiples y análisis filogenético

La secuencia de aminoácidos deducidos del dominio KS de una PKS de *P. griseola f. griseola* (S3b) y de *P. griseola f. mesoamericana* (T4) y de otras PKSs del tipo reductoras y no reductoras de varios hongos se utilizaron para generar los alineamientos múltiples y el árbol filogenético (Figura 4.3.3 y Figura 4.3.4). *Streptomyces coelicolor* se asume que tiene una divergencia temprana en la evolución

del gen PKS y se usó como outgroup. Las secuencias de las enzimas que catalizan la síntesis de policétidos de tipo no reducidos como melaninas DHN, aflatoxinas y algunos pigmentos de esporas, se agruparon con un soporte de bootstrap de 58. Dentro de este grupo encontramos dos sub-grupos: 1) uno conformado por las secuencias que codifican enzimas que sintetizan melanina con un soporte de bootstrap de 90, incluyendo a aquellas correspondientes a ambos aislamientos de *P. griseola*, las cuales se agruparon asociadas a la de *Cladosporium cladosporioides* y el endófito fúngico CR61; y 2) otro grupo con las secuencias pertenecientes otras PKSs implicadas en la síntesis de otros pigmentos y aflatoxinas (soporte de bootstrap de 89). Por otro lado, las secuencias de las enzimas que sintetizan los policétidos de tipo reducidos, se agruparon con un soporte de bootstrap de 34. Las secuencias de aminoácidos de la PKS de *F. fujikuroi* y *A. terreus* (que catalizan la síntesis del policétido lovastatina) se agruparon con las secuencias correspondientes a las PKSs involucradas en la síntesis del metabolito 6-MSA en un clado débilmente soportado (bootstrap de 29). La secuencia de *Phoma* Sp. 2932 (que produce la t-toxina) y la de *Cladosporium phlei* (que sintetiza el policétido pleicromo) se agruparon con las anteriores (bootstrap de 34). Este árbol muestra las posibles relaciones entre los diferentes tipos de PKSs fúngicas.

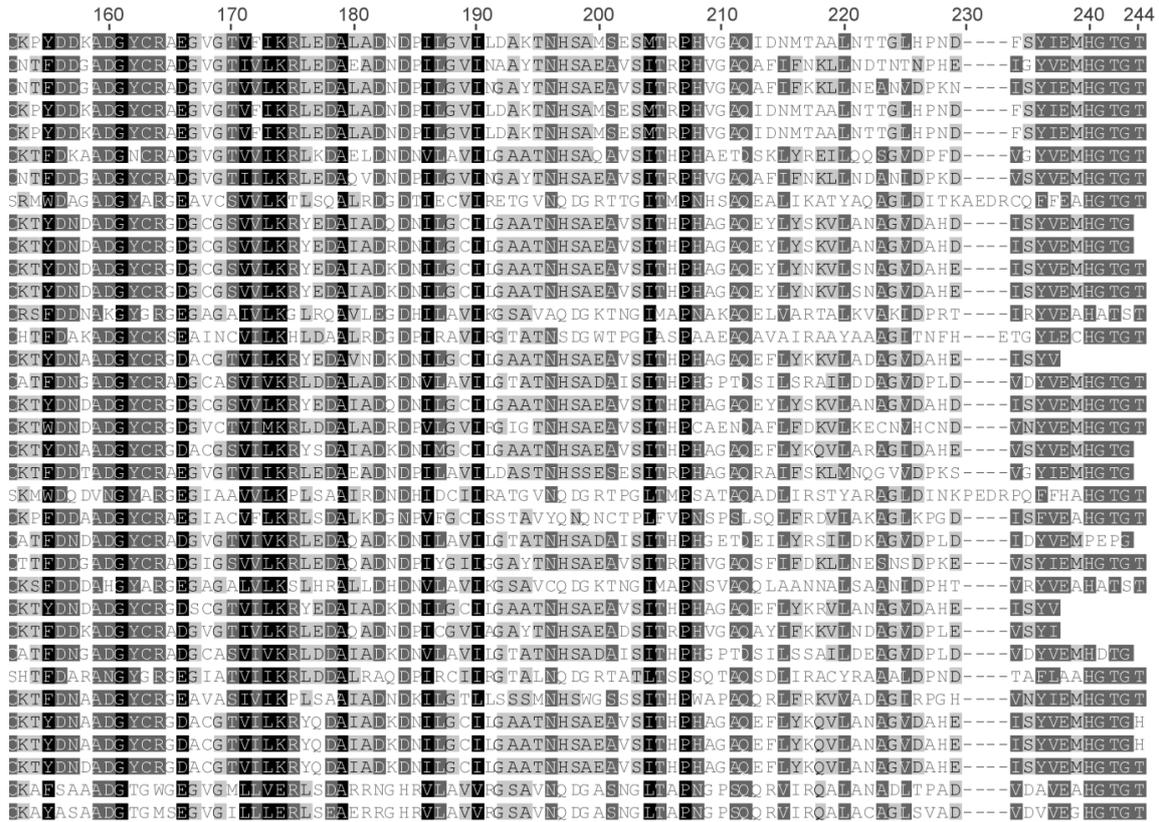


Figura 4.3.3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los organismos utilizados en el análisis filogenético.

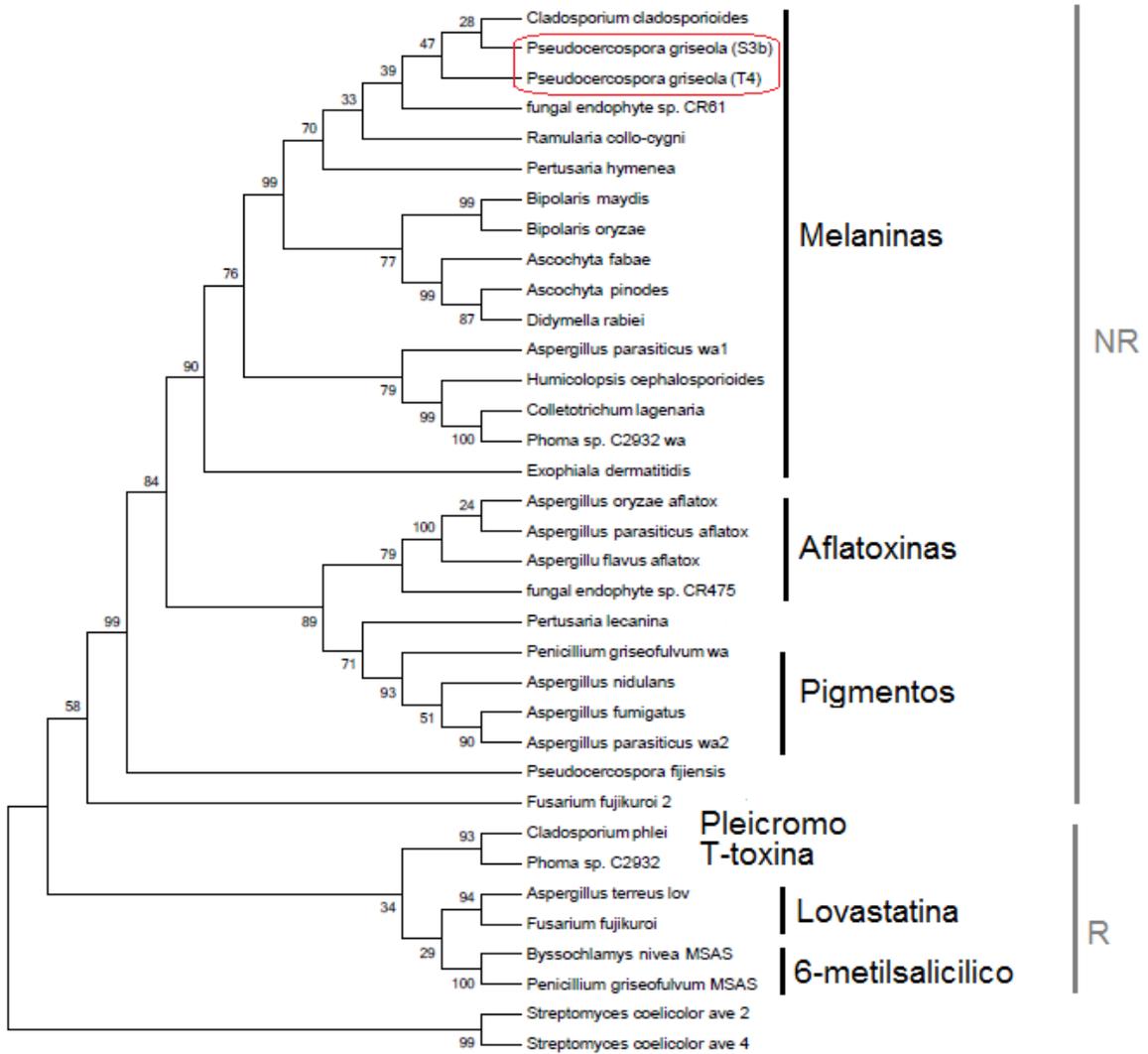


Figura 4.3.4. Relaciones filogenéticas de la secuencia aminoacídica deducida del dominio KS de las PKSs de *P. griseola f. griseola* (S3b) y *P. griseola f. mesoamericana* (T4) con otras PKSs fúngicas. Se señalan el tipo de metabolitos sintetizados por la enzima. NR, no reductoras. R, reductoras.

4.4 Discusión

En este capítulo se abordó el estudio de la actividad enzimática involucrada en dos etapas claves de la síntesis de melaninas DHN en dos aislamientos de *P. griseola* (S3b y T4).

Los estudios mostraron que *P. griseola* aislamiento T4 sintetiza enzimas con actividad PKS capaces de generar 1,3,6,8-THN, un metabolito intermediario en la síntesis de melanina DHN, que se oxida espontáneamente al producto estable flaviolina. Aunque en este trabajo la actividad de esta enzima utilizando malonil-CoA como sustrato se detectó a través de la identificación de flaviolina en las mezclas de reacción por espectrometría de masas UV-MALDI, Fujii *et al.* (2000) y Okamoto *et al.* (2001) que también utilizaron los mismos reactivos y condiciones de reacción, valoraron la actividad de esta enzima en *Colletotrichum lagenarium* a través de la identificación de flaviolina por medio de HPLC. Ghimire *et al.* (2008); Krauser *et al.* (2012), Zeng *et al.* (2012) identificaron también flaviolina en reacciones catalizadas por PKSs por medio de HPLC y con espectrometría de masas en las bacterias *Escherichia coli*, *Streptomyces peucetius* y *Streptomyces toxytricini*. Aunque no fue posible cuantificar la cantidad de producto de reacción enzimática PKS con el extracto de *P. griseola* aislamiento T4 y la metodología utilizada, este es el primer reporte de una actividad PKS en *P. griseola*.

Los dos aislamientos de *P. griseola* demostraron tener actividad oxidativa extracelular. La oxidación de ABTS por el sobrenadante del cultivo líquido tanto del aislamiento S3b como T4 de *P. griseola* fue independiente del suplemento de peróxido de hidrógeno a la mezcla de reacción. Esto sugiere que, al menos bajo las condiciones descritas, el sistema enzimático oxidativo extracelular de *P. griseola* está representado por lacasas y no por peroxidasas. Numerosos trabajos (Palmieri *et al.*, 2000; Galhaup & Haltrich, 2001; da Silva *et al.*, 2006; Kellner *et al.*, 2007) han demostrado que el sustrato ABTS es diagnóstico en la detección de actividad lacasa en hongos, incluidos

los pigmentados *Cryptococcus neoformans* (phylum Basidiomycota; Martinez *et al.*, 2007), *Aspergillus nidulans*, *Fusarium culmorum*, *Hortaea acidophila*, *Tetraploa aristata*, *Torula corallina* y *Trichoderma harzianum* (phylum Ascomycota; Saparrat *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Tetsch *et al.*, 2006; Griffith *et al.*, 2007). En este trabajo se demostró que los niveles de actividad lacasa extracelular fueron mayores en los cultivos del aislamiento T4, que es más pigmentado, a los 14 y 21 días de incubación en el medio PG comparado a los estimados en los cultivos del aislamiento S3b. Griffith *et al.* (2007) reportaron que al incrementar, el contenido de cobre aumentó la actividad lacasa y la pigmentación de *Aspergillus nidulans*. Por lo que serán necesarios futuros estudios de correlación para confirmar la relación entre la actividad lacasa y la pigmentación. Puesto que las lacasas son el grupo más representativo de las oxidasas multicobre, y que el efecto del cobre es considerado el más eficiente de los inductores en diferentes hongos (Palmieri *et al.*, 2000, Griffith *et al.*, 2007) se analizó el efecto del cobre sobre el nivel de actividad y se encontró que la actividad lacasa no fue inducida por el sulfato de cobre. Si bien se ha demostrado que el cobre es inductor de enzimas oxidativas en varios hongos, también se ha encontrado que el cobre no estimula la producción de lacasas en hongos como *Panus tigrinus* CBS 577.79 (phylum Basidiomycota) e incluso éste puede inhibir el crecimiento (Quarantino *et al.*, 2007), tal cual ocurrió en *P. griseola* (tanto en S3b y T4) cuando el cobre se agregó a los 7 o 10 días de crecimiento (datos no mostrados). No obstante, la respuesta de los hongos al cobre es variable, incluso a nivel intraespecífico, puesto que cultivos de otra cepa de *Panus tigrinus* 8/18, incrementaron los niveles de la actividad lacasa cuando se agregó cobre al medio (Chernykh *et al.*, 2005). El agregado de inhibidores de proteasas a las fracciones que se utilizaron como fuente de las enzimas no mostró diferencias en los niveles de actividad comparado a los líquidos correspondientes libre del coctel de inhibidores, por lo que es descartada la opción de que existan proteasas que disminuyan la actividad oxidativa detectada.

En los dos aislamientos de los dos grupos génicos de *P. griseola* se identificó una secuencia nucleotídica que codifica para el dominio KS de una PKS. Estas secuencias presentaron un número similar de pares de bases que las secuencias correspondientes al dominio KS de PKSs de otros hongos pertenecientes al phylum Ascomycota como *Alternaria alternata* (Tseng *et al.*, 2011), *Ascochyta rabiei* (Akamatsu *et al.*, 2010), *Cladosporium cladosporioides* LPSC 1088 (número de acceso JN205332, Llorente *et al.*, 2012), *Humicolopsis cephalosporioides* (número de acceso KC249998, Bárcena *et al.*, 2012), y *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* (Feng *et al.*, 2001), todas especies que producen melaninas del tipo DHN. Estos resultados sugieren que las PKSs fúngicas involucradas en la melanización tienen conservado el dominio KS, acorde a lo propuesto por Bingle *et al.* (1999). Asimismo, el análisis filogenético mostró que la secuencia aminoacídica deducida del dominio KS de la PKS de *P. griseola f. griseola* (S3b) y de *P. griseola f. mesoamericana* (T4) identificada resultó agrupada con otras secuencias correspondientes a PKSs del tipo no reductoras, que también han sido asociadas a la síntesis de melaninas DHN en otros hongos tal como ha sido encontrado también por Bingle *et al.* (1999).

En síntesis, este es el primer trabajo que presenta evidencias que demuestran que *P. griseola* sintetiza enzimas PKSs no reductoras que generan 1,3,6,8-THN, un metabolito intermediario en la síntesis de melanina DHN. Esto se confirmó también a través del agrupamiento de una secuencia del dominio KS de una PKS codificada en el genoma de *P. griseola f. griseola* y *P. griseola f. mesoamericana*, tal como observado en un cluster de PKSs que actúan en la síntesis de melanina DHN en otros hongos. *P. griseola* también presenta una actividad oxidativa extracelular de tipo lacasa.

CAPITULO V. *Pseudocercospora griseola* bajo diferentes condiciones de cultivo y su respuesta en el crecimiento, la pigmentación y la peroxidación lipídica.

5.1 Introducción

Los organismos se adaptan a los cambios en las condiciones ambientales, sean éstas estresantes o no, de tal manera que modifican sus procesos fisiológicos a fin de restablecer la homeóstasis (Segura *et al.*, 2015). En los hongos dematiáceos las melaninas suelen estar relacionadas con el crecimiento pero además estos pigmentos los protegen frente a diferentes factores ambientales como la radiación UV, situaciones de estrés hídrico, altas concentraciones de sales, altas temperaturas, agentes oxidantes y metales pesados (Bell & Wheeler, 1986; Butler *et al.*, 2009).

Gessler *et al.* (2014) demostraron que las melaninas cumplen un rol en la supervivencia de hongos cuando éstos están expuestos a factores ambientales adversos como los existentes en regiones de alta montaña, suelos de desiertos, y en las superficies de las plantas. Hughes *et al.* (2003) también encontraron que la exposición de un hongo aislado de un suelo antártico, *Phoma herbarum* (phylum Ascomycota), a la radiación UV-B incrementó la producción de melanina, posiblemente como estrategia de protección ante el daño causado por la radiación. Asimismo Fernandez & Koide (2013) sugirieron que la síntesis de melanina contribuye a la tolerancia al estrés hídrico y osmótico, ya que la inhibición de la síntesis de melanina redujo el crecimiento de *Cenococcum geophilum* (phylum Ascomycota) bajo estrés hídrico y/o osmótico. Rosas & Casadevall (1997) también han propuesto un rol termoprotector de la melanina en *Cryptococcus neoformans* (phylum Basidiomycota) ya que la resistencia al calor (45-47°C) y al frío (-20°C) estuvo relacionada con la presencia de melanina.

Muchos hongos patógenos, durante su interacción con el hospedante, están frecuentemente expuestos a agentes oxidantes tales como especies reactivas de oxígeno (ROS, del término en inglés reactive oxygen species; Beltrán-García *et al.*, 2009). Las células con melanina de *Sporothrix schenckii* (phylum Ascomycota) resultaron menos susceptibles a los agentes oxidantes (como peróxido de hidrógeno y óxido nítrico) y a la luz UV comparado a aquellas de los mutantes hialinos. También el fenotipo melanizado de este hongo mostró mayor resistencia a la fagocitosis y a la destrucción por parte de los monocitos y macrófagos que aquel correspondiente a los mutantes sin melanina. Todas estas observaciones sugieren que en *S. schenckii* la melanina tiene un rol de protección contra compuestos oxidantes antimicrobianos y macrófagos (Romero-Martinez *et al.*, 2000). En *Paracoccidioides brasiliensis* (phylum Ascomycota), un patógeno causante de la paracoccidioidomicosis, una enfermedad sistémica en humanos, las células con melaninas fueron más resistentes a los macrófagos y menos susceptibles a anfotericina B, fluconazole, itraconazole, sulfametoxazole y ketoconazole que las células sin melanina, sugiriendo un rol protector de la melanina en la interacción con el ambiente (da Silva *et al.*, 2006).

A pesar de existir datos sobre el control químico de la mancha angular del poroto (Stenglein *et al.*, 2003), es escasa la información disponible sobre la respuesta de *P. griseola* a diferentes tipos de moléculas con actividad inhibitoria como fungicidas y agentes que alteran el estado redox como el ácido ascórbico y el Fe^{+2} . El contenido variable de melanina en la pared celular y su espesor en *P. griseola* según el grupo génico de procedencia plantea el interrogante sobre sí fungicidas con diferentes mecanismos de acción (Azoxistrobina, la síntesis de ATP; Carbendazim, la división celular; Difenconazole, la síntesis de ergosterol; Triciclazole, la melanización DHN) también desencadena respuestas diferenciales, que incluso sean dependientes de la concentración. Aunque en presencia de luz el ión ferroso puede desencadenar estrés oxidativo en cultivos de hongos (Li *et al.*, 2006), el efecto del ascorbato es

contrastante, puesto que puede actuar como antioxidante o como prooxidante, lo cual es dependiente de la concentración (Prasad *et al.*, 1979), no conociéndose su efecto en aislamientos de *P. griseola* de los grupos Andino y Mesoamericano.

Objetivo: Estudiar el comportamiento de dos aislamientos de *Pseudocercospora griseola*, uno de cada grupo génico y que difieren en su contenido de melanina, cuando son expuestos a diferentes condiciones de cultivo.

Hipótesis: La melanina cumple un rol protector en *P. griseola* bajo situaciones de estrés. Los representantes de cada grupo génico se comportan de manera diferencial frente a los agentes que ocasionan estrés.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1. Cultivos de *Pseudocercospora griseola*.

Se utilizaron dos aislamientos, uno de cada grupo génico de la colección disponible, *P. griseola f. griseola* (aislamiento S3b) y *P. griseola f. mesoamericana* (aislamiento T4).

5.2.2. Tratamientos químicos en cultivos de *P. griseola*.

Fungicidas: A partir de formulaciones comerciales de cuatro grupos de fungicidas, con diferentes mecanismos de acción (Tabla 5.2.1) se prepararon soluciones acuosas de 250 mg/L de Azoxistrobina (Amistar 25%, Syngenta Agro S.A., Argentina) y Difenconazole (Bogard 25 %, Syngenta Agro S.A., Argentina), de 500 mg/L de Carbendazim (Honguil 50%, Grhesa, Argentina), y de 10.000 mg/L de Triciclazole (Pestanal ®, Sigma-Aldrich). Alícuotas de estas formulaciones se adicionaron a un medio basal (APG) para obtener concentraciones finales en la placa de cultivo en un rango de $2,5 \times 10^{-4}$ - $7,5 \times 10^{-3}$ mg/L de Azoxistrobina, 5×10^{-3} - 5×10^{-2} mg/L de Carbendazim, 5×10^{-3} - $1,5 \times 10^{-2}$ mg/L de Difenconazole y 1-100 mg/L de Triciclazole.

CAPITULO V

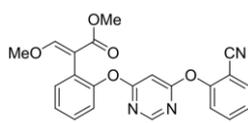
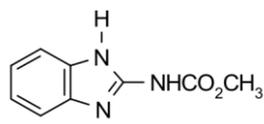
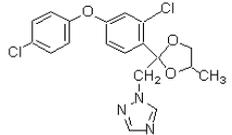
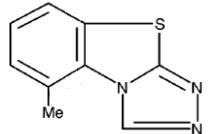
Fungicida	Principio activo (grupo químico)	Modo de acción	Fitopatógeno-Hospedante
Azoxistrobina (Amistar 25%)	Estrobilurina; metil (E)-2-{2-[6-(2-cianofenoxi)pirimidin-4-iloxi]fenil}-3-metoxiacrilato. 	Fuerte inhibidor de la germinación de esporas, impide el crecimiento micelial. Actividad antiesporulante. Actúa sobre la cadena de transferencia de electrones entre los citocromos b y c1 bloqueando la síntesis de ATP.	<i>Mycosphaerella fijiensi</i> - <i>Musa paradisiaca</i> , <i>Colletotrichum acutatum</i> - <i>Citrus micrantha</i> x <i>Citrus medica</i> , <i>Pseudoperonospora cubensis</i> y <i>Erysiphe cichoracearum</i> - <i>Cucumis sativus</i> , <i>Magnaporthe oryzae</i> - <i>Oryza sativa</i> (Gutierrez et al., 2003, Kunova et al., 2012). <i>Drechslera teres</i> - <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Alternaria solani</i> - <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Tanatephorus cucumeris</i> , <i>P.griseola</i> y <i>Uromyces appendiculatus</i> - <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Cercospora kikuchii</i> y <i>Cercospora sojina</i> - <i>Glycine max.</i> (www.syngenta.com.ar)
Carbendazim (Honguil 50%)	Benzimidazol; metil 1H-benzimidazol-2-ilcarbamato. 	Interactúa con la tubulina en los hongos sensibles, afectando el proceso de la mitosis y deteniendo el crecimiento micelial y la división celular.	<i>Pyricularia oryzae</i> y <i>Cercospora oryzae</i> - <i>Oryza sativa</i> , <i>Botrytis cinerea</i> - <i>Rosa.sp</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> - <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Mycosphaerella musicola</i> - <i>Musa paradisiaca</i> , <i>Colletotrichum coffeanum</i> y <i>Cercospora coffeicola</i> - <i>Coffea arabica</i> . (ficha de seguridad)
Difenoconazole (Bogard 25%)	Triazol; 1-[2-(4-(4-clorofenoxi)-2-clorofenil)-4-metil-1,3-dioxolan-2-yl-metil]-1H-1,2,4-triazol. 	Inhibidor de la biosíntesis del ergosterol. Actúa en el desarrollo de las hifas secundarias dentro del hospedante, también sobre la diferenciación y la virulencia de conidios.	<i>Elsinoe australis</i> - <i>Citrus.sp</i> , <i>Venturia inaequalis</i> - <i>Malus domestica</i> , <i>Cercospora arachidicola</i> - <i>Arachis hypogaea</i> , <i>Alternaria solani</i> - <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Cercospora kikuchii</i> y <i>Cercospora sojina</i> - <i>Glycine max.</i> (www.syngenta.com.ar)
Triciclazole (Pestanal 100%)	Triazol; 5-metil-1,2,4-triazol (3,4) benzotiazole. 	Inhibe la síntesis de melanina-DHN, por interacción física con las reductasas tri- y tetrahidroinaftaleno. Tiene un efecto directo sobre la germinación de los conidios.	<i>Bipolaris sorokiniana</i> - <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Colletotrichum lagenarium</i> - <i>Cucumis sativus</i> , <i>C. lindemuthianum</i> - <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Magnaporthe oryzae</i> - <i>Oryza sativa</i> (Kumar et al., 2015, Mares et al., 2004, Kunova et al., 2012).

Tabla 5.2.1. Características de los fungicidas utilizados.

Agentes rédox: se analizó el efecto de agentes químicos que generan alteraciones en el estado rédox adicionando ácido ascórbico (0,1-1 mg/ml) al medio de cultivo así

como el agregado de hierro (como $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,002-0,004 mg/ml). En todos los casos descritos el tratamiento control consistió en medio APG.

5.2.3. Inoculación y condiciones de cultivo de los hongos.

En todos los experimentos el inoculo consistió en una suspensión acuosa de conidios, obtenida de cultivos desarrollados en medio APG. La concentración de esporas se estimó con la cámara de Neubauer. La suspensión de conidios se sembró, distribuyéndola homogéneamente en toda la superficie de la placa de Petri. Las placas fueron incubadas durante 21 días a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y en oscuridad, excepto en el ensayo sobre el efecto del sulfato ferroso donde las placas fueron incubadas tanto en oscuridad como bajo condiciones de fotoperíodo de 8 h de luz $70 \mu\text{M}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, y 16 h oscuridad a 24°C . La concentración final de cada compuesto en el medio fue determinada en experimentos preliminares. Cada uno fue evaluado en ensayos independientes.

5.2.4 Estimación del crecimiento micelar.

El crecimiento se cuantificó como se describió en Materiales y Métodos del Capítulo II. La eficiencia de inhibición de cada fungicida evaluado y del ácido ascórbico se determinó calculando la tasa de inhibición del crecimiento de las colonias en relación al control (APG sin agente inhibidor), utilizando la fórmula:

$(A-B/A) \cdot 100$, donde A es el valor del diámetro promedio del control y B es el valor del diámetro de cada uno de los tratamientos ensayados (Koné *et al.*, 2009).

Además, se determinó para cada fungicida el valor de la Ci_{50} (concentración que inhibe el 50% del crecimiento) siguiendo la metodología de Llorente *et al.* (2012), el cálculo se realizó a partir de la regresión lineal entre el porcentaje de inhibición con la concentración del compuesto.

5.2.5 Análisis de la pigmentación de las colonias.

La pigmentación de las colonias se determinó midiendo los niveles de oscuridad como se describió en Materiales y Métodos del Capítulo II. Además, se determinaron los componentes del color de las colonias suplementadas con 1, 10 y 100 mg/L de Triciclazole y así como también las correspondientes al control (colonias sobre APG) con un Colorímetro (Minolta, Modelo CR-300, Osaka, Japón). Los parámetros medidos fueron: L*, que es una medida de la luminosidad (0 corresponde a negro y 100 a blanco); a* que representa el color en el rango rojo-verde (valores positivos a negativos); b* que designa los valores en el rango amarillo-azul (positivos a negativos).

5.2.6 Peroxidación lipídica.

Se estimó el nivel de peroxidación lipídica en la biomasa de los cultivos crecidos bajo todos los tratamientos a través de la cuantificación del nivel de MDA por el método de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, Georgiou *et al.*, 2003). El micelio (1 g) de cada tratamiento se congeló y se trituró en mortero con nitrógeno líquido, siendo luego agregado 4 ml de EDTA (100 μ M). La mezcla resultante se centrifugó 25.000 x g por 30 min y a 0,5 ml del sobrenadante se le agregó 0,5 ml TBA (ácido tiobarbitúrico 0,67 % p/v en 5% p/v de ácido tricloroacético) y 0,5 ml BHT (butil hidroxitolueno, 2 % p/v en etanol). La mezcla se incubó posteriormente a 100°C por 30 min y luego de enfriado se centrifugó a 15.000 x g por 3 min. Se midió la absorbancia de las soluciones resultantes a 535 y 600 nm. La diferencia de absorbancia se convirtió a equivalentes de nanomoles de malondialdehído (MDA) usando el coeficiente de extinción $1,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Georgiou *et al.*, 2003). Paralelo al procesamiento de los micelios correspondientes a

cada tratamiento, se evaluó también un control sin micelio y uno con micelio de los cultivos crecidos sobre APG.

5.2.7 Análisis estadístico.

El diseño experimental fue enteramente al azar. Los 6 tratamientos analizados se llevaron a cabo en ensayos individuales e independientes, incluyendo un tratamiento control, con tres repeticiones. Las diferencias en el crecimiento, la pigmentación y la peroxidación lipídica entre los tratamientos fueron analizadas por medio del ANOVA. El contraste de medias se realizó con el test de Tukey al nivel de 0,05 de significancia. En el caso de no cumplirse los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, los datos fueron sometidos a un test no paramétrico (Kruskal-Wallis $P < 0,05$).

5.3 Resultados

5.3.1. Crecimiento, pigmentación y nivel de MDA bajo un rango de concentración de fungicidas.

El crecimiento de las colonias de S3b fue inhibido a partir de 1×10^{-3} mg/L de Azoxistrobina. Con esta concentración de fungicida las colonias tuvieron un diámetro 23% menor que el control. Este fungicida afectó de una manera distinta al aislamiento T4, cuyas colonias redujeron su diámetro a partir de $2,5 \times 10^{-3}$ mg/L en un 73% respecto a lo observado en los cultivos control (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). Este fungicida a concentraciones de $7,5 \times 10^{-3}$ mg/L inhibió totalmente el crecimiento de T4 y un 65 % aquel del aislamiento S3b (Figura 5.3.1.A). Este comportamiento diferencial del crecimiento de los dos aislamientos a la Azoxistrobina está reflejado en el valor de Ci_{50} de 4×10^{-3} y 2×10^{-3} mg/L, en S3b y T4 respectivamente (Tabla 5.3.1).

Mientras que el Carbendazim a una concentración de 5×10^{-2} mg/L inhibió el crecimiento de T4 en un 27% respecto del control, concentraciones menores de este fungicida redujeron el crecimiento de S3b en un porcentaje mayor (34-37%; Figura 5.3.1.B). Para este fungicida, el valor de Ci_{50} fue de 0,07 mg/L para S3b y de 0,10 mg/L para T4 (Tabla 5.3.1).

El Difenoconazole, que provocó una disminución en el diámetro de las colonias del aislamiento T4 a concentraciones de $1,5 \times 10^{-2}$ mg/L (36,5 % menor que el control; Kruskal-Wallis, $P < 0,05$), causó una Ci_{50} para T4 de 2×10^{-2} mg/L (Tabla 5.3.1). En cambio, el crecimiento de S3b no fue afectado por ninguna de las concentraciones evaluadas de este fungicida (Kruskal-Wallis $P < 0,05$, Figura 5.3.1.C).

El Triciclazole a una concentración de 100 mg/L inhibió en un 67% y un 26% el crecimiento de S3b y T4, respectivamente (Figura 5.3.1D), siendo el valor de Ci_{50} en S3b de 75,75 mg/L y en T4 de 175 mg/L (Tabla 5.3.1). No obstante, el Triciclazole a 1 mg/L incrementó el crecimiento de T4.

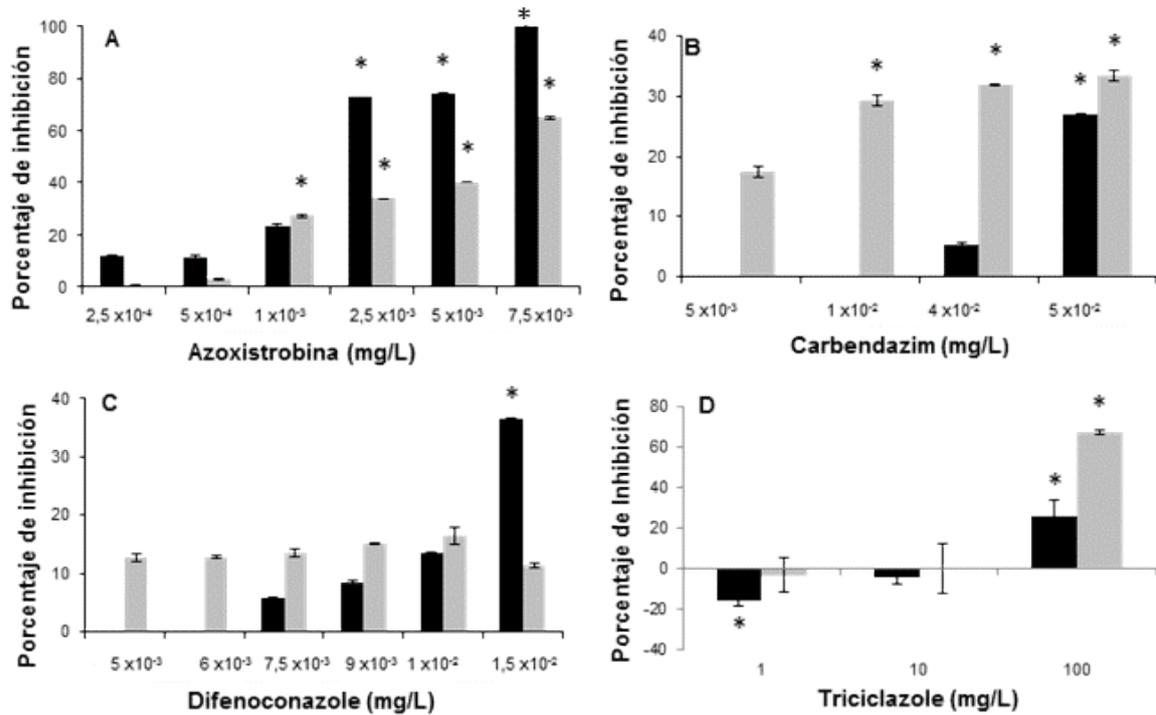


Figura 5.3.1. Crecimiento de *P. griseola* en presencia de distintas concentraciones de fungicidas: a) Azoxistrobina, b) Carbendazim, c) Difenoconazole y d) Triciclazole. Las barras negras corresponden a *P. griseola f mesoamericana* (T4) y las barras grises representan al aislamiento *P. griseola f griseola* (S3b). El asterisco indica para cada aislamiento diferencias significativas del tratamiento respecto al control.

Fungicida	Aislamiento	Recta de regresión	Ci ₅₀ (mg/L)	R ²
Azoxistrobina	S3b	y = 6552x + 23,345	0,004	0,73
	T4	y = 10622x + 26,914	0,002	0,81
Carbendazim	S3b	y = 501,470x + 14,152	0,071	0,38
	T4	y = 438,560x + 3,779	0,105	0,38
Difenoconazole	S3b	ND	ND	ND
	T4	y = 1922x + 7,4864	0,022	0,48
Triciclazole	S3b	y = 0,657x + 0,832	74,75	0,88
	T4	y = 0,317x - 5,726	175,90	0,71

Tabla 5.3.1. Concentraciones de fungicidas que inhiben el 50 % del crecimiento miceliar. ND=no determinado.

En el rango de concentraciones evaluadas, la Azoxistrobina y el Difenonazole no afectaron la pigmentación de las colonias de S3b y T4 que mostraron una apariencia similar al control (Figura 5.3.2.A-C).

El Carbendazim resultó en un incremento de la pigmentación de las colonias de S3b en solo una concentración, a la de 1×10^{-2} mg/L ($32,73 \pm 3,80$ versus $15,56 \pm 4,42$ del control; Test Kruskal-Wallis, $P < 0,05$), y no afecto la pigmentación de T4 (Figura 5.3.2.B).

El Triciclazole en concentraciones de 100 mg/L provocó una reducción en la pigmentación de las colonias ($62,60 \pm 3,02$ y $77,00 \pm 2,18$, en S3b y T4, respectivamente) respecto de las colonias control ($70,45 \pm 5,18$ y $79,45 \pm 2,81$, en S3b y T4, respectivamente; Figura 5.3.2.D). Asimismo el análisis de los componentes del color a través del sistema $L^* a^* b^*$ mostró que el componente a^* se incrementó cuando el nivel de Triciclazole en el medio aumentó (Figura 5.3.3).

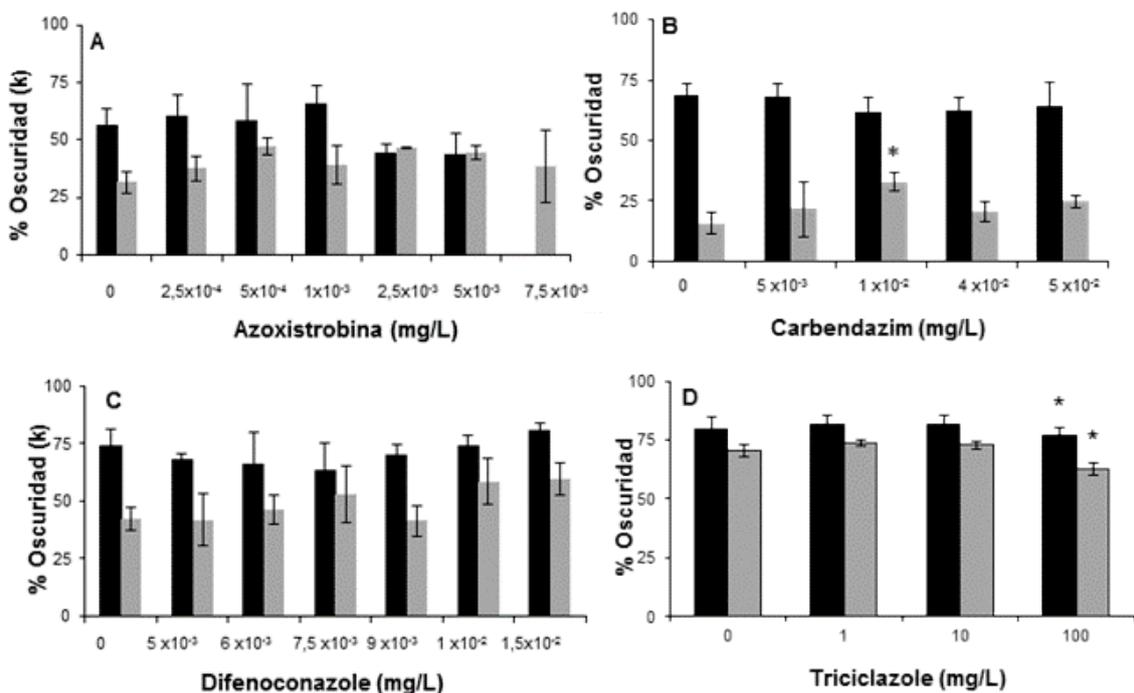


Figura 5.3.2. Pigmentación de colonias de *P. griseola* sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de fungicidas: a) Azoxistrobina, b) Carbendazim, c) Difenonazole y d) Triciclazole. Las barras negras corresponden a *P. griseola f mesoamericana* (T4) y las barras grises representan al aislamiento *P. griseola f griseola* (S3b). El asterisco indica para cada aislamiento diferencias significativas del tratamiento respecto al control.

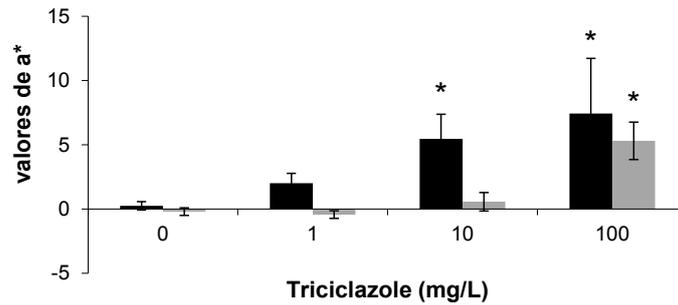


Figura 5.3.3. Componente “a” del color de las colonias de *P. griseola* sobre APG (medio basal) y en presencia de Triciclozole. Las barras negras corresponden a *P. griseola f. mesoamericana* (T4) y las barras grises representan al aislamiento *P. griseola f. griseola* (S3b). El asterisco indica para cada aislamiento diferencias significativas del tratamiento respecto al control.

Si bien la mayoría de los fungicidas ensayados inhibieron el crecimiento de los aislamientos T4 y S3b, solo se detectó peroxidación lipídica en los cultivos de T4 desarrollados en presencia de Difenconazole a 6×10^{-3} mg/L (Figura 5.3.4). Asimismo, en T4 el nivel de MDA fue mayor que aquel estimado en S3b tanto en todas las concentraciones de Difenconazole analizadas como en cultivos control.

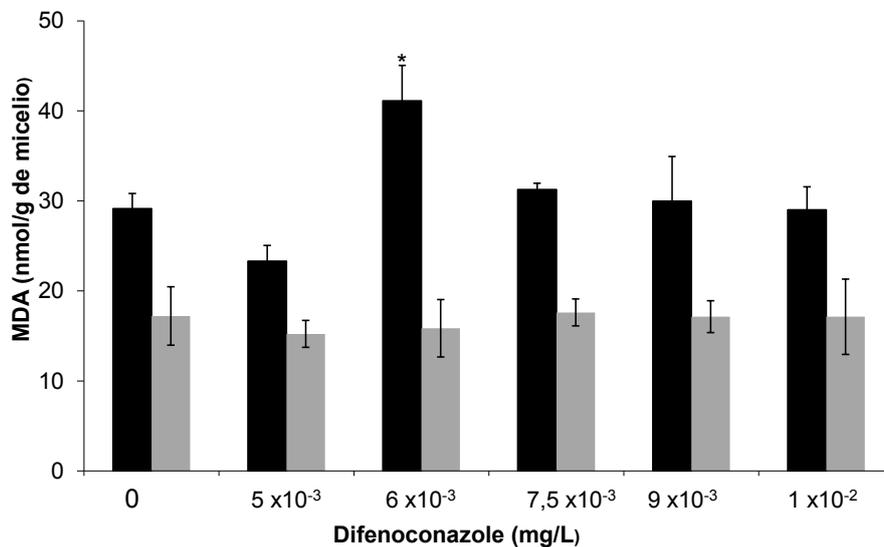


Figura 5.3.4. Peroxidación de lípidos en biomasa de *P. griseola* sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de Difenconazole. Las barras negras corresponden a *P. griseola f. mesoamericana* (T4) y las barras grises representan al aislamiento *P. griseola f. griseola* (S3b). El asterisco indica para cada aislamiento diferencias significativas del tratamiento respecto al control.

5.3.2. Crecimiento, pigmentación y nivel de MDA bajo un rango de concentración de agentes rédox.

Cuando el medio de cultivo fue suplementado con 1 mg/ml de ácido ascórbico se produjo una reducción del tamaño de las colonias de T4 (28 % respecto del control) y su pigmentación (con un nivel de K de $40,11 \pm 13,44$ en relación a $61,28 \pm 4,28$ en el control). No obstante el ácido ascórbico a 0,75 mg/ml solo afectó a la pigmentación de las colonias (con un nivel de K de $43,16 \pm 8,32$). En cambio, el crecimiento y la pigmentación de S3b no fueron afectados en ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 5.3.5-6).

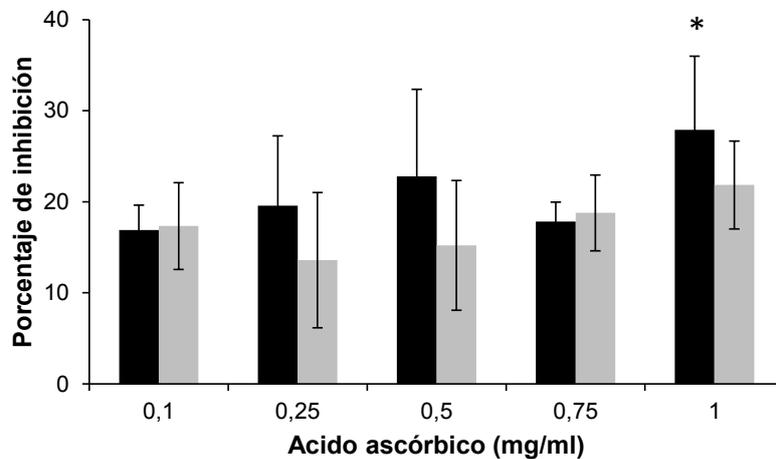


Figura 5.3.5. Porcentaje de inhibición de las colonias de *P. griseola* sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de ácido ascórbico. Las barras negras corresponden a *P. griseola f. mesoamericana* (T4) y las barras grises representan al aislamiento *P. griseola f. griseola* (S3b). El asterisco indica para cada aislamiento diferencias significativas del tratamiento respecto al control.

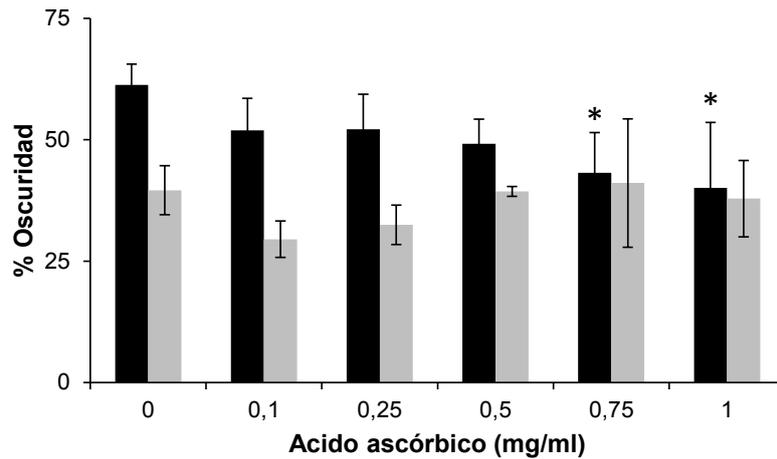


Figura 5.3.6. Pigmentación de colonias de *P. griseola* sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de ácido ascórbico. Las barras negras corresponden a *P. griseola f. mesoamericana* (T4) y las barras grises representan al aislamiento *P. griseola f. griseola* (S3b). El asterisco indica para cada aislamiento diferencias significativas del tratamiento respecto al control.

Aunque el rango de concentraciones de ácido ascórbico analizado no modificó el nivel de MDA en el aislamiento T4, el aislamiento S3b mostró una respuesta diferencial según la concentración de ácido ascórbico, ya que éste provocó un aumento de la concentración de MDA en una concentración de 1 mg/ml y una reducción con una concentración de 0,75 mg/ml. Excepto a 1 mg/ml de ácido ascórbico, el nivel de MDA fue mayor en T4 que en S3b (Figura 5.3.7).

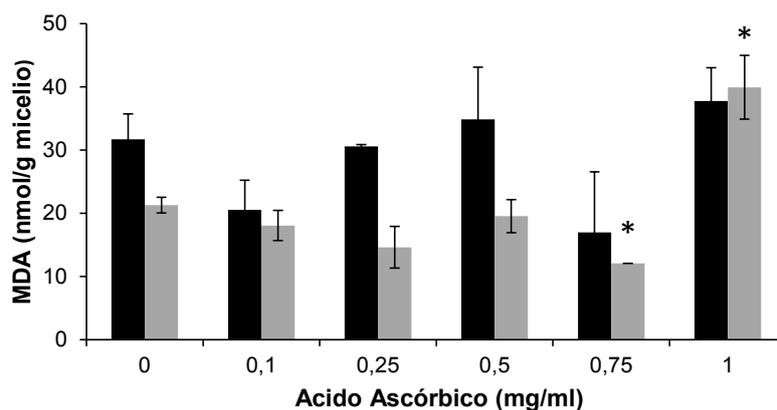


Figura 5.3.7. Peroxidación de lípidos en la biomasa de *P. griseola* sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de ácido ascórbico. Las barras negras corresponden a *P. griseola f. mesoamericana* (T4) y las barras grises representan al aislamiento *P. griseola f. griseola* (S3b). El asterisco indica para cada aislamiento diferencias significativas del tratamiento respecto al control.

Aunque el crecimiento del aislamiento S3b no fue alterado por el sulfato ferroso cuando se cultivó en oscuridad, esta sal tuvo un efecto activador en condiciones de luz. Las colonias que se desarrollaron en presencia de 0,002 mg/ml de sulfato ferroso y luz presentaron un mayor diámetro ($4,42 \pm 0,68$) con respecto al control ($2,82 \pm 0,10$ mm). El crecimiento de S3b en el medio basal se vio afectado por la luz ya que el diámetro de las colonias fue menor que el de aquellas que se desarrollaron en oscuridad ($2,82 \pm 0,10$ mm y $4,88 \pm 0,33$ mm, respectivamente; Figura 5.3.8.A, Test de Student's; $P < 0,05$). En el caso del aislamiento T4 el crecimiento no fue afectado por la adición de sulfato ferroso, ni en presencia ni en ausencia de luz (Figura 5.3.8.B).

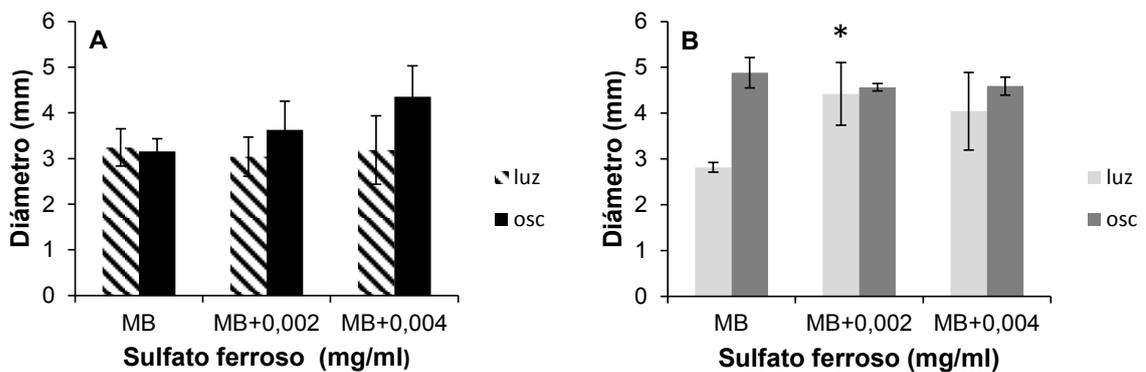


Figura 5.3.8. Diámetros de colonias de *P. griseola f. mesoamericana*, T4 (A) y *P. griseola f. griseola*, S3b (B) sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de sulfato ferroso (mg/ml) y condición lumínica. El asterisco indica para cada condición lumínica diferencias significativas del tratamiento respecto al control.

Bajo condiciones de oscuridad, la pigmentación de las colonias de S3b se redujo cuando se suplementó el medio con 0,002 mg/ml de sulfato ferroso; sin embargo esto no se observó en presencia de luz. En T4 la pigmentación de las colonias no fue afectada por el sulfato ferroso tanto en presencia como en ausencia de luz (Figura 5.3.9).

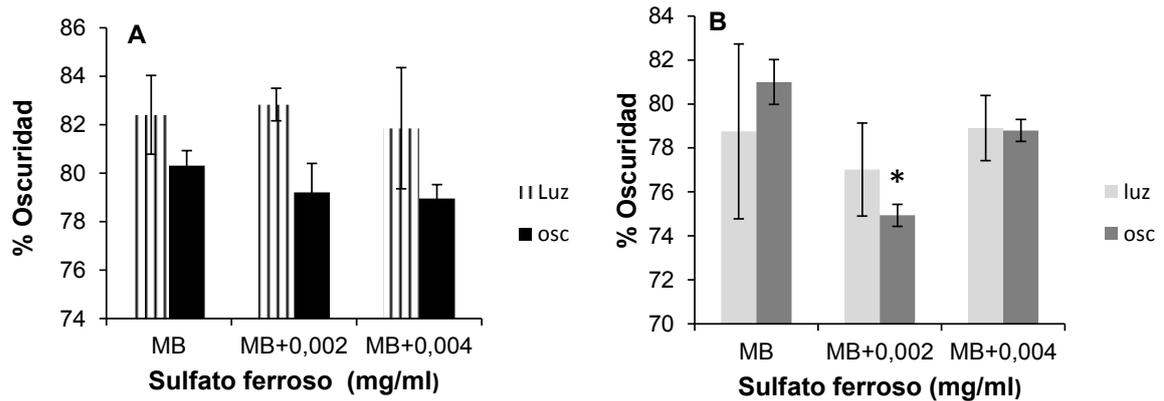


Figura 5.3.9. Pigmentación de colonias de *P. griseola f. mesoamericana*, T4 (A) y *P. griseola f. griseola*, S3b (B) sobre APG (medio basal, MB) y en presencia de distintas concentraciones de sulfato ferroso (mg/ml) y condición lumínica. El asterisco indica para cada condición lumínica diferencias significativas del tratamiento respecto al control.

El nivel de MDA en los cultivos de S3b y T4 desarrollados en presencia de sulfato ferroso a distintas concentraciones y dos condiciones lumínicas resultó variable según el tratamiento. Mientras que el nivel de MDA en los cultivos de S3b sobre APG tanto en presencia o ausencia de luz fue similar, la adición de sulfato ferroso a 0,002 y 0,004 mg/ml al medio redujo el nivel de MDA tanto bajo condiciones de luz como de oscuridad (Figura 5.3.10.B). En contraste, el aislamiento T4 presentó diferencias en el nivel de MDA como resultado de la presencia o ausencia de luz, pero en oscuridad la adición de sulfato ferroso provocó una reducción en el nivel de peroxidación lipídica (Figura 5.3.10.A).

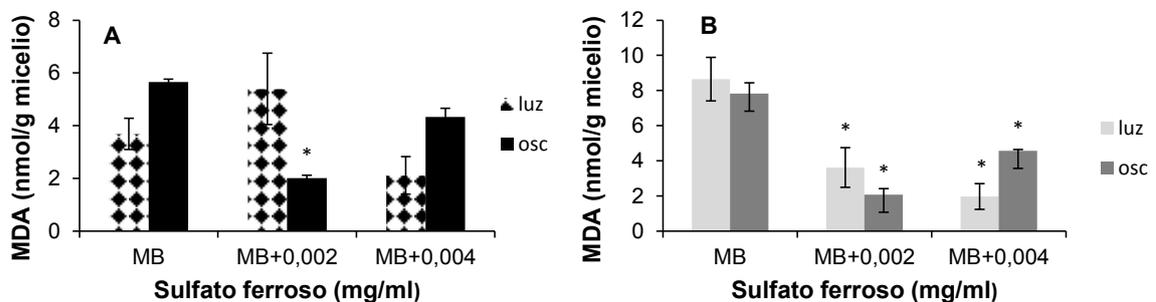


Figura 5.3.1. Peroxidación de lípidos en biomasa de *P. griseola* sobre APG (medio basal) y en presencia de distintas concentraciones de sulfato ferroso y condición lumínica. A) *P. griseola f. mesoamericana* (T4) y B) *P. griseola f. griseola* (S3b). El asterisco indica para cada condición lumínica diferencias significativas del tratamiento respecto al control.

5.4 Discusión

El comportamiento de los dos aislamientos de *P. griseola* S3b y T4, representantes de los dos grupos génicos, frente a la presencia de fungicidas con diferentes mecanismos de acción es distinta. Mientras que estos hongos presentaron valores de Ci_{50} similares con Carbendazim, fungicida del grupo de los benzimidazoles que inhibe la síntesis de la beta-tubulina (Zhu *et al.*, 2016), presentan marcadas diferencias en respuesta a los fungicidas del tipo de las estrobirulinas y triazoles como la Azoxistrobina, el Difenconazole y el Triciclazole lo que se observa en el valor de Ci_{50} . De acuerdo con un modo que refleja la persistencia de acción y comportamiento como fungicida multi-sitio, la Azoxistrobina, fungicida que inhibe la respiración mitocondrial (Koné *et al.*, 2009), fue más eficiente inhibiendo el crecimiento de *P. griseola* que el resto de los fungicidas probados. Además el aislamiento T4 fue más sensible que S3b. De la misma manera el aislamiento T4 fue más sensible que S3b al Difenconazole, un inhibidor de la síntesis de esteroides. Beltrán-García *et al.* (2014) encontraron que mientras ciertos aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis* fueron sensibles a Carbendazim y Azoxistrobina otros no lo fueron. Llorente *et al.* (2012) encontraron que el Difenconazole inhibió el crecimiento de *Cladosporium cladosporioides*, pero en concentraciones superiores a las utilizadas en *P. griseola*. El Triciclazole, que es un fungicida triazol, inhibió el crecimiento de los dos aislamientos de *P. griseola* a una concentración de 100 mg/L, lo que sugiere que este fungicida *in-vitro* es menos eficiente que los demás, ya que solo afectó a altas concentraciones a *P. griseola*. El aislamiento S3b fue más sensible que T4 al Triciclazole. Bárcena *et al.* (2015) encontraron en estudios previos que el Ci_{50} para el aislamiento T4 presentó un valor inferior; estas diferencias pueden ser el resultado de utilizar un rango de concentraciones del fungicida distinto. Asimismo, el Triciclazole en concentraciones de 1 mg/L en cultivo *in-vitro* provocó un incremento del tamaño de las colonias, es decir que aparentemente estimuló el crecimiento de T4. Esto es compatible con la inducción

de procesos de hormesis con la aplicación de dosis extremadamente bajas o subletales de fungicidas (Belz & Duke, 2014). Aunque es escasa la información sobre el efecto de dosis subinhibitorias de fungicidas sobre el metabolismo en hongos fitopatógenos, hay algunos antecedentes similares en aislamientos de *Pythium aphanidermatum* en cultivo bajo dosis subletales del fungicida mefenoxam (Garzón *et al.*, 2011; Flores & Garzon, 2013) y en *Penicillium expansum* en presencia de dosis subinhibitorias de tiabendazol, donde se observó un incremento en la germinación de esporas (Baraldi *et al.*, 2003). A diferencia de los otros fungicidas evaluados y debido a que este fungicida bloquea la síntesis de melanina DHN, es notorio también el efecto del Triciclazole sobre la pigmentación de las colonias de *P. griseola*. Es importante destacar que el aislamiento S3b fue más sensible al Triciclazole a nivel de la pigmentación y del crecimiento de las colonias que T4. En otros hongos fitopatógenos que también producen melaninas del tipo DHN, como *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe grisea*, *Sclerotinia minor* y *Thielaviopsis basicola*, también se observó una reducción en la pigmentación por la presencia de Triciclazole, al igual que en los patógenos de humanos *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tubingensis*, *Nannizzia cajetani* y *Trichophyton violaceum* (Mares *et al.*, 2004). Aunque la melanina puede cumplir un rol clave en la penetración del hongo en la planta, esta serie de ensayos en cultivo *in-vitro* no aportan información sobre la participación de estos pigmentos en la interacción hongo-planta. Futuros experimentos analizando el efecto del Triciclazole sobre la penetración de *P. griseola* en poroto se llevarán a cabo evaluando la severidad de la enfermedad después de la inoculación a nivel foliar de suspensiones de conidios de este hongo en presencia del fungicida o de micelio previamente inhibido por éste.

La peroxidación de lípidos es un proceso complejo que es desencadenado por la acción de radicales libres; esto compromete la integridad y funcionalidad de las membranas celulares (Ellil, 2005). Aunque la formación de MDA y su concentración

relativa es considerada una medida del grado de estrés oxidativo (Li *et al.*, 2006), los niveles basales de MDA en los hongos suelen ser distintos tal como se observó en los cultivos de T4 que presentaron niveles más altos de MDA que los cultivos de S3b. Avis *et al.* (2007) también encontraron diferencias en los niveles de MDA en *Fusarium sambucinum*, *Phytophthora infestans*, *Helminthosporium solani* y *Rhizoctonia solani* cuando éstos se cultivaron en medio sólido. No obstante, solo se observó estrés oxidativo en cultivos de T4 cuando se aplicó Difenconazole en una determinada concentración. Este fungicida pertenece a un grupo de inhibidores cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la demetilación (DMI, IDM) en el proceso de síntesis de los esteroides. Aunque efectos colaterales vinculados con el estrés oxidativo también se han reportado en la inhibición de *Ustilago maydis* y *Mucor mucedo* por otros fungicidas IDMs (Lyr, 1988), la actividad de estos fungicidas es dependiente de la concentración y varía en cada especie fúngica target. Estas diferencias fisiológicas se han asociado a la diversidad metabólica de los hongos para detoxificar las especies reactivas de oxígeno que se generan durante las peroxidaciones. No obstante, la no detección de estrés oxidativo en S3b y T4 aún en presencia de concentraciones elevadas de Difenconazole (a partir de $7,5 \cdot 10^{-3}$ mg/L) sugiere que otros mecanismos no oxidativos estarían involucrados en la inhibición del crecimiento de *P. griseola* bajo las condiciones probadas, que el Difenconazole en estas concentraciones ensayadas en este hongo no provoca estrés oxidativo, o que el MDA en *P. griseola* no es un buen indicador de estrés oxidativo.

En base a los resultados aquí reportados el crecimiento resultó ser el mejor parámetro para evaluar el estrés que los fungicidas provocaron en los cultivos *in-vitro* de *P. griseola*. Considerando que T4 presenta el mayor nivel de pigmentación y espesor de sus paredes celulares, se sugiere que la menor sensibilidad de S3b a la Azoxistrobina y al Difenconazole descarta la posibilidad que mecanismos de interacción entre componentes de pared (incluyendo melaninas) y los fungicidas

mencionados estén involucrados en su resistencia. No obstante, este comportamiento diferencial en S3b comparado a T4 puede estar asociado a otros mecanismos de resistencia probablemente vinculados a la reducción de la absorción del fungicida, a la alteración en el sitio de unión del fungicida, a la síntesis de enzimas que inactivan la acción del fungicida o que sustituyen el proceso target o lo estimulan, o incluso a otros mecanismos aún no reportados (Ma & Michailides, 2005). No obstante, los mecanismos de resistencia de los hongos a los antimicrobianos pueden variar de acuerdo al tipo de fungicida (Koné *et al.*, 2009). Esto es compatible con los mayores valores de CI_{50} obtenidos con los cultivos con Triciclazole y Carbendazim en el aislamiento T4, que es el que tiene más melanina y mayor espesor en su pared celular, comparado a S3b. Puesto que hay antecedentes en otros hongos pigmentados sobre la relación entre cantidad de melanina en pared y su susceptibilidad a fungicidas, esta respuesta diferencial entre ambos aislamientos de *P. griseola* en los cultivos con Triciclazole y Carbendazim sugiere que es importante realizar en el futuro experimentos para determinar cual es la interacción de la melanina y el resto de los componentes de la pared de *P. griseola* con estos fungicidas. van de Sande *et al.* (2007) reportó la interacción de diferentes azoles con la melanina de *Madurella mycetomatis* y su efecto en la resistencia a la inhibición de estos fungicidas.

El hierro es un micronutriente que juega un papel fundamental en la respiración celular, además es un elemento clave de los citocromos y de las proteínas implicadas en el transporte de electrones. La abundancia relativa del hierro en la naturaleza es variable y depende incluso del nivel de oxígeno del ambiente (Haas, 2003). Sales de este metal de transición en concentraciones superiores a 0,002 mg/ml generan estrés oxidativo en cultivos de hongos (Li *et al.*, 2006). Probablemente esto es una respuesta a la capacidad de los iones de hierro de donar y aceptar electrones, y por lo tanto a actuar como agentes reactivos que participan en reacciones en cadena que conducen a la formación de radicales libres y así causar efectos deletéreos en membranas

celulares, proteínas y ácidos nucleicos, incluso promovido por reacciones de autooxidación y fotoquímicas (Tapia & Araya, 2006; Dunn *et al.*, 2007). Aunque se analizó el efecto del sulfato ferroso sobre la peroxidación lipídica de cultivos sólidos de S3b y T4 bajo condiciones de luz y oscuridad, el nivel de MDA no reveló que la adición de diversas concentraciones de esta sal genere estrés oxidativo. Contrariamente, con sulfato ferroso se observó una disminución de la peroxidación lipídica bajo ciertas condiciones de cultivo. También el sulfato ferroso en una concentración de 0,002 mg/ml mostró un aumento en el crecimiento en S3b con luz. Almeida *et al.* (2015) mostraron que cultivos de *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycota) presentaron respuestas diferenciales en el crecimiento en presencia de un rango de 0,05 y 0,3 mg/ml de sulfato ferroso. La pigmentación de los cultivos de *P. griseola* fue distinta en presencia de hierro. Éste en una concentración de 0,002 mg/ml solo redujo el color de las colonias de S3b en condiciones de oscuridad. Acorde a la existencia de interacción entre los iones de hierro y los grupos funcionales de la pared celular de los hongos (Saparrat *et al.*, 2009; Bárcena *et al.*, 2015), se sugiere que las características de las paredes de ambos aislamientos, que son las que contienen los pigmentos y por lo tanto le dan la apariencia oscura al micelio de estos hongos, es en donde se establecen las diferencias observadas. En este sentido, aunque las concentraciones de sulfato ferroso utilizadas no inhibieron a *P. griseola*, las melaninas se conocen por tener un rol clave en la inmovilización de iones Fe^{+2} y en la protección frente a otros metales (Fogarty & Tobin, 1996).

Algunos autores han demostrado que el ascorbato puede tener tanto una acción inhibitoria de la muerte celular como también desencadenar la apoptosis (Prasad *et al.*, 1979), lo cual es dependiente de la concentración. Clement *et al.* (2001) demostraron que los efectos deletéreos del ascorbato en diferentes sistemas de cultivo se deben a la producción de peróxido de hidrógeno vía la interacción con iones hierro, un proceso también dependiente de la composición del medio utilizado. La conversión

entre ascorbato y dehidroascorbato involucra la transferencia de uno o dos electrones con el desarrollo de diferentes reacciones como hidroxilación (Clement *et al.*, 2001). Asimismo la autoxidación de ascorbato es promovida en presencia de metales de transición, tales como cobre además de hierro (Chepda *et al.*, 2001). Tanto el crecimiento como la pigmentación de T4 resultaron inhibidos por el ácido ascórbico, lo que fue dependiente de la concentración. No obstante, el aislamiento S3b, que no fue alterado en su crecimiento y pigmentación, presentó estrés oxidativo en la mayor concentración de ácido ascórbico. El ácido ascórbico ha sido utilizado como inhibidor de la síntesis de melanina, sin embargo en *Aspergillus carbonarius*, *Alternaria alternata*, *Paecilomyces variotii*, *Inonotus obliquus* y *Phellinus robustus* no afectó ni el crecimiento, ni la pigmentación ni la esporulación de los cultivos (Babitskaya & Shcherba, 2002). Aunque la síntesis de melanina fue completamente inhibida en cultivos de *Phaeococcomyces sp.* en un medio a bajo pH con 1mg/ml de ácido ascórbico, esta condición no alteró su crecimiento (Butler & Lachance, 1986).

Este comportamiento diferencial en las respuestas fisiológicas de hongos pertenecientes a grupos génicos intraespecíficos frente a un rango de concentración de agentes que pueden causar estrés sugiere la existencia en cada grupo de diversos mecanismos para enfrentar los efectos que los estreses ambientales provocan en los hongos. En este sentido, *P. griseola* en base a las respuestas estudiadas *in-vitro* evidentemente presenta mecanismos de respuesta al estrés distintos según el grupo génico de procedencia.

CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

Los grupos Andinos y Mesoamericanos de *Pseudocercospora griseola*, el agente causal de la mancha angular del poroto, difieren en el diámetro y en la pigmentación de sus colonias.

El pigmento de *P. griseola* es melanina y se localiza en la capa externa electrodensa de la pared celular, que además tiene diferente espesor en los representantes de los dos grupos génicos.

La melanina de *P. griseola* es del tipo DHN. Se caracteriza por presentar estructuras quinoides conjugadas y grupos fenólicos cuya disponibilidad es diferencial dependiente según el grupo génico de procedencia.

Las melaninas de los aislamientos de *P. griseola* pertenecientes a los grupos Andino y Mesoamericano cumplen un rol antioxidante y quelante de Fe^{+2} .

P. griseola tiene enzimas PKSs que están involucradas en la síntesis de melanina. Este hongo presenta también actividad oxidativa extracelular de tipo lacasa, enzima que en otros hongos pigmentados ha sido asociada a reacciones de polimerización.

Los aislamientos S3b y T4, correspondientes a los grupos Andino y Mesoamericano respectivamente, responden diferencialmente a las condiciones de cultivo, lo que sugiere que los grupos génicos posiblemente tengan mecanismos diferentes para responder a las situaciones ambientales, incluso bajo condiciones de estrés.

Esta tesis es el primer trabajo que localiza y establece las propiedades de la melanina de *P. griseola* así como también la participación de enzimas específicas en su síntesis.

En el futuro se estudiará la respuesta de estos hongos con diferente nivel de pigmentación a variaciones en la temperatura de incubación y la concentración de sales y agentes oxidantes en los cultivos. Se analizarán los mecanismos que

conducen a que los aislamientos de cada grupo génico respondan diferencialmente. Además se propone evaluar si las melaninas interfieren en estos procesos y si son clave en la resistencia frente a determinados fungicidas.

Por otro lado sería relevante completar los estudios sobre los otros dominios aún no identificados del gen *pks* de cada hongo estudiado y de otras enzimas involucradas en la síntesis de melanina en *P. griseola*. Esta información podría contribuir al desarrollo de nuevos fungicidas para controlar patógenos a través del bloqueo de la síntesis de melanina-DHN. Asimismo, este abordaje requerirá la generación de mutantes con diferencias en la capacidad de síntesis del pigmento.

BIBLIOGRAFÍA

- Akamatsu, H. O., Chilvers, M. I., Stewart, J. E., & Peever, T. L. (2010). Identification and function of a polyketide synthase gene responsible for 1,8-dihydroxynaphthalene-melanin pigment biosynthesis in *Ascochyta rabiei*. *Current genetics*, 56, 349-360.
- Aksu, Z., & Eren, A. (2007). Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 107-113.
- Almeida, S. M., Umeo, S. H., Marcante, R. C., Yokota, M. E., Valle, J. S., Dragunski, D. C., Colauto, N., & Linde, G. A. (2015). Iron bioaccumulation in mycelium of *Pleurotus ostreatus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 195-200.
- Alviano, C. S., Farbiarz, S. R., De Souza, W., Angluster, J., & Travassos, L. R. (1991). Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Journal of general microbiology*, 137, 837-844.
- Araya, C. (2003). Coevolución de Interacciones Hospedante – Patógeno en Frijol Común. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 221-228.
- Arrua, R. D., Basbus, J. F., Strumia, M. C., Alvarez, C. I., & Nazareno, M. A. (2012). Synthesis of macroporous polymers with radical scavenging properties by immobilization of polyphenolic compounds. *Reactive and functional polymers*, 72, 807-813.
- Avis, T. J., Michaud, M., & Tweddell, R. J. (2007). Role of lipid composition and lipid peroxidation in the sensitivity of fungal plant pathogens to aluminum chloride and sodium metabisulfite. *Applied and environmental microbiology*, 73, 2820-2824.
- Babitskaya, V. G., & Shcherba, V. V. (2002). The nature of melanin pigments of several micro- and macromycetes. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38, 247-251.
- Babitskaya, V. G., Shcherba, V. V., Filimonova, T. V., & Grigorchuk, E. Z. (2000). Melanin pigments of the fungi *Paecilomyces variotii* and *Aspergillus carbonarius*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36, 128-133.
- Balbi, B. P., Sanglard, D. A., Arruda, K. M., Costa, M. R., Piovesan, N. D., Barros, E. G. D., & Moreira, M. A. (2009). Characterization of *Pseudocercospora griseola* isolates collected in the state of Minas Gerais, Brazil. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 52, 56-57.
- Baraldi, E., Mari, M., Chierici, E., Pondrelli, M., Bertolini, P., & Pratella, G. C. (2003). Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathology*, 52, 362-370.
- Bárcena, A.; Medina, R.; Elíades, L. A.; Cabello, M. N.; Pancotto, V. A.; Arambarri, A. M.; Balatti, P. A. & Saparrat, M. C. N (2012). Pigmentación de un hongo celulolítico asociado al suelo forestal de *Nothofagus pumilio*. XIX Congreso Latinoamericano de la Ciencia del suelo. XXIII Congreso Argentino de la Ciencia del suelo. 641, 217. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

-
- Bárcena, A., Petroselli, G., Velasquez, S. M., Estévez, J. M., Erra-Balsells, R., Balatti, P. A., & Saparrat, M. C. (2015). Response of the fungus *Pseudocercospora griseola* f. *mesoamericana* to Tricyclazole. *Mycological Progress*, 14, 1-11.
- Bell, A. A., & Wheeler, M. H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanin. *Annual Review of Phytopathology*, 24, 411-451.
- Bellono, N. W., & Oancea, E. V. (2014). Ion transport in pigmentation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 563, 35-41.
- Belz, R. G., & Duke, S. O. (2014). Herbicides and plant hormesis. *Pest management science*, 70, 698-707.
- Beltrán-García, M. J, Prado, F. M., Oliveira, M. S., Ortiz-Mendoza, D., Scafó, A. C., Pessoa, A. J., Medeiros, M. H. G., White, J. F, Di Mascio, P. (2014). Singlet molecular oxygen generation by light-activated DHN-melanin of the fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in Black Sigatoka disease of bananas. *Plos One*, 9, e91616.
- Beltrán-García, M.J, Manzo-Sanchez, G., Guzmán-Gonzalez, S., Arias-Castro, C., Rodríguez-Mendiola, M., Avila-Miranda, M., & Ogura, T. (2009). Oxidative stress response of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease in banana plants, to hydrogen peroxide and paraquat. *Canadian Journal of Microbiology*, 894, 887-894.
- Bertazzo, A., Costa, C., Allegri, G., Seraglia, R., & Traldi, P. (1995). Laser desorption / ionisation mass spectrometry in the study of natural and synthetic melanins . III . Human hair melanins. *European Journal of Mass Spectrometry*, 1, 305-311.
- Bieto, J. A. & Talón, M. (2000). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana de España.
- Bingle, L. E., Simpson, T. J., & Lazarus, C. M. (1999). Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal genetics and biology*, 26, 209-223.
- Bornet, B., Branchard M. (2001). Nonanchored intersimple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant molecular biology reporter*. 19, 209-215.
- Bradford , M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248.
- Burdon, J. J., & Silk, J. (1997). Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic Fungi. *Phytopathology*, 87, 664-669.
- Butler, M J, & Lanchance, M. (1986). Quantitative binding of azure A to melanin black yeast *Phaeococcomyces*. *Experimental Mycology*, 10, 166-170.
- Butler, M.J., & Day, A. W. (1998). Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 1115-1136.

-
- Butler, M.J., Gardiner, R. B., & Day, A. W. (2005). Degradation of melanin or inhibition of its synthesis: are these a significant approach as a biological control of phytopathogenic fungi? *Biological Control*, 32, 326-336.
- Butler, M. J, Gardiner, R. B., & Day, A. W. (2009). Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, 101, 296-304.
- Caesar-Tonthat, T., Van Ommen, K. F., Geesey, G. G., & Henson, J. M. (1995). Melanin production by a filamentous soil fungus in response to copper and localization of copper sulfide by sulfide-silver staining. *Applied and environmental microbiology*, 61, 1968-1975.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66, 447-459.
- Cardona, C., Flor C. A., Morales, F. J., Pastor-Corrales, M. A. (1997). Problemas de campo en los cultivos de frijol en el trópico. (CIAT: Cali)
- Carreira, A., Ferreira, S. A. M., & Loureiro, V. (2001). Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Applied and environmental microbiology*, 67, 3463-3468.
- Carzaniga, R., Fiocco, D., Bowyer, P., & O Connell, R. (2002). Localization of melanin in conidia of *Alternaria alternata* using phage display antibodies. *The American Phytopathological Society*, 15, 216-224.
- Chefetz, B., Chen, Y., & Hadar, Y. (1998). Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and environmental microbiology*, 64, 3175-3179.
- Chen, J., Wang, C., & Shu, C. (2015). Isolation and characterization of a melanin from *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight. *European Journal of Plant Pathology*.
- Cheng, J. I. N., Moss, S. C., Eisner, M., & Zschack, P. (1994). X-Ray characterization of melanins. *Pigment Cell Research*, 7, 255-262.
- Chepda, T., Cadau, M., Girin, P. H., Frey, J., & Chamson, A. (2001). Monitoring of ascorbate at a constant rate in cell culture: effect on cell growth. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 37, 26-30.
- Chernykh, A. M., Leont, A. A., & Golovleva, L. A. (2005). New approaches to increasing the yield of laccase from *Panus tigrinus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 578-581.
- Clement, M. V., Ramalingam, J., Long, L., & Halliwell, B. (2001). The *in vitro* cytotoxicity of ascorbate depends on the culture medium used to perform the assay and involves hydrogen peroxide. *Antioxidant & Redox signaling*, 3, 167-163.
- Colpaert, J. V., Muller, L. A. H., Lambaerts, M., Adriaensen, K., & Vangronsveld, J. (2004). Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi. *New phytologist*, 162, 549-559.

-
- Cook, A. H. (1945). Algal pigments and their significance. *Biological Reviews*, 20, 115-132.
- Coon, S. L., Kotob, S., Jarvis, B. B., Wang, S., Fuqua, W. C., & Weiner, R. M. (1994). Homogentisic acid is the product of MelA, which mediates melanogenesis in the marine bacterium *Shewanella colwelliana*. *Applied and environmental microbiology*, 60, 3006-3010.
- Crisci, J.V. (2001). La biodiversidad como recurso vital de la humanidad. *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*. Tomo LV: 256-269.
- Crous, P. W., Liebenberg, M. M., Braun, U., & Groenewald, J. Z. (2006). Re-evaluating the taxonomic status of *Phaeoisariopsis griseola*, the causal agent of angular leaf spot of bean. *Studies in Mycology*, 55, 163-173.
- da Silva, Marcelo B, Marques, A. F., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Travassos, L. R., & Taborda, C. P. (2006). Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes and infection*, 8, 197-205.
- Ddamulira, G., Mukankusi, C., Edema, R., Sseruwagi, P., & Gepts, P. (2014). Distribution and variability of *Pseudocercospora griseola* in Uganda. *Journal of Agricultural Science*, 6, 16-29.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains. Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 173-289.
- Donner, C. D., Cuzzupe, A. N., Falzon, C. L., & Gill, M. (2012). Investigations towards the synthesis of xylindein, a blue-green pigment from the fungus *Chlorociboria aeruginosa*. *Tetrahedron*, 68, 2799-2805.
- Dunn, L. L., Rahmanto, Y. S., & Richardson, D. R. (2007). Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends in cell biology*, 17, 93-100.
- Duff, G. A., Roberts, J. E., & Foster, N. (1988). Analysis of the structure of synthetic and natural melanins by solid-phase NMR. *American Chemical Society*, 27, 7112-7116.
- Durán, N., Teixeira, M. F. S., Conti, R. D., & Esposito, E. (2002). Ecological-friendly pigments from fungi. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 53-66.
- Eaton, G. R., Barr, D., Weber, R. T., & Sandra, E. (2010). *Quantitative EPR*. Springer Science & Business Media. 1-192.
- Edens, W. A, Goins, T. Q., Dooley, D., & Henson, J. M. (1999). Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. *Applied and environmental microbiology*, 65, 3071-3074.
- Eisenman, H. C., & Casadevall, A. (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 931-940.

-
- Elíades, L. A., Cabello, M. N., Pancotto, V., Moretto, A., Rago, M. M., & Saparrat, M. C. N. (2015). Preliminary data on growth and enzymatic abilities of soil fungus *Humicolopsis cephalosporioides* at different incubation temperatures. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32, 40-45.
- Elleder, M., & Borovanský, J. (2001). Autofluorescence of melanins induced by ultraviolet radiation and near ultraviolet light. A histochemical and biochemical study. *The Histochemical journal*, 33, 273-81.
- Ellil, A. H. A. A. (2005). Melanin inhibitors and dicarboximide interconversion in some phytopathogenic fungi. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 33, 21-32.
- Ellis, D., & Griffiths, D. A. (1974). The location and analysis of melanins in the cell walls of some soil fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 20, 1379-1386.
- Enochs, W. S., Nilges, M. J., & Swartz, H. M. (1993). A standardized test for the identification and characterization of melanins using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Pigment Cell Research*, 6, 91-99.
- Farhan, H., Rammal, H., Hijazi, A., Hamad, H., Daher, A., Reda, M., & Badran, B. (2012). In vitro antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts from crude *Malva parviflora* L. grown in Lebanon. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*, 5, 2-6.
- Feng, B., Wang, X., Hauser, M., Kaufmann, S., Jentsch, S., Haase, G., Becker, J. M., & Szanislo, P. J. (2001). Molecular cloning and characterization of WdPKS1, a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Infection and immunity*, 69, 1781-1794.
- Fernandez, C. W., & Koide, R. T. (2013). The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecology*, 6, 479-486.
- Filippova, S. N., Kuznetsov, V. D., & Zaslavskaja, P. L. (1986). Melaninogenesis of *Streptomyces galbus* as reaction to high-temperature cultivation conditions. Localization of the pigment. *Mikrobiologiya*, 56, 710-712.
- Flores, F. J., & Garzon, C. D. (2013). Detection and assessment of chemical hormesis on the radial growth. *Dose-Response*, 11, 361-373.
- Fogarty, R. V., & Tobin, J. M. (1996). Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme and microbial technology*, 19, 311-317.
- Franzen, A. J., Cunha, M. M. L., Miranda, K., Hentschel, J., Plattner, H., da Silva, M. B., Salgado, C. G., de Souza, W., Rozental, S. (2008). Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *Journal of structural biology*, 162, 75-84.
- Frases, S., Salazar, A., Dadachova, E., & Casadevall, A. (2007). *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. *Applied and environmental microbiology*, 73, 615-621.

-
- Frederick, B. A., Caesar-Tonthat, T. C., Wheeler, M. H., Sheehan, K. B., Edens, W. A., & Henson, J. M. (1999). Isolation and characterisation of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* melanin mutants. *Mycological Research*, 103, 99-110.
- Fujii, I., Ono, Y., Tada, H., Gomi, K., Ebizuka, Y., & Sankawa, U. (1996). Cloning of the polyketide synthase gene atX from *Aspergillus terreus* and its identification as the 6-Methylsalicylic acid synthase gene by heterologous expression. *Molecular & general genetics*, 253, 1-10.
- Fujii, I., Mori, Y., Watanabe, A., Kubo, Y., Tsuji, G., & Ebizuka, Y. (2000). Enzymatic synthesis of 1,3, 6,8-tetrahydroxynaphthalene solely from malonyl coenzyme A by a fungal iterative type I polyketide synthase PKS I. *Biochemistry*, 39, 8853-8858.
- Gadd, G. M. (1982). Effects of media composition and light on colony differentiation and melanin synthesis in *Microdochium bolleyi*. *Transactions of the British Mycological Society*, 78, 115-122.
- Galhaup, C., & Haltrich, D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 225-232.
- Galvan, M. Z. (2006). Análisis de la variabilidad genética en poblaciones primitivas y silvestres de *Phaseolus vulgaris*, mediante marcadores bioquímicos y moleculares. Tesis, 1-202.
- Garzón, C. D., Molineros, J. E., Yáñez, J. M., Flores, F. J., del Mar Jiménez-Gasco, M., & Moorman, G. W. (2011). Sublethal doses of mefenoxam enhance *Pythium* damping-off of geranium. *Plant disease*, 95, 1233-1238.
- Georgiou, C. D., Zesrvoudakis, G., & Petropoulou, K. P. (2003). Ascorbic acid might play a role in the sclerotial differentiation of *Sclerotium rolfsii*. *Mycologia*, 95, 308-316.
- Gessler, N. N., Egorova, A. S., & Belozerskaya, T. A. (2014). Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50, 105-113.
- Ghimire, G. P., Oh, T.-jin, Liou, K., & Sohng, J. K. (2008). Identification of a cryptic type III polyketide synthase (1,3,6,8- tetrahydroxynaphthalene synthase) from *Streptomyces peucetius* ATCC 27952. *Molecules & Cells*, 26, 362-367.
- Glen, T. (2001). Savannah River Ecology Lab, Department of Biological Sciences, Drawer E University of South Carolina, Columbia, SC.
- Gomez, B. L., Nosanchuk, J. D., Diez, S., Youngchim, S., Aisen, P., Cano, L., Restrepo, A., Casadevall, A., Hamilton, A. J. (2001). Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* *in vitro* and during infection. *Infection and immunity*, 69, 5760-5767.
- Goncalves, R. C. R., Lisboa, H. C. F., & Pombeiro-Sponchiaso, S. R. (2012). Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1467-1474.

-
- Goncalves, R. D., & Pombeiro-Sponchiado, S. R. (2005). Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 28, 1129-1131.
- Griffith, G. W, Easton, G. L., Detheridge, A., Roderick, K., Edwards, A., Worgan, H. J., Nicholson, J., Perkins, W. T. (2007). Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS microbiology letters*, 276, 165-171.
- Guzmán, P., Gilbertson, R., Nodari, R., Johnson, W., Temple, S., Mandala, D., Mkandawire, A. B. ., & Gepts, P. (1995). Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Phytopathology*, 85, 600-607.
- Haas, H. (2003). Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 316-330.
- Hampson, M. C., Amarowicz, R., & Shahidi, F. (1996). The presence of melanin in *Synchytrium endobioticum*. *Mycologia*, 647-650.
- Hawksworth, D. L. (2004). Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in mycology*, 50, 9-18.
- Henson, J. M, Butler, M. J., & Day, A. W. (1999). The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*, 37, 447-471.
- Herrera, J., & Ascencio, L. (2015). Variabilidad patogénica de *Pseudocercospora griseola* causante de la mancha angular del frijol común en Honduras. *Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras*.
- Herrera, T., Ulloa, M., & Oronoz, M. R. (1998). *El reino de los hongos: micología básica y aplicada*. México, MX: Universidad Nacional Autónoma de México. 552 p. Edición ; 2a ed.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., *et al.* (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Reserch*, 111, 509-547.
- Hignett, & Kirkham. (1967). The role of extracellular melanoproteins of *Venturia inaequalis* in host susceptibility. *Journal of General Microbiology*, 48, 269-275.
- Howard, R. J., & Valent, B. (1996). Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual review of microbiology*, 50, 491-512.
- Huang, S., Pan, Y., Gan, D., Ouyang, X., Tang, S., Ekunwe, S. I. N., & Wang, H. (2010). Antioxidant activities and UV-protective properties of melanin from the berry of *Cinnamomum burmannii* and *Osmanthus fragrans*. *Medicinal Chemistry Research*, 20, 475-481.

-
- Hughes, K. A., Lawley, B., & Newsham, K. K. (2003). Solar UV-B radiation inhibits the growth of antarctic terrestrial fungi. *Applied and environmental microbiology*, 69, 1488-1491.
- Jacobson, E S, & Tinnell, S. B. (1993). Antioxidant function of fungal melanin. *Journal of bacteriology*, 175, 7102-7104.
- Jacobson, E S, Hove, E., & Emery, H. S. (1995). Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infection and immunity*, 63, 4944-4945.
- Jacobson, Eric S. (2000). Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical microbiology reviews*, 13, 708-717.
- Kayatz, P., Thumann, G., Luther, T. T., Jordan, J. F., Bartz-Schmidt, K. U., Esser, P. J., & Schraermeyer, U. (2001). Oxidation causes melanin fluorescence. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42, 241-246.
- Kellner, H., Luis, P., & Buscot, F. (2007). Diversity of laccase-like multicopper oxidase genes in Morchellaceae: identification of genes potentially involved in extracellular activities related to plant litter decay. *FEMS microbiology ecology*, 61, 153-163.
- Kerimo, J., Rajadhyaksha, M., & DiMarzio, C. A. (2011). Enhanced melanin fluorescence by stepwise three-photon excitation. *Photochemistry and photobiology*, 87, 1042-1049.
- Kheder, A. A., Akagi, Y., Akamatsu, H., Tsuge, T., & Kodama, M. (2012). Functional analysis of the melanin biosynthesis genes ALM1 and BRM2-1 in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. *Journal of general plant pathology*, 78, 30-38.
- Kogej, T., Gorbushina, A. A., & Gunde-cimerman, N. (2006). Hypersaline conditions induce changes in cell-wall melanization and colony structure in a halophilic and a xerophilic black yeast species of the genus *Trimmatostroma*. *Mycological Research*, 110, 713-724.
- Kogej, T., Wheeler, M. H., Lanisnik Rizner, T., & Gunde-Cimerman, N. (2004). Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. *FEMS microbiology letters*, 232, 203-9.
- Koné, D., Badou, O. J., Bomisso, E. L., Camara, B., & Ake, S. (2009). In vitro activity of different fungicides on the growth in *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* Stover and Dickson, *Cladosporium musae* Morelet and *Deightoniella torulosa* (Syd.) Ellis, isolated parasites of the banana phyllosphere in the Ivory Coast. *Comptes rendus biologies*, 332, 448-455.
- Krauser, S., Kiefer, P., & Heinzle, E. (2012). Multienzyme whole-cell In situ biocatalysis for the production of flaviolin in permeabilized cells of *Escherichia coli*. *Chemical catalysis catalytical chemistry*, 4, 786-788.
- Kroken, S., Glass, N. L., Taylor, J. W., Yoder, O. C., & Turgeon, B. G. (2003). Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 15670-15675.

-
- Kumar, C. G., Mongolla, P., Pombala, S., Kamle, A., & Joseph, J. (2011). Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from a novel strain of *Aspergillus bridgeri* ICTF-201. *Letters in applied microbiology*, 53, 350-358.
- Kumar, M., Chand, R., Dubey, R., & 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.
- Kuo, M. J., & Alexander, M. (1967). Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *Journal of Bacteriology*, 94, 624-629.
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., & Brakhage, A. A. (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 38, 143-158.
- Larsson, B., & Tjälve, H. (1979). Studies on the mechanism of drug-binding to melanin. *Biochemical pharmacology*, 28, 1181-1187.
- Latgé, J. P., Bouziane, H., & Diaquin, M. (1988). Ultrastructure and composition of the conidial wall of *Cladosporium cladosporioides*. *Canadian journal of microbiology*, 34, 1325-1329.
- Lazarovits, G & Stoessl, A. (1988). Tricyclazole induces melanin shunt products and inhibits altersolanol accumulation by *Alternaria solani*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 31, 36-45.
- Lee, J.-K., Jung, H.-M., & Kim, S.-Y. (2003). 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin Biosynthesis inhibitors increase erythritol production in *Torula corallina*, and DHN-melanin inhibits erythrose reductase. *Applied and environmental microbiology*, 69, 3427-3434.
- Li, X. L., Cui, X. H., & Han, J. R. (2006). Sclerotial biomass and carotenoid yield of *Penicillium* sp. PT95 under oxidative growth conditions and in the presence of antioxidant ascorbic acid. *Journal of applied microbiology*, 101, 725-731.
- Lyr, H. (1988). Lipid peroxidation: A side effect of sterol demethylation inhibitor fungicides in *Mucor mucedo* (L.) Fres and *Ustilago maydis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 32, 197-204.
- Llorente, C., Bárcena, A., Vera Bahima, J., Saparrat, M. C. N., Arambarri, A. M., Rozas, M. F., Mirífico, M. V., Balatti, P.A. (2012). *Cladosporium cladosporioides* LPSC 1088 produces the 1,8-dihydroxynaphthalene-melanin-like compound and carries a putative pks gene. *Mycopathologia*, 174, 397-408.
- Ma, Z., & Michailides, T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24, 853-863.
- Madigan, M. T. B., Martinko, T. D., Dunlap, J. M., Clark, P. V., & Madigan, D. P. M. T. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos*. Universidad de Sevilla. 12ª.ed.

-
- Madrid, I. M., Souza Mattei, A., Pereira Soares, M., Nobre, M. de O., & Meireles, M. C. A. (2011). Ultrastructural study of the mycelial phase of clinical isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from feline, canine and human cases of sporotrichosis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 55, 1147-1150.
- Mandal, P., Roy, T. S., Das, T. K., Banerjee, U., Xess, I., & Nosanchuk, J. D. (2007). Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from India: an electron microscopic study. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 662-666.
- Mapari, S. A. S., Nielsen, K. F., Larsen, T. O., Frisvad, J. C., Meyer, A. S., & Thrane, U. (2005). Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 231-238.
- Mares, D., Romagnoli, C., Andreotti, E., Manfrini, M., & Vicentini, C. V. (2004). Synthesis and antifungal action of new Tricyclazole analogues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2003-2009.
- Martinez, L. R., Ntiamoah, P., Gácsér, A., Casadevall, A., & Nosanchuk, J. D. (2007). Voriconazole inhibits melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51, 4396-4400.
- McLafferty FW, Turecek F (1993) Interpretation of Mass Spectra. University Science Books, Mill Valley
- Meredith, P., & Sarna, T. (2006). The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment cell research*, 19, 572-594.
- Meyer, J. M. (2000). Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of microbiology*, 174, 135-142.
- Mínguez Mosquera, M. I., Pérez Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2005). Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples "colorantes" naturales. *Agro Csi*, 2-7.
- Monda, E. O., Sanders, F. E., & Hick, A. (2001). Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*. *Plant Pathology*, 50, 103-110.
- Morris-jones, R., Youngchim, S., Gomez, B. L., Aisen, P., Hay, R. J., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Hamilton, A. J (2003). Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* *In Vitro* and during mammalian infection. *Infection and immunity*, 71, 4026-4023.
- Nakasone, K. K., Peterson, S. W., & Jong, S. C. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. *Biodiversity of fungi*, 37-47.
- Nonami, H., Fukui, S., & Erra-Balsells, R. (1997). β -Carboline alkaloids as matrices for matrix-assisted ultraviolet laser desorption time-of-flight mass spectrometry of proteins and sulfated oligosaccharides: a comparative study using phenylcarbonyl compounds, carbazoles and classical matrices. *Journal of mass spectrometry*, 32(3), 287-296.

-
- Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2003). Microreview the contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 5, 203-223.
- Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50, 3519-3528.
- Nuñez-Cardona, M. T. (2003). Aislamiento y caracterización pigmentaria de las bacterias rojas del azufre de la laguna de Tampamachoco, Veracruz. *Hidrobiológica*, 13, 171-176.
- Okamoto, S., Sakurada, M., Kubo, Y., Tsuji, G., Fujii, I., Ebizuka, Y., Ono, M., Ebizuka, Y., Ono, M., Nagasawa, H., Sakuda, S. (2001). Inhibitory effect of aflastatin A on melanin biosynthesis by *Colletotrichum lagenarium*. *Microbiology*, 147, 2623-2628.
- Oliveira, A. M. R., Matsumura, A. T. S., Prestes, A. M., & Van Der Sand, S. T. (2002). Intraspecific variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates determined by random-amplified polymorphic DNA (RAPD). *Genetics and Molecular Research*, 1, 350-358.
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems*, 4, 13.
- O'Hagan, D. (1995). Biosynthesis of fatty acid and polyketide metabolites. *Natural product reports*, 12, 1-32.
- Paccola-Meirelles, L. D., & Azevedo, J. (1991). Parasexuality in *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57, 172-176.
- Pal, A. K., Gajjar, D. U., & Vasavada, A. R. (2014). DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Medical Mycology*, 52, 10-18.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., & Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental microbiology*, 66, 920-924.
- Pierce, J. A., & Rast, D. (1995). A comparison of native and synthetic mushroom melanins by FTIR. *Phytochemistry*, 39, 49-55.
- Plonka, P. M., & Grabacka, M. (2006). Melanin synthesis in microorganisms- biotechnological and medical aspects. *Acta biochimica Polonica*, 53, 429-443.
- Prasad, K. N., Sinha, P. K., Ramanujam, M., & Sakamoto, A. (1979). Sodium ascorbate potentiates the growth inhibitory effect of certain agents on neuroblastoma cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 829-832.
- Quarantino, D., Federici, F., Petruccioli, M., Fenice, M., & D'Annibale, A. (2007). Production , purification and partial characterisation of a novel laccase from the white-rot fungus *Panus tigrinus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 57-69.

-
- Rapela, M. G. L., Colombini, M. A., González, A. M., Vaira, S. M., Maumary, R., Mattio, M. C., Carrera, E., Lurá, M.C. (2011). Phenotypic and genotypic variability in *Cercospora kikuchii* isolates from Santa Fe Province, Argentina. INTECH Open Access Publisher, 97-112.
- Rehnstrom, A. L., & Free, S. J. (1996). The isolation and characterization of melanin-deficient mutants of *Monilinia fructicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49, 321-330.
- Ricardi, M., Guaimas, F. F., González, R. M., Burrieza, H. P., López-Fernández, M. P., Jares-Erijman, E. A., Estévez, J. M., Iusem, N. D. Nuclear import and dimerization of tomato ASR1, a water stress-inducible protein exclusive to plants. 2012; *Plos One* 7, e41008.
- Riesz, J. (2007). The spectroscopic properties of melanin. Doctoral dissertation, University of Queensland.1-239.
- Romero-Martinez, R., Wheeler, M. H., Guerrero-Plata, A., Rico, G., & Torres-Guerrero, H. (2000). Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and immunity*, 68, 3696-3703.
- Rosas, A. L., & Casadevall A. (1997). Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS microbiology letters*, 315, 265-272.
- Rosas, A. L., Nosanchuk, J. D., Feldmesser, M., Cox, G. M., Mcdade, H. C., & Casadevall, A. (2000). Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. *Infection and immunity*, 68, 2845-2853.
- Roustae, A., Costes, S., Dechaml-Guillaume, G., & Barrault, G. (2000). Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (anamorph: *Phoma macdonaldii*), a fungal pathogen of sunflower. *Plant Pathology*, 49, 227-234.
- Rugolo, M., Cajas-Madriaga, D., Reinoso, R., Rajchenberg, M. & Becerra, J. (2015). Pigmentos carotenoides en *Cyttaria hariotii* Fisch. (Cytariales, Ascomycota). *Boletín Sociedad Argentina de Botánica*, 50, 235.
- San-blas, G., Guanipa, O., Moreno, B., Pekerar, S., & San-blas, F. (1996). *Cladosporium carrionii* and *Hormoconis resinae* (*C. resinae*): cell wall and melanin studies. *Current microbiology*, 32, 11-16.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-5467.
- Saparrat, M. C. N., Cabello, M. N., & Arambarri, M. (2002). Extracellular laccase activity in *Tetraploa aristata*. *Biotechnology Letters*, 24, 1375-1377.
- Saparrat, M. C. N., Femoselle, G. E., Stenglein, S. A, Aulicino, M. B., & Balatti, P. A. (2009). *Pseudocercospora griseola* causing angular leaf spot on *Phaseolus vulgaris* produces 1,8-dihydroxynaphthalene-melanin. *Mycopathologia*, 168, 41-47.

-
- Saparrat, M. C. N., Guillén, F., Arambarri, A. M., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (2002). Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot Basidiomycete *Corioloropsis rigida*. *Applied and environmental microbiology*, 68, 1534-1540.
- Saparrat, M. C. N., Bucszinsky, A. M.M., Tournier, H. A, Cabello, M. N., & Arambarri, A. M. (2000). Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. *Revista iberoamericana de micología*, 17, 64-68.
- Saparrat, M. C. N., Balatti, P. A, Martínez, M. J., & Jurado, M. (2010). Differential regulation of laccase gene expression in *Corioloropsis rigida* LPSC No. 232. *Fungal biology*, 114, 999-1006.
- Sapmak, A., Boyce, K. J., Andrianopoulos, A., & Vanittanakom, N. (2015). The pbrB gene encodes a laccase required for DHN-Melanin synthesis in conidia of *Talaromyces (Penicillium) marneffeii*. *Plos One*, 10, 1-16.
- Schmaler-Ripcke, J., Sugareva, V., Gebhardt, P., Winkler, R., Kniemeyer, O., Heinekamp, T., & 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, 493-503.
- Schumann, J., & Hertweck, C. (2006). Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. *Journal of Biotechnology*, 124, 690-703.
- Schwartz, H.F. & Gálvez G.E. (1980) Problemas de producción del frijol: Enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris*. (CIAT, Cali).
- Schwartz, H.F., Pastor-Corrales, M.A. & Singh, S.P. (1982). New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 31, 741-754.
- Schweitzer, A. D., Howell, R. C., Jiang, Z., Bryan, R. A., Gerfen, G., Che, C. H., Mah, D., Cahill, S., Casadevall, A., Dadachova, E. (2009). Physico-chemical evaluation of rationally designed melanins as novel nature-inspired radioprotectors. *Plos one*, 4, e 7229.
- Segura, C. J., Montory, J. A., Cubillos, V. M., Diederich, C. M., Pechenik, J. A., & Chaparro, O. R. (2015). Brooding strategy in fluctuating salinity environments: oxygen availability in the pallial cavity and metabolic stress in females and offspring in the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Journal of Comparative Physiology B*. 185,659-668.
- Selvakumar, P., Rajasekar, S., Periasamy, K., & Raaman, N. (2008). Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus* (telomorph of *Antromycopsis macrocarpa*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2125-2131.
- Shcherba, V. V., Babitskaya, V. G., Kurchenko, V. P., Ikonnikova, N. V., & Kukulyanskaya, T. A. (2000). Antioxidant properties of fungal melanin pigments. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36, 564-568.

-
- Sikorski, J., & Nevo, E. (2005). Adaptation and incipient sympatric speciation of *Bacillus simplex* under microclimatic contrast at "Evolution Canyons" I and II, Israel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 15924-15929.
- Simonovic, J., Stevanic, J., Djikanovic, D., Salmén, L., & Radotic, K. (2011). Anisotropy of cell wall polymers in branches of hardwood and softwood: a polarized FTIR study. *Cellulose*, 18, 1433-1440.
- Singaravelan, N., Grishkan, I., Beharav, A., Wakamatsu, K., Ito, S., & Nevo, E. (2008). Adaptive melanin response of the soil fungus *Aspergillus niger* to UV radiation stress at "Evolution Canyon", Mount Carmel, Israel. *Plos One*, 3, e2993.
- Solano, F. (2014). Melanins: skin pigments and much more types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*, 1-28.
- Stenglein, S. (2007). Mancha angular del poroto. Variabilidad del agente etiológico *Phaeoisariopsis griseola* y tolerancia de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*. Tesis, 1-129.
- Stenglein, S. A., Aulicino, M., Arambarri, A., & Balatti, P. A. (2006). New media for increasing sporulation and germination of *Phaeoisariopsis griseola* conidia. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 173-180.
- Stenglein, S. A., Ploper, D., Vizgarra, O., & Balatti, P. A. (2003). Angular Leaf Spot: A disease caused by the fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc) Ferraris on *Phaseolus vulgaris* L. *Advances in applied microbiology*, 52, 209-236.
- Sterflinger, K. (2006). Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. In *Biodiversity and ecophysiology of yeasts* (pp. 501-514). Springer Berlin Heidelberg.
- Strack, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62, 247-269.
- Sun, J., Zhang, J., Najafzadeh, M. J., Badali, H., Li, X., Xi, L., & de Hoog, G. S. (2011). Melanization of a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora* increases tolerance to stress factors while no effects on antifungal susceptibility. *Mycopathologia*, 172, 373-80.
- Suryanarayanan, T. S., Ravishankar, J. P., Venkatesan, G., & Murali, T. S. (2004). Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte. *Mycological Research*, 108, 974-978.
- Taborda, C. P., Silva, M. B., Nosanchuk, J. D., & Travassos, L. R. (2008). Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia*, 165, 331-339.
- Tapia, A., & Araya, M. (2006). Estrés oxidativo, prooxidantes y enfermedad de Crohn. *Revista médica de Chile*, 134, 95-100.

-
- Tarangini, K., & Mishra, S. (2014). Production of melanin by soil microbial isolate on fruit waste extract: two step optimization of key parameters. *Biotechnology Reports*, 4, 139-146.
- Tavzes, Č., Šilc, F., Kladnik, A., Fackler, K., Messner, K., Pohleven, F., & Koestler, R. J. (2009). Enzymatic degradation of mould stains on paper analysed by colorimetry and DRIFT-IR spectroscopy. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 873-879.
- Tetsch, L., Bend, J., & Hölker, U. (2006). Molecular and enzymatic characterisation of extra- and intracellular laccases from the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90, 183-194.
- Thompson, J.E.; Fahnestock, S.; Farralli, L.; Liao, D.; Valenti, B.; Jordan, D.B. 2000. The second naphthol reductase of fungal melanin biosynthesis in *Magnaporthe grisea*. *The journal of biological chemistry*, 275: 34867–34872.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Biological Chemistry*, 1, 19-26.
- Troncozo, M. I., Gómez, R. P., Arambarri, M. A., Balatti, P. A., Bucsinszky, A. M. M., & Saparrat, M. C. (2015). Growth and oxidative enzymatic activity of in-vitro cultures of *Ciliochorella buxifolia*. *Mycoscience*, 56, 58-65.
- Tseng, M. N., Chung, P. C., Tzean, S. S., Tseng, M. N., Chung, P. C., & Tzean, S. S. (2011). Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes *Applied and environmental microbiology*, 77. 4508-4519.
- Turick, C. E., Tisa, L. S., & Caccavo, F. (2002). Melanin production and use as a soluble electron shuttle for Fe (III) oxide reduction and as a terminal electron acceptor by *Shewanella algae* BrY. *Applied and environmental microbiology*, 68, 2436-2444.
- Turturică, M., Oancea, A., Râpeanu, G., & Bahrim, G. (2015). Anthocyanins: naturally occurring fruit pigments with functional properties. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI Food Technology*, 39, 9-24.
- Urán, M. E., & Cano, L. E. (2008). Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12, 357-377.
- van de Sande, W. W. J., de Kat, J., Coppens, J., Ahmed, A. O. A, Fahal, A., Verbrugh, H., & van Belkum, A. (2007). Melanin biosynthesis in *Madurella mycetomatis* and its effect on susceptibility to itraconazole and ketoconazole. *Microbes and infection*, 9, 1114-1123.
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48, 1065-1079.
- Wakamatsu, K., & Ito, S. (2002). Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Research*, 15, 174-183.

-
- Webster, J., & Weber, R. (2007). Introduction to fungi. Cambridge University Press.
- Weijn, A., Bastiaan-net, S., Wichers, H. J., & Mes, J. J. (2013). Melanin biosynthesis pathway in *Agaricus bisporus* mushrooms. *Fungal Genetics and Biology*, 55, 42-53.
- Wheeler, M. & 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.
- Wheeler, M. H., & Stipanovic, R. D. (1979). Melanin biosynthesis in *Thielaviopsis basicola*. *Experimental Mycology*, 3, 340-350.
- Yabuuchi, E., & Ohyama, A. (1972). Characterization of "Pyomelani ": Producing strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 22, 53-64.
- Ye, M., Wang, Y., Qian, M., Chen, X., & Hu, X. (2011). Preparation and properties of the melanin from *Lachnum singerianum*. *International journal of basic & applied sciences*, 11, 51-58.
- Youngchim, S., Pornsuwan, S., Nosanchuk, J. D., Dankai, W., & Vanittanakom, N. (2011). Melanogenesis in dermatophyte species in vitro and during infection. *Microbiology*, 157, 2348-2356.
- Zeng, J., Decker, R., & Zhan, J. (2012). Biochemical characterization of a Type III polyketide biosynthetic gene cluster from *Streptomyces toxytricini*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 1020-1033.
- Zhang, R., Xia, H., Xu, Q., Dang, F., & Qin, Z. (2013). Recombinational cloning of the antibiotic biosynthetic gene clusters in linear plasmid SCP1 of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *FEMS microbiology letters*, 345, 39-48.
- Zhu, Z.-qing, Zhou, F., Li, J.-li, Zhu, F.-xing, & Ma, H.-ju. (2016). Carbendazim resistance in field isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* in China and its management. *Crop Protection*, 81, 115-121.