

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN ORNITINA DESCARBOXILASA DE
Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid COMO FACTOR DE PATOGENICIDAD
EN *Phaseolus vulgaris* L.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**

PRESENTA:

BACT. MARTHA VIVIANA ROA CORDERO

REYNOSA, TAMAULIPAS

ENERO DE 2015

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN ODC ORNITINA DESCARBOXILASA DE
***Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid COMO FACTOR DE PATOGENICIDAD**
EN *Phaseolus vulgaris* L.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

PRESENTA:

BACT. MARTHA VIVIANA ROA CORDERO

REYNOSA, TAMAULIPAS

ENERO DE 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. el día 16 del mes Diciembre del año 2014, el que suscribe Martha Viviana Roa Cordero alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica con número de registro B120892 adscrito a Centro de Biotecnología Genómica manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Raymundo Rosas Quijano y cede los derechos del trabajo intitulado "Análisis molecular del gen ornitina descarboxilasa de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid como factor de patogenicidad en *Phaseolus vulgaris* L." al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Bldv. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Martha Viviana Roa Cordero
Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. siendo las 12:00 horas del día 16 del mes de Diciembre del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:
Análisis molecular del gen ornitina descarboxilasa de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid como factor de patogenicidad en *Phaseolus vulgaris* L.

Presentada por el alumno:

<u>Roa</u>	<u>Cordero</u>	<u>Martha Viviana</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
Con registro: <table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>B</td><td>1</td><td>2</td><td>0</td><td>8</td><td>9</td><td>2</td></tr></table>			B	1	2	0	8	9	2
B	1	2	0	8	9	2			

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

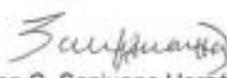
LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dr. Raymundo Rosas Quijano



Dr. Netzahualcoyotl Mayek Pérez



M. en C. Sanjuana Hernández Delgado



Dr. Juan Manuel González Prieto



Dr. Víctor Ricardo Moreno Medina

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Miguel Ángel Reyes López



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Raymundo Rosas Quijano y fue financiado por los proyectos CONACYT CB-2011-01 169827 y SIP 20144078.

ÍNDICE

Sección	Página
LISTA DE CUADROS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE SÍMBOLOS Y/O NOMENCLATURA.....	VIII
AGRADECIMIENTOS.....	XI
DEDICATORIA.....	XIV
RESUMEN.....	XVI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 IMPACTO AGROECONÓMICO DEL CULTIVO DEL FRIJOL COMÚN (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	3
2.2 PROBLEMAS ASOCIADOS AL CULTIVO DEL FRIJOL.....	4
2.2.1 Factores abióticos.....	6
2.2.2 Factores bióticos.....	7
2.2.2.1 <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid.....	9
2.3 GENERALIDADES SOBRE LAS POLIAMINAS.....	12
2.3.1 Mecanismos de biosíntesis y regulación de las poliaminas.....	14
2.3.2 Consideraciones generales sobre la ornitina descarboxilasa (ODC).....	17
2.3.3 El papel de las poliaminas en el proceso infeccioso de hongos fitopatógenos.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	26

5. OBJETIVOS.....	27
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	27
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1 IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE LA ODC EN <i>M. phaseolina</i>	28
6.1.1 Material biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento..	28
6.1.2 Análisis bioinformáticos y diseño de oligonucleótidos específicos....	29
6.1.3 Técnicas moleculares de manipulación de ácidos nucleicos.....	30
6.1.3.1 Extracción de ácido desoxirribonucleico genómico (ADNg).....	30
6.1.3.2 Reconstitución de los oligonucleótidos liofilizados.....	31
6.1.3.3 Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	32
6.1.3.4 Limpieza de los productos de PCR.....	33
6.1.3.5 Clonación.....	34
6.1.3.6 Escrutinio de las clonas por PCR en colonia.....	35
6.1.3.7 Extracción del ADN plasmídico.....	36
6.1.3.8 Secuenciación.....	37
6.2 ANÁLISIS DE LAS ESTRUCTURAS REGULATORIAS DEL GEN DE LA ODC EN <i>M. phaseolina</i>	38
6.2.1 Material biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento...	38
6.2.2 Técnicas moleculares de manipulación de ácidos nucleicos	38
6.2.2.1 Extracción de Ácido Ribonucleico (RNA) de <i>M.</i> <i>phaseolina</i>	38
6.2.2.2 Limpieza del RNA.....	39
6.2.2.3 Análisis RACE.....	39
6.2.2.4 Confirmación de la secuencia intrónica del gen ODC aislado.....	43

6.2.2.5 Análisis bioinformáticos y diseño de oligonucleótidos	44
6.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL GEN DE LA ODC	
DURANTE LA PATOGÉNESIS DE <i>M. phaseolina</i> EN <i>P. vulgaris</i>	45
6.3.1 Material biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento....	45
6.3.1.1 Preparación de inóculos para ensayo de interacción <i>M.</i> <i>phaseolina-P.vulgaris</i>	45
6.3.1.2 Desinfección de semillas de <i>P. vulgaris</i>	46
6.3.1.3 Germinación de semillas de <i>P. vulgaris</i>	47
6.3.1.4 Condiciones experimentales de la interacción planta-hongo...	47
6.3.1.5 Evaluación del impacto de la inhibición química de la ODC sobre el crecimiento vegetativo de <i>M. phaseolina</i>	48
6.3.2 Análisis bioinformáticos y diseño de oligonucleótidos.....	49
6.3.3 Técnicas moleculares de manipulación de ácidos nucleicos.....	49
6.3.3.1 Extracción de RNA total de <i>M. phaseolina</i> , <i>P. vulgaris</i> y de la interacción planta-hongo.....	49
6.3.3.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	51
6.3.3.3 Cuantificación de la expresión del gen de la ODC de <i>M.</i> <i>phaseolina</i> por RT- PCR en tiempo real (RT qPCR).....	51
6.3.4 Análisis estadístico.....	53
7. RESULTADOS	54
7.1 IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE LA ODC EN <i>M. phaseolina</i>	54
7.2 ANÁLISIS DE LAS ESTRUCTURAS REGULATORIAS DEL GEN DE LA ODC EN <i>M. phaseolina</i>	55
7.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL GEN ODC DURANTE LA PATOGÉNESIS DE <i>M. phaseolina</i> EN <i>P. vulgaris</i>	67
7.3.1 Impacto de la inhibición química de la ODC sobre el crecimiento vegetativo de <i>M. phaseolina</i>	67
7.3.2 Ensayo de Patogenicidad de <i>M. phaseolina</i> en <i>P. vulgaris</i> para evaluación de la expresión del gen ODC.....	74

8. DISCUSIÓN.....	84
9. CONCLUSIONES.....	108
10. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS.....	109
11. BIBLIOGRAFÍA.....	111
12. APÉNDICES.....	127
12.1 APÉNDICE A: REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	127
12.2 APÉNDICE B: ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS SECUENCIAS PROMOTORAS DE LAS CEPAS HMP05 Y MS6.....	132
12.3 APÉNDICE C: ALINEAMIENTO PARA CONFIRMAR POSICIÓN DEL INTRÓN EN EL GEN ODC DE LA CEPA HMP05.....	134

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características de los iniciadores utilizados para la amplificación de ODC por PCR	54
2	Matriz de distancias entre secuencias aminoacídicas de AZI de invertebrados y la ODC de <i>M. phaseolina</i>	63
3.	Descripción general de los dominios de unión a factores de transcripción identificados en la región promotora de <i>M. phaseolina</i> HMP05.....	70
4	Resultado de la prueba Post Hoc para evaluar el efecto de la inhibición química con DAB sobre el crecimiento vegetativo de <i>Macrophomina phaseolina</i>	74

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Características morfológicas del crecimiento de <i>M. phaseolina</i>	11
2	Ruta de biosíntesis y regulación de poliaminas.	16
3	Modelo de biosíntesis de las poliaminas en el hongo <i>Neurospora crassa</i> ..	18
4	Representación esquemática del gen ODC en el genoma de <i>M. phaseolina</i> MS6.	55
5	Amplificación del gen ODC en la cepa <i>M. phaseolina</i> HMP05 por PCR y análisis de homología.....	57
6	Análisis de homología e identificación de dominios putativos conservados en la secuencia ODC de la cepa HMP05.:	59
7	Alineamiento múltiple de proteínas derivado de la homología entre la ODC de <i>M. phaseolina</i> HMP05 con otras ODCs fúngicas.....	61
8	Modelamiento tridimensional de la proteína ODC de <i>M. phaseolina</i> HMP05, basado en proteínas homólogas.....	62
9	Secuencia nucleotídica del gen ODC de <i>M. phaseolina</i>	64
10	Alineamiento de ORFs de las cepas MS6 y HMP05 con la región de 248pb obtenida por secuenciación sobre ADNc de la región 3'-UTR.	65
11	Análisis de ADNc de <i>M. phaseolina</i> con el gen constitutivo GAPDH y ODC.....	66
12	Dominios de unión a factores de transcripción presentes en la región promotora del gen ODC de <i>M. phaseolina</i>	67
13	Cinéticas de crecimiento de <i>M. phaseolina</i> HMP05 en agar Czapek con PBS y DAB.	69

14	Cinéticas de crecimiento de <i>M. phaseolina</i> HMP05 con inhibición química por DAB, en medio Czapek-Dox y PBS.....	73
15	Ensayo de interacción entre <i>M. phaseolina</i> HMP05 y <i>P. vulgaris</i> , variedades Pinto Saltillo y Negro Jamapa	79
16	Extracción de RNA total.....	80
17	Evaluación de la especificidad de ensayos TaqMan® para amplificación de ODC y GAPDH en <i>M. phaseolina</i>	81
18	Cuantificación relativa de la expresión del gen ODC durante la patogénesis de <i>M. phaseolina</i> en <i>P. vulgaris</i> .Var. Negro Jamapa.....	82
19	Ensayo de preamplificación para detección de ODC durante la interacción <i>M. phaseolina</i> - <i>P. vulgaris</i>	83

LISTA DE SÍMBOLOS Y/O NOMENCLATURA

%	Porcentaje
µg	Microgramo
µM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
DNAsa I	Desoxirribonucleasa I
ANOLEA	Evaluación atómica del ambiente no local (por sus siglas en inglés)
AZ	Antienzima
AZI	Inhibidor de la antienzima
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (por sus siglas en inglés)
CDS	Secuencia codificante del ADN (por sus siglas en inglés)
COOH	Carboxilo
CWDE	Enzimas degradadoras de la pared celular (por sus siglas en inglés)
DAB	1,4-diamino-2-butanona
DEPC	Dietilpirocarbonato

dNTPs	Deoxinucleótidos
EST	Etiquetas de expresión génica (por sus siglas en inglés)
h	Horas
HOG	Vía de alta osmolaridad por glicerol
Kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (por sus siglas en inglés)
mM	Milimolar
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés)
NH ₂	Amino
Oaz1	Antienzima de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
°C	Grados centígrados
ODC	Ornitina descarboxilasa
ORF	Marco de lectura abierto (por sus siglas en inglés)
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
PDB	Banco de datos de proteínas (por sus siglas en inglés)
pH	Potencial de hidrogeniones
RACE	Amplificación rápida de los extremos del ADNc (por sus siglas en inglés).
RNA	Ácido ribonucléico

RNA _m	RNA mensajero
RNA _t	RNA de transferencia
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato sódico
TFBSs	Sitios de unión a factores de transcripción (por sus siglas en inglés)
TSS	sitio de inicio de la transcripción
USA	Estados Unidos de América
UTR	Regiones no traducidas (por sus siglas en inglés)
X	Número de aumentos.

AGRADECIMIENTOS

Al terminar el viaje me declaro absolutamente grata como *la voz del agua a quien abrumaron negras arenas*. He de confesar que he sido secretamente feliz en medio del agreste paisaje, de la fiebre del sol interrumpida por el río Bravo, que se alzó ante mis ojos con su cauce sereno, enigmático de historias, frontera del sueño. A Reynosa le agradezco esta aventura.

Debo decir también que tengo mi equipaje lleno, atiborrado de amigos, de dioses Aztecas, de un pedazo de lluvia que me dieron los Tlaloques. Las tardes de Chapultepec me las llevo en la maleta, el baile de los voladores, las tortillas, el tequila y los tlacoyos. Me robo la pirámide del sol y tal vez uno de los versos de Paz escritos con tinta verde. A México le agradezco su herencia, a esta tierra entrañable me la llevo en la memoria.

Quiero agradecer a mi madre, la persona más valiosa de mi existencia, a quien amo y admiro por ser una guerrera implacable. Es grato saberse anclado al mar que se oculta en sus ojos. A ella que me ha enseñado a soñar, a persistir, a no callar. A ella, a quien se lo debo todo.

Agradezco especialmente a mi familia, que es el soporte principal de esta aventura, porque han sabido renunciar a mi compañía y me han dejado volar. A todo mi rebaño de Corderos, los presentes y los perdidos en medio de las estrellas: a mis papás José del Carmen Cordero y Alicia Villamizar, el motor más tierno que gobierna mi existencia; a mi tío Eduardo y mis hermanos Daniel y Lizeth Juliana, por el recuerdo mágico de aquéllos días en Ciudad de México; a Efrén y mi tía Luz Helena, el poema que llevo tatuado; a mis tíos Rosario y Fernando, mis siempre segundos padres.

A Oscar Ernesto Che, el fanático de mis besos, el más paciente militante de mis ausencias. A él, que sabiéndome libre teje un sueño azul intenso como el cielo, para que pueda jugar a ser cometa o golondrina. A él, por su paciencia, su incondicionalidad y su amor, ese que me colma y me transpasa.

Agradezco profundamente a Israel Vergara Álvarez, mi siempre amigo y cómplice, mi adorado compañero, quien ha sabido direccionar mi torpe manera de andar con su juicio y su sonrisa. A él le adeudo la magia, la ternura y la poesía.

A Nubia Andrea Villota Salazar, por los días viejos y los tiempos nuevos, con especial cariño por su lealtad y confianza. A ella quiero regalarle un beso, por trazar la ruta que me trajo hasta aquí y animarme con su ejemplo.

A German Alexis Zafra Sierra, Sandra Milena Leal y Paola Hernández Galvis, quienes a pesar de la distancia, me han demostrado su incondicionalidad y aprecio.

Al M en C Cristian Lizarazo Ortega, *compatriota de cielos y naufragios*, a él, a su esposa Lupita y a la adorable doctora muñecos, quienes han sabido brindarme la alegría de una familia para menguar los momentos de soledad.

A todo el comité tutorial que me acompañó durante esta inolvidable travesía. A los Doctores José Luis Hernandez y Victor Ricardo Moreno, por su constante interés en el desarrollo de este proyecto y valiosos aportes. Agradezco especialmente al Dr. Nezahualcóyotl Mayek Pérez y la M en C San Juana Hernández, quienes hicieron más ameno mi trabajo con su solidaridad y compañía.

Agradezco sinceramente al Dr. Juan Manuel González Prieto por hacer divertidas mis tardes con un café colombiano y su particular discurrir, que me resulta tan grato. A él, quien supo ser amigo y profesor, por ayudarme a direccionar un barco que pareció naufragar entre insomnio y lágrimas.

Agradezco al Dr. Raymundo Rosas Quijano por fomentar mi crecimiento profesional y personal durante el desarrollo de este trabajo, especialmente por su disposición para escuchar y discutir permanentemente mis ideas. Ha sido grato compartir un escenario de aprendizaje constante que ha cambiado mi percepción de la vida y de la ciencia radicalmente.

A la Dra. Didiana Gálvez por su generosidad y gran espíritu de colaboración, quien puso a mi disposición el recurso tecnológico necesario para la ejecución de las pruebas de PCR en tiempo real durante mi estancia en el INIFAP.

A la Dra. Ileana Licon Limón, por su invaluable amistad y disposición para asesorar la optimización de técnicas para los ensayos de expresión en tiempo real del presente documento. A ella, mi total gratitud por permitirme un espacio de discusión científica que me ha sido absolutamente enriquecedor.

Al Dr. Carlos García, del Laboratorio de Bioinformática, por su activa participación y compromiso con el desarrollo de mi trabajo. Debo decir que su tiempo y colaboración me han ayudado a razonar desde otra perspectiva.

Al Técnico Ángel Salazar, del laboratorio de Biotecnología experimental, de quien no solo he aprendido las técnicas clásicas de cultivo de tejidos, sino la disciplina y el amor por el conocimiento.

A Gerardo Trejo, por su disposición para ser mi aprendiz, a él quien sin saberlo, perfiló muchas de mis herramientas pedagógicas e hizo más a ameno mi trabajo cotidiano.

Agradezco la dulzura, el apoyo y compañía de mis inolvidables amigos Omotayo Oyedara Opemipo; Jairo Martínez Mondragón, Lourdes Vital, Erick Sanchez, Juan Carlos Padilla Antúnez, Alfonso Tena y Fanny Ramírez. A todos mis compañeros de la maestría y a aquéllos residentes de Narciso's Garden con quienes he compartido el pedazo más importante de la casa, el que ocupan los amigos.

A todo el personal del Centro de Biotecnología Genómica, en especial a Clara Pérez Villareal, por su solidaridad y cariño.

Finalmente quiero agradecer el apoyo económico recibido de CONACYT a través de la beca nacional, al banco Santander por la beca Santander-ECOES, así como también al Instituto Politécnico Nacional por las becas BEIFI y Tesis, que contribuyeron al desarrollo y culminación de este trabajo. Debo decir que ésta es una casa de estudios de la que me siento honrada.

DEDICATORIA

A mamá, aveces gaviota, aveces mar... para ti, que eres mi más amado navegante

Uno nunca se da cuenta de lo que se ha hecho; sólo puede ver lo que queda por hacer.

Marie Curie (1867-1934)

RESUMEN

Las poliaminas son policaciones alifáticos de origen orgánico esenciales para todos los seres vivos, que se encuentran implicadas en múltiples procesos celulares relacionados con el crecimiento, proliferación y diferenciación, razón por la cual tienen una relación directa con el proceso patogénico de los hongos fitopatógenos. El metabolismo de las poliaminas ha sido ampliamente documentado y se encuentra bien descrito, sin embargo, se desconocen los detalles moleculares del mecanismo de acción de estos compuestos. La ornitina descarboxilasa (ODC) cataliza la síntesis de putrescina, reacción enzimática determinante para el anabolismo de las poliaminas, que ha permitido demostrar experimentalmente la relación que existe entre estas policaciones y la virulencia.

En este estudio se describe la secuencia clonada del gen ODC de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, que fue utilizada para predecir la estructura primaria de la proteína, misma que fue comparada con otras ODC fúngicas, así como también, el modelamiento tridimensional de su estructura, basado en proteínas homólogas. Se presenta además, un análisis de la región promotora que permitió la clonación y secuenciación de las regiones no traducidas 5' y 3' (UTR) para determinar el inicio de la transcripción (*tsp*), las señales y sitio de poliadenilación. El análisis *in silico* de la región regulatoria permitió predecir veinticinco dominios de unión a factores de transcripción que sugieren la presencia de un mecanismo de regulación transcripcional mediado por diversos estímulos ambientales, tales como pH, salinidad, y estrés hídrico, que indican que la ODC es un elemento clave para la respuesta adaptativa del microorganismo y potencia su virulencia.

Así mismo, se evaluó el impacto de la inhibición química de la ODC sobre el crecimiento vegetativo de *M. phaseolina*, usando el inhibidor competitivo 1,4-diamino-2-butanona (DAB), el cual tuvo un efecto dosis dependiente, que generó una reducción significativa de la tasa de crecimiento, demostrando la función de las poliaminas como

promotores del crecimiento micelial, indispensable para el proceso invasivo de este necrótrofo, en sus múltiples hospedantes.

Teniendo en cuenta el impacto deletéreo de la pudrición carbonosa producida por *M. phaseolina* en más de 500 especies vegetales de importancia agroeconómica, se establecieron ensayos de interacción con dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), con la finalidad de evaluar la actividad transcripcional del gen por PCR cuantitativa en tiempo real, durante la patogénesis. Sin embargo, no fue posible cuantificar el transcrito debido a los bajos niveles de expresión que exhibió el microorganismo, bajo las condiciones experimentales ensayadas.

ABSTRACT

Polyamines are organic aliphatic polycations essential for all living organisms, which are involved in several cellular and molecular processes related to growth, proliferation and differentiation. In consequence, they are involved in the pathogenicity process of phytopathogenic fungi. Even though the study of polyamines metabolism has been well documented, the molecular aspects of its mechanism of action are still unknown. Ornithine decarboxylase (ODC) catalyzes the synthesis of putrescine, an important step for polyamines anabolism, which has allowed to experimentally shown the relationship between polyamines and virulence.

This study described the sequence of the cloned ODC gene of *Macrophomina phaseolina*, which was utilized to predict the protein primary structure and subsequently compare it against other fungal ODCs, as well as the molecular modelling based in homologous proteins. The promotor region was also analyzed and used to clone and sequence the 5' and 3' untranslated regions (UTR) in order to know the transcription start point (*tsp*), as well as the polyadenilation site and signals. The in silico analysis of the promoter region allowed to predict twenty five transcription factor-binding sites, suggesting a transcription regulatory process influenced by environmental stimuli such as pH, salinity and osmotic stress and pointing out the role of ODC as a key element in the adaptive response of *M. phaseolina*, enhancing its virulence.

Furthermore, the chemical inhibition of ODC was evaluated in order to know its impact on vegetative growth using the competitive inhibitor 1, 4 diamino -2- butanone (DAB), which caused a dose-dependent effect. The use of DAB impaired the growth rate and caused a significant reduction, demonstrating the role of polyamines as positive promoters of the mycelial growth, essential for the invasive process of this necrotrophic organism in several hosts.

Taking into account the negative impact of the charcoal rot caused by *M. phaseolina* in more than five hundred economically important plants, interaction tests with *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) were established in order to assess the transcriptional activity of the ODC gene by quantitative real-time PCR during the pathogenesis process. However, transcript quantification was not possible due to the low expression levels exhibited by *M. phaseolina* under the experimental conditions tested.

1. INTRODUCCIÓN

La pudrición carbonosa es una de las enfermedades más devastadoras para el cultivo del frijol en el mundo. Su agente etiológico, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, es un hongo saprófito, ampliamente distribuido, capaz de infectar más de 500 hospedantes, en donde puede causar pudrición de la raíz, chancro del tallo, tizón foliar o podredumbre de la corona, entre otras, lo que lo convierte en un patógeno globalizado de alto impacto para la agricultura.

El estudio molecular de la patogénesis de *M. phaseolina* en *Phaseolus vulgaris* es incipiente y a la fecha se desconocen las bases moleculares de dicho proceso. Teniendo en cuenta la importancia del cultivo del frijol como base nutricional de la población mundial, principalmente por su alto contenido proteico y vitamínico, resulta de interés abordar el estudio de los factores de patogenicidad y virulencia de *M. phaseolina*, con el propósito de diseñar estrategias de control fúngico específicas, a futuro.

La ruta biosintética de las poliaminas es ampliamente reconocida por el papel esencial que desempeñan estas poliaminas en metabolismo celular, relacionado con los fenómenos de proliferación, diferenciación y crecimiento, así como con la regulación de la expresión génica, la transducción de señales y la regulación del ciclo celular. La trascendental importancia de estos fenómenos para la patogénesis fúngica ha generado un particular interés en el estudio de las poliaminas y las enzimas que catalizan su síntesis y regulación, como factores de patogenicidad y virulencia.

La ornitina descarboxilasa (ODC) es una de las tres enzimas que gobiernan el metabolismo de las poliaminas, se trata de la enzima limitante de la síntesis de la putrescina, la primera de las poliaminas de la ruta. Se ha evidenciado que al eliminar la actividad ODC en algunos patógenos fúngicos, se disminuye la virulencia, por lo que resulta de interés evaluar su actividad como factor de patogenicidad en *M. phaseolina*.

El presente estudio está orientado a identificar y demostrar el papel de la ODC como factor de patogenicidad en la interacción de *M. phaseolina* con *P. vulgaris*, para avanzar

en el conocimiento de las bases moleculares del proceso infeccioso y progresar en las estrategias de control de la enfermedad.

2. ANTECEDENTES

2.1 IMPACTO AGROECONÓMICO DEL CULTIVO DEL FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una de las leguminosas de consumo directo de mayor importancia en la economía de los países Latinoamericanos (Voysest, 2000). No obstante, el cultivo de este grano ocurre en diferentes regiones de África, Medio Oriente, Europa, Estados Unidos y Canadá, dado su alto potencial nutricional, que lo convierte en una fuente de ingresos para los pequeños agricultores y en muchos casos, en la base alimenticia de los sectores sociales más vulnerables.

La producción mundial de frijol para el 2013 fue de 23,1 millones de toneladas, de las cuales Asia aportó el 46%, seguido por América que produjo el 30,6% de la producción total, con un rendimiento promedio de 700 kg por hectárea. En América se destacan como primeros productores Brasil, México, Canadá y los países de América Central (FAO, 2014).

Se acepta que el origen Americano del frijol común se remonta al siglo XIX (Voysest, 2000), sin embargo, existe evidencia arqueológica que revela que apareció 5500 a 7000 años atrás, en el centro de México, donde las poblaciones silvestres de éste, abundan. Sobre la base de la diversidad, se ha establecido que el origen del frijol común puede corresponder a la región sur de México, Guatemala, Honduras y parte de Costa Rica, de donde fue distribuido a las Américas y el Caribe, en la época precolombina (National Research Council, 1972).

El cultivo del frijol reviste gran importancia sociocultural no solo por su origen ancestral, que lo posiciona como uno de los cultivos más representativos y tradicionales de América Latina, sino por su elevado valor nutricional, que lo convierte en un alimento casi “perfecto” por tratarse de una excelente fuente de proteínas, minerales, ácido fólico, fibra y carbohidratos complejos, a muy bajo precio (Jones, 1999;

Abdelwhab *et al.*, 2009). Los frijoles son además una de las principales fuentes no cárnicas de hierro.

La producción de frijol es predominantemente de temporal (70% del volumen), por lo que es vulnerable a las cambiantes condiciones climáticas. Sin embargo, México es autosuficiente en este importante alimento, aunque es un importador neto. Entre 2008 y 2013 se importó un promedio de 140 mil toneladas anuales, principalmente de USA (86%) y Canadá (9%). En tanto, en ese periodo se exportó un promedio de 26 mil toneladas anuales. Seis entidades concentran el 71.7% del volumen de producción nacional y 70.6% del valor generado. Zacatecas aporta 28.2% del volumen total, le siguen en importancia Sinaloa (10.5%), Durango (10.2%), Chihuahua (9.7%), Nayarit (6.8%) y Chiapas (6.4%), de acuerdo a lo reportado por la secretaría de hacienda y crédito público de México en 2014.

2.2 PROBLEMAS ASOCIADOS AL CULTIVO DEL FRIJOL

Los sistemas de cultivo del frijol común, son extremadamente variables. Se han descrito seis sistemas de cultivo principales, a saber: 1) monocultivo de frijol arbustivo u ocasionalmente de frijol trepador; 2) sistema de cultivo alternativo de frijol arbustivo o semi-trepador, con maíz; 3) siembra de frijol arbustivo o semi trepador en surcos intercalados con cultivos de maíz; 4) cultivo mixto (en este sistema el frijol y el maíz se plantan en el mismo terreno, no se siembran en surcos independientes y otros cultivos pueden estar presentes); 5) sistemas de siembra aleatoria o en surcos que intercalan frijol con otros cultivos como banano, papa, café o caña de azúcar, entre otros; y 6) cultivo intercalado de maíz y frijol trepador. La selección e implementación de un sistema particular, obedece principalmente a factores biológicos, fisiológicos y socioeconómicos (Wooley *et al.*, 1991). No obstante, el sistema de cultivo intercalado con maíz, genera grandes beneficios, pues al tener más de un grano en el suelo a la vez, no solo se contribuye al control de la maleza y propagación de agentes patógenos, sino que se proporciona un uso más eficaz del tiempo y la superficie terrestre, incrementando la rentabilidad (Graham y Ranalli, 1997).

En términos generales, el frijol común crece adecuadamente en áreas con precipitaciones lluviosas medias, pero la cosecha no se adapta a la humedad típica de regiones tropicales húmedas; climas excesivamente pluviosos o calurosos, causan caída de las vainas y flores, e incrementan la incidencia de enfermedades. Las temperaturas medias para el crecimiento del frijol oscilan entre los 10-27°C, con requerimientos de temperatura del suelo de 15°C o superiores para la germinación (FAO, 2013). No obstante, el cultivo del frijol común se caracteriza por su versatilidad, lo que le permite adaptarse exitosamente a un amplio rango de condiciones climáticas, en áreas geográficas que se extienden entre las latitudes 52° norte y 32° sur, lo que permite su cultivo en regiones ubicadas sobre el nivel del mar o por encima de los 3000 msnm. Pese a que la adaptación del frijol es más exitosa en áreas tropicales con mayor altitud y climas templados, puede crecer en regiones tropicales húmedas, semi-áridas e incluso en regiones con clima frío (Schoonhoven y Voysest, 1991).

Existen múltiples limitaciones para la productividad del frijol, que varían según la región en donde se cultive. En Latinoamérica y África, el cultivo de esta leguminosa está basado en sistemas de pequeños agricultores, con pocos insumos y escasos recursos tecnológicos, asediados por problemas biológicos, edáficos y climáticos, que disminuyen el rendimiento de los cultivos, particularmente si se les compara con el rendimiento promedio de aquéllos de las regiones templadas de Norte América y Europa. En las regiones tropicales, las mayores limitantes para la producción son las enfermedades, plagas de insectos y fertilidad del suelo. La mayoría de razas y variedades mejoradas que crecen en estas áreas, son susceptibles a uno o más de estos factores, lo que impide que se explote su máximo potencial y se genere inestabilidad en la producción (Schwartz y Pastor-Corrales, 1989). En Norte América y Europa, en cambio, se emplean sistemas de producción a gran escala, en donde las mayores limitantes de productividad están asociadas con aspectos relativos al mejoramiento del grano *per se* (Graham y Ranalli, 1997).

2.2.1 Factores abióticos

El ambiente natural de las plantas está compuesto de un complejo set de estrés biótico y abiótico. La respuesta de las plantas a estos tipos de estrés, es igualmente compleja. Aunque no se puede estimar con gran precisión los efectos del estrés abiótico sobre la producción de granos, es evidente que éste genera un impacto significativo sobre las plantas, tal como lo demuestra el porcentaje de superficie afectada, calculado por la FAO para el año 2007 (Van Velthuis *et al.*, 2007), que indica que 10.5 billones de hectáreas de tierra, es decir, casi cuatro quintas partes de la superficie terrestre del planeta (excluyendo la Antártida), sufren limitaciones importantes para la agricultura de secano, dejando solo un 3.5% de la superficie terrestre, completamente libre de restricciones ambientales.

Fundamentalmente, las plantas requieren energía (luz), agua, Carbono y nutrientes minerales para crecer. El estrés abiótico es definido como las condiciones ambientales que reducen el crecimiento y el rendimiento de los cultivo por debajo de los niveles óptimos (Cramer *et al.*, 2011). El frijol, gracias a la gamma de hábitos y ciclos de crecimiento que le son inherentes, se ajusta a varios nichos de producción y por tanto, es afectado por un amplio rango de factores abióticos característicos de las regiones donde se cultiva.

El estrés hídrico es una de las principales causas de bajo rendimiento del cultivo de frijol. En términos generales, se puede definir como una condición de insuficiente disponibilidad de agua, que incluye inadecuada precipitación y capacidad de almacenamiento de humedad del suelo, durante el ciclo de vida del cultivo, lo que restringe el potencial genético de la variedad que se coseche (Beebe *et al.*, 2013). La mayor producción susceptible a sequía se encuentra en el altiplano de México, donde más de un millón de hectáreas de frijol son cultivadas y el rendimiento cae por debajo de 0.4 toneladas/hectárea, en los años secos. Los efectos deletéreos de la sequía se ven magnificados en parte, porque la mayoría de regiones secas del mundo son cinturones de pobreza, donde la inversión de capital es escasa. La costa Pacífica de América central,

donde la mayoría de la población vive, es otra área propensa a la sequía, como lo son Haití y el este de Cuba en el Caribe. En África, se estima que 682.000 ha de frijol son cultivadas en ambientes semi-áridos, con pérdidas anuales por estrés hídrico de 781.000 toneladas en todos los entornos (Wortmann *et al.*, 1998; Beebe *et al.*, 2013).

La nutrición mineral del suelo, es otro de los factores que pueden menguar la producción de frijol. El altiplano Suramericano tiene suelos con muy bajo pH, niveles tóxicos de Aluminio y limitada disponibilidad de Nitrógeno y Fósforo, que disminuyen la fertilidad del suelo, lo que constituye el mayor impedimento para la expansión de los cultivos en estas regiones (Pereira y Bliss, 1987); La depleción de la fertilidad del suelo, junto con problemas concomitantes como maleza, plagas y enfermedades, son la principal causa biofísica de la baja producción de alimentos *per capita* en África (Sánchez, 2002). Así mismo, se ha reportado que el suelo en América Latina es deficiente en Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Sodio, Zinc, Calcio y Magnesio, lo que contribuye a la débil capacidad nodulante y fijadora de nitrógeno de *P. vulgaris* (Graham y Ranalli, 1997).

La salinidad por su parte, es una de las principales limitantes de la productividad de legumbres en regiones áridas y semi-áridas, dificultando la germinación de semillas, proceso biológico complejo que depende de factores genéticos y ambientales tales como la luz, temperatura y salinidad (Cokkizgin, 2012).

Existen otros factores que pueden tener injerencia directa sobre el desarrollo del frijol, dentro de los que se cuentan las altas temperaturas, que afectan negativamente la interacción polen-estigma, el crecimiento del tubo polínico y la fertilización; el estrés por ozono, que puede reducir la concentración de clorofila foliar, la materia seca y biomasa de la planta y la maleza, que puede competir por nutrientes y agua.

2.2.2 Factores bióticos

En la mayoría de regiones tropicales donde se cultiva frijol, la problemática de más relevancia son los fitopatógenos, cuya prevalencia varía considerablemente con la

localidad, estación, año y cultivar empleado. Sin embargo, algunos patógenos como aquéllos que causan la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), bacteriosis común (*Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*), mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), roya (*Uromyces appendiculatus* var *appendiculatus*) y virus del mosaico común (BCMV), entre otras, se encuentran ampliamente distribuidos y revisten importancia económica, especialmente en África y Latinoamérica. Otro grupo de patógenos de alto impacto agroeconómico, dentro de los que se incluyen el virus del mosaico dorado (BGMV), la mustia hilachosa (*Thanatephorus cucumeris*) y el tizón del frijol (*Ascochyta* sp), están restringidos a regiones específicas que favorecen su crecimiento y diseminación. Otros, como los agentes etiológicos de la pudrición de la raíz, están ampliamente distribuidos, pero tienen una importancia económica menor (Schwartz y Pastor-Corrales, 1989).

Varias especies fúngicas son agentes etiológicos de la pudrición de la raíz del frijol. Las infecciones más prevalentes en América Latina y África, son aquellas generadas por especies de *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Macrophomina*, *Phytium* y *Thielaviopsis*. La incidencia y severidad de las pudriciones de la raíz varían considerablemente entre plantaciones de una misma área, así como entre estaciones, generando síntomas y signos característicos entre los que se incluyen clorosis, defoliación prematura, retraso y desigualdad en el crecimiento, pobre establecimiento de plántulas, disminución en la densidad plantar y rendimiento del cultivo por infección de semillas germinantes, así como muerte prematura. Las raíces de las plantas infectadas usualmente son más pequeñas, tienen menos pelos radiculares y exhiben diferentes grados de decoloración y enraizamiento. Los efectos de la pudrición de la raíz pueden ser magnificados si las condiciones de humedad y fertilidad del suelo son limitadas, si el potencial de evapotranspiración es elevado o si hay presencia de otro tipo de estrés biológico tal como plagas de insectos u otros fitopatógenos (Abawi y Pastor-Corrales, 1990).

Los insectos por su parte, son otro de los factores que causan daños importantes a los cultivos de frijol. En Latinoamérica prevalecen la Chicharrita del frijol *Empoasca*

kraemeri Ross y Moore; crisomélidos (*Diabrotica balteata* y *Cerotoma facialis*) y gorgojos (familia *Bruchidae*), mientras que en África, el gusano del tallo (*Ophiomyia spp.*) y los brúquidos, son los más representativos (Graham y Ranalli, 1997). La mayoría de plagas de insectos y nematodos que atacan el frijol, son de importancia regional. Incluso si una plaga está ampliamente distribuida, diferentes especies pueden ocurrir en distintas regiones ecológicas, causando daño similar; tal es el caso de *E. kraemeri* Ross y Moore, distribuida ampliamente en regiones tropicales y sub tropicales cálidas a secas de América Latina y el Caribe, mientras *E. fabae* Harris (comúnmente conocida como chicharrita salta hojas) causa daño similar, pero en ambientes frescos y templados del medio oeste de USA y Canadá. Además del daño foliar y de afectar las partes subterráneas de la planta, incluyendo vainas, semillas y rendimiento del cultivo, los insectos son vectores de numerosas enfermedades virales para el frijol común. Se estima que los principales insectos y nematodos del continente Americano pueden generar pérdidas del rendimiento que oscilan entre el 35 y 100%, dependiendo de la ocurrencia y severidad de la plaga individual o colectiva; de los nematodos que co-existen; del sistema de producción, condiciones ambientales, cultivar y estadio del cultivo en el momento del ataque (Singh y Schwartz, 2011).

2.2.2.1 *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid, es un hongo fitopatógeno de gran importancia económica debido a su amplio espectro de hospederos, en el que figuran más de 500 especies de plantas que incluyen granos de consumo masivo como frijol, sorgo, algodón y maíz, entre otros (Jana *et al.*, 2003). *M. phaseolina* es el agente causal de varias enfermedades dentro de las que se incluyen la pudrición de la raíz, chancro del tallo, tizón foliar, podredumbre de la corona y pudrición carbonosa.

Macrophomina, es un género monotípico, con dos subfases asexuales documentadas: una fase saprofítica (*Rhizoctonia bataticola*), que forma microesclerocios y micelios y una fase patogénica (*M. phaseolina*), presente en los tejidos del hospedero, que forma microesclerocios, micelios y picnidios (Kaur *et al.*, 2012). Aunque se ha propuesto que

Orbilia obscura (Ghosh) Mukerji y Basak (Mihail 1992), puede ser su estado teleomorfo, la fase sexual en este organismo, no ha sido confirmada (Jana *et al.*, 2003). Taxonómicamente *M. phaseolina* ha sido clasificada como: Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Dothideomycetes; Dothideomycetes incertae sedis; Botryosphaerales; Botryosphaeriaceae; Botryosphaeriaceae; *Macrophomina phaseolina* (Baird *et al.*, 2010).

Las características morfológicas de *M. phaseolina* varían de cultivo a cultivo, de acuerdo con la edad. En general, el crecimiento *in vitro* es rápido, con producción de colonias típicamente blancas, que se van tornando marrones o cenicientas, hasta adquirir un color negro por la producción de esclerocios. El micelio aéreo puede ser abundante o pegado a la superficie del medio, con los esclerocios inmersos en él. Las hifas son septadas, hialinas, con tendencia a tornarse de color miel o negro con el paso del tiempo; forman ramificaciones secundarias que en general son en ángulo recto, pero aquellas en ángulo agudo, también son observables. Los microesclerocios se forman por agregación de hifas, con una pigmentación por efecto de la melanina. Se observan de color negro y su tamaño varía (50-150µm), de acuerdo al medio de cultivo empleado (Kaur *et al.*, 2012; Dhingra y Sinclair, 1987) (ver figura 1.).

La formación de picnidios no es característica del crecimiento *in vitro*, a menos que su producción sea inducida por técnicas especiales, en cuyo caso presentan diámetros aproximados de 300µm, con apariencia globosa y de color negro o marrón oscuro. Los picnidios se ubican inicialmente en el interior del tejido del hospedador que se vuelven errumpentes en la madurez. Son estructuras membranosas con un ostiolo central truncado que puede aparecer o no con una abertura hialina o clara dentro del fondo negrozco del picnidio (Kaur *et al.*, 2012).

La pudrición carbonosa, afecta a plantas de todo el continente Americano, Asia, África y algunos países de Europa, teniendo especial predilección por aquellas regiones tropicales y subtropicales áridas a semi-áridas (Islam *et al.*, 2012). En términos generales, los síntomas producidos por *M. phaseolina* en las plántulas emergentes se caracterizan por

lesiones irregulares, oscuras, de diferentes tamaños sobre los cotiledones, que se expanden rápidamente hasta alcanzar el tallo. La clorosis se manifiesta en hojas jóvenes que se encuentran por encima del sitio de infección, pero puede ser un síntoma sistémico o confinado a una región de la planta o de las hojas. Las lesiones pueden diseminarse por todo el tallo, alcanzando los puntos meristemáticos y destruyéndolos, o debilitando el tallo y provocando su rotura. Las lesiones diagnósticas también se producen en el tejido radicular, debajo de la superficie del suelo. Estas lesiones son longitudinales y estrechas, pero con el tiempo se expanden y cubren todo el tallo, matando a la planta. Las infecciones tardías sobre el tallo y peciolos, son blanquecinas o grisáceas, donde se producen eventualmente picnidios y esclerocios. Las plantas fuertemente infectadas exhiben síntomas de defoliación, marchitamiento y clorosis generalizada. Las semillas y las vainas infectadas, presentan microesclerocios y picnidios y pueden deformarse. Si la infección ocurre antes de la germinación por contacto con suelo infestado, se puede disminuir la tasa de emergencia (Abawi y Pastor-Corrales, 1990).



Figura 1. Características morfológicas del crecimiento de *M. phaseolina*.A: Hifas hialinas septadas con microesclerocio germinante 1000X; B: Morfología de la colonia en medio de cultivo Papa-dextrosa agar (PDA); C: Microesclerocio. 400X.

El ciclo infeccioso de *M. phaseolina*, comienza con la diseminación del esclerocio, fuente primaria de inoculación de elevada persistencia, que se encuentra en las raíces y tejidos de hospederos colonizados; suelo y detritus provenientes de tejidos vegetales en descomposición. La severidad de la pudrición carbonosa demuestra una correlación directa con la densidad poblacional de esclerocios presentes en el suelo, que a su vez se ve afectada por temperaturas extremas (50°C y -10°C) (Short *et al.*, 1980). Sin embargo, se ha documentado que la presencia de residuos de soja en la superficie del suelo, favorece la supervivencia de *M. phaseolina* durante el invierno, así como la de la

diversidad de hongos patógenos y saprófitos que pueden modular negativamente su persistencia (Baird *et al.*, 2003).

La penetración del hospedero está mediada por la formación del apresorio (Ammon *et al.*, 1975), o por lesiones del tejido vegetal que constituyen otra puerta de entrada para el microorganismo (Kaur *et al.*, 2012). La penetración se favorece por la secreción de enzimas degradadoras de la pared celular (CWDEs), tales como endoglucanasas. Una vez el patógeno ha penetrado la pared celular epidérmica, la colonización del tejido vascular que deriva del crecimiento intracelular de las hifas, constituye la siguiente etapa del proceso patogénico, con la subsecuente colonización del tejido vascular de la planta y el taponamiento mecánico característico del crecimiento al interior del hospedador.

La producción de toxinas en *M. phaseolina*, al igual que sucede con otros fitopatógenos, favorece el proceso de colonización del hospedero, a pesar de que su papel en el desarrollo de la enfermedad, no está del todo explicado. La secuencia del genoma de este microorganismo, confirma la existencia de sintetetasas peptídicas no ribosomales, que catalizan la producción de péptidos cíclicos en donde se incluyen numerosas micotoxinas (Islam *et al.*, 2012).

2.3 GENERALIDADES SOBRE LAS POLIAMINAS

Las poliaminas son policationes alifáticos de origen orgánico, que gracias a su versatilidad y ubicuidad participan en la regulación de procesos moleculares y celulares. Se trata de compuestos nitrogenados, cuya carga positiva está distribuida a lo largo de la molécula, capacitándolas para establecer asociaciones con proteínas, ácidos nucleicos y membranas celulares. Se ha descrito además, que dada su alta concentración en el citoplasma, pueden comportarse como osmolitos (Rajam *et al.*, 2004).

La diamina putrescina, la triamina espermidina y la tetramina espermina, son las poliaminas más abundantes en las células vivas (Groopa y Benavides, 2008); No obstante, pese a que la espermina se encuentra en la mayoría de eucariotas superiores, un

gran número de especies fúngicas no la sintetizan (Morgan, 1998; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

El estudio de las poliaminas en diferentes modelos (mamíferos, parásitos protozoarios, hongos y plantas, entre otros) ha permitido dilucidar su papel como reguladores de una amplia gama de procesos biológicos relacionados con el crecimiento, desarrollo y la diferenciación celular, entre otros (Coburn, 2009; Igarashia and Kashiwagic, 2010; Iacomino *et al.*, 2012.). Inicialmente se les atribuyó este papel, únicamente sobre la base de evidencia circunstancial, que reveló un incremento en la concentración de poliaminas en tejidos altamente proliferativos, así como también un aumento precipitado de la actividad enzimática mediadora de su biosíntesis, cuando el crecimiento o la diferenciación celular fueron inducidos (Heby, 1981; Tabor y Tabor, 1985; Kaur-Sawhney *et al.*, 1988; Desforges *et al.*, 2013). Investigaciones posteriores confirmaron su papel como reguladores de la embriogénesis somática, desarrollo de flores y frutos, respuesta al estrés biótico y abiótico, senescencia, formación de la raíz y brotes en vegetales (Rajam *et al.*, 2004; Wimalasekera *et al.*, 2011; Tisi *et al.*, 2011).

La función de las poliaminas en células de mamíferos resulta mucho más compleja ya que participan en la regulación de diversas actividades celulares a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional, afectando procesos de proliferación, transformación, diferenciación y de apoptosis (Chattopadhyay *et al.*, 2008).

Así mismo, se ha podido establecer que las poliaminas regulan de cierto modo la virulencia de los hongos fitopatógenos, dada la estrecha relación que existe entre su metabolismo y fenómenos biológicos como el dimorfismo, la germinación de esporas, la formación de apresorio y la conidiación (Guevara-Olvera *et al.*, 1993; Khurana *et al.*, 1996; Valdés-Santiago, L. *et al.*, 2012).

A pesar de las particularidades del metabolismo y funciones de las poliaminas en las células eucariotas y procariotas, su papel como regulador de diversos procesos biológicos, obedece principalmente a su naturaleza catiónica, que les permite interactuar

con los ácidos nucleicos, fosfolípidos de membrana y algunos componentes de la pared celular, estabilizando su estructura; modulando la expresión génica; afectando la actividad enzimática (quinasas, fosfatasas, etc.), influyendo selectivamente en los procesos de traducción de algunos RNAm; regulando interacciones ADN-proteína y la apoptosis celular (Chattopadhyay *et al.*, 2008; Pegg, 2009; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

2.3.1 Mecanismos de biosíntesis y regulación de las poliaminas

La síntesis de poliaminas comienza con la descarboxilación de la ornitina para formar putrescina, en una reacción catalizada por la ornitina descarboxilasa (E.C.4.1.1.17), que constituye el paso limitante del metabolismo de estos compuestos. La ornitina puede derivarse del ciclo de la urea, o de la hidrólisis de la arginina por acción de la arginasa (EC 3.5.3.1). La síntesis de la putrescina puede lograrse además, a través de la descarboxilación de la arginina por la enzima arginina descarboxilasa (EC 4.1.1.19), tal como sucede en bacterias y plantas superiores. Se ha sugerido que la síntesis de putrescina en hongos, está determinada principalmente por la actividad de la ornitina descarboxilasa y que al igual que en células de mamíferos, ésta es la única vía de biosíntesis de putrescina (Morgan, 1998; Bagni y Tassoni, 2001; Coffino, 2001; Valdés-Santiago *et al.*, 2012). No obstante, existen reportes que demuestran la actividad de arginina descarboxilasa en una variedad de hongos incluidos fitopatógenos, cuyo crecimiento es inhibido al entrar en contacto con inhibidores de arginina descarboxilasa y de ornitina descarboxilasa (Khan y Minocha, 1989; Gamarnik *et al.*, 1994; Sannazzaro *et al.*, 2004).

Lo anterior evidencia que en algunos de estos microorganismos, como en las plantas superiores, las dos rutas metabólicas pueden ser funcionales. Los organismos que poseen una ruta constitutiva para sintetizar putrescina vía agmatina, poseen actividad enzimática arginina descarboxilasa y agmatinasa (EC 3.5.3.11) para formar putrescina con eliminación de urea. Algunas plantas poseen rutas alternativas para catalizar la síntesis de putrescina vía agmatina, involucrando dos pasos importantes: transformación de agmatina a N-carbamoylputrescina, por acción de la enzima agmatina iminohidrolasa

(EC 3.5.3.12) y formación de putrescina a partir de este intermediario, por acción de N-carbamoylputrescina amidohidrolasa (EC 3.5.1.53) (Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

La síntesis de las poliaminas espermidina y espermina se logra por adición de grupos aminopropil a los precursores putrescina y espermidina, en reacciones catalizadas por espermidina sintasa (EC 2.5.1.16) y espermina sintasa (EC 2.5.1.22), respectivamente. Los grupos aminopropil son derivados del compuesto S-adenosilmetionina descarboxilado, que es sintetizado a partir de la descarboxilación de S-adenosilmetionina por S-adenosilmetionina descarboxilasa (EC 4.1.1.50). Como ya se mencionó en otro apartado, la síntesis de espermina es característica de los sistemas eucarióticos, sin embargo, no todos los hongos poseen la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar este compuesto (Nickerson *et al.*, 1977).

El proceso biosintético puede revertirse por una serie de reacciones catabólicas que están diseñadas para proporcionar las poliaminas requeridas rápidamente (Urdiales *et al.*, 2001). Este ciclo de interconversión consiste en reacciones de acetilación catalizadas por espermidina/espermina acetiltransferasa (EC 2.3.1.57) y escisión oxidativa subsecuente, por la enzima dependiente de FAD (Flavina adenina dinucleótido), poliamina oxidasa (EC 1.4.3.4). La ruta de biosíntesis de poliaminas es esquematizado en la Figura 2.

La regulación de los niveles de poliaminas constituye un mecanismo esencial para la adecuada supervivencia de la célula, ya que estados carenciales o de síntesis ilimitada pueden generar consecuencias deletéreas (Poulin *et al.*, 1993). Tal proceso se determina principalmente por la actividad de las enzimas descarboxilasas de oornitinarritina, descarboxilasas de S-adenosilmetionina (ODC y SAMDC, respectivamente) y por la espermina/espermidina acetiltransferasa. Las poliaminas además, ejercen un mecanismo de control biosintético por hidrólisis independiente de ubiquitinación, que es gobernado por una proteína inhibidora, denominada antienzima (Az) de la ODC (Heller *et al.*, 1976), requerida para controlar los niveles endógenos de la ODC, en respuesta a los cambios de concentración en las poliaminas (Palanimurugan *et al.*, 2004) y que a su vez es regulada por una proteína inhibidora de la antienzima (AZI).

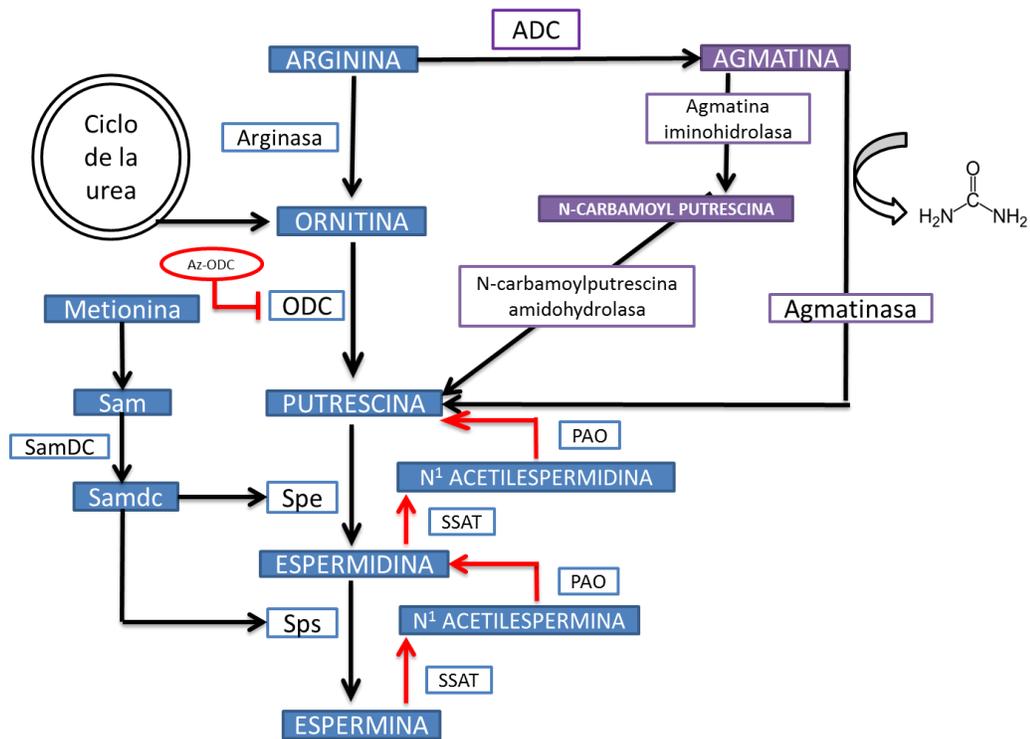


Figura 2. Ruta de biosíntesis y regulación de poliaminas. Se esquematizan las principales reacciones enzimáticas involucradas en el metabolismo de las poliaminas. En color azul se representa el mecanismo de síntesis común a eucariotas y procariontes; y en violeta, la vía alterna de síntesis de poliaminas, presente en bacterias, plantas y algunos hongos; en rojo se muestran las reacciones de regulación e interconversión de la ruta. En la figura: ODC: ornitina descarboxilasa; Sam: S-adenosilmetionina; SamDC: S-adenosilmetionina descarboxilasa; Samdc: Sam descarboxilado; spe: espermidina sintasa; sps: espermina sintasa; SSAT: espermidina/espermina acetiltransferasa; PAO: poliamina oxidasa; ADC: arginina descarboxilasa; Az-ODC: antienzima de la ODC.

La regulación de los niveles de poliaminas constituye un mecanismo esencial para la adecuada supervivencia de la célula, ya que estados carenciales o de síntesis ilimitada pueden generar consecuencias deletéreas (Poulin *et al.*, 1993). Tal proceso se determina principalmente por la actividad de las enzimas descarboxilasas de Ornitina, descarboxilasas de S-adenosilmetionina (ODC y SAMDC, respectivamente) y por la espermina/espermidina acetiltransferasa. Las poliaminas además, ejercen un mecanismo de control biosintético por hidrólisis independiente de ubiquitinación, que es gobernado

por una proteína inhibidora, denominada antienzima (Az) de la ODC (Heller *et al.*, 1976), requerida para controlar los niveles endógenos de la ODC, en respuesta a los cambios de concentración en las poliaminas (Palanimurugan *et al.*, 2004) y que a su vez es regulada por una proteína inhibidora de la Antienzima (AZI).

2.3.2 Consideraciones generales sobre la ornitina descarboxilasa (ODC)

La ODC es una enzima 5- piridoxal fosfato dependiente, que cataliza la descarboxilación de la ornitina, para producir putrescina, la cual es convertida en las poliaminas espermidina y espermina (Liu *et al.*, 2011; Pegg, 2006). Es la primera proteína involucrada en la biosíntesis de las poliaminas, la cual es esencial para el crecimiento y diferenciación celular de los eucariotas (Davis *et al.*, 1992). La expresión de esta enzima se incrementa transitoriamente después de la estimulación por factores de crecimiento, pero se activa constitutivamente durante la transformación celular inducida por agentes carcinógenos, virus u oncogenes (Auvinen *et al.*, 1992). La actividad de ODC responde naturalmente además, a señales extracelulares de mitógenos y a cambios en la concentración celular de las poliaminas *per se* (Hoyt *et al.*, 2000).

En hongos, el metabolismo de las poliaminas juega un papel esencial durante la diferenciación. Se han reportado notables incrementos en la actividad de la ODC y en los niveles de poliaminas, precediendo los eventos de diferenciación (Inderlied *et al.*, 1980; Martinez-Pacheco *et al.*, 1989; Jiménez-Bremont *et al.*, 2001; Madrigal-Pulido *et al.*, 2011). Como se mencionó previamente, la actividad de ADC en hongos sigue siendo controversial, por lo que es posible considerar, igual que sucede con los mamíferos, que la ODC constituye la única ruta establecida para la síntesis de *novo* de las poliaminas (Pegg, 2006). Aunque la ornitina requerida para la síntesis de estos metabolitos es hecha de *novo*, la arginasa permite a las células usar la arginina como una fuente alternativa de ornitina cuando la retroalimentación negativa de este metabolito inhibe la biosíntesis de ornitina (Davis *et al.*, 1992), tal como se ilustra en la Figura 3.

La ODC es un homodímero con subunidades de 52 a 55 kDa, que presenta dos sitios activos, cada uno formado por residuos precedentes de ambas subunidades. Su secuencia es altamente conservada de hongos a humanos (Davis *et al.*, 1992). La estructura de la ODC eucariota corresponde a aquella de la familia enzimática del grupo IV de las descarboxilasas piridoxal dependientes. Se caracteriza por tener dos dominios en cada monómero. Un dominio NH₂-terminal formando un plegamiento tipo α/β barril que une al cofactor, y el dominio carboxilo terminal, el cual tiene una estructura predominantemente de tipo β plegada. El sitio activo es formado por la interface entre el dominio NH₂-terminal de una de las subunidades y el dominio COOH-terminal de la otra subunidad (Pegg, 2006).

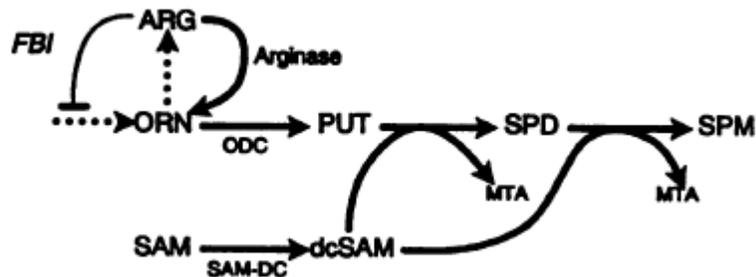


Figura 3. Modelo de biosíntesis de las poliaminas en el hongo *Neurospora crassa* (adaptado de Davis *et al.*, 1992). Las líneas punteadas indican biosíntesis endógena. En la figura: ARG, arginina; FBI, feedback inhibition (inhibición por retroalimentación negativa de la arginina sobre la biosíntesis de la ornitina); MTA, metiltioadenosina; SAM, S-adenosil metionina; ORN, ornitina; SAM-DC, SAM descarboxilasa.

La ODC es una de las enzimas más altamente reguladas de las células eucariotas (Jiménez-Bremont y Ruiz-Herrera, 2008; Davis *et al.*, 1992), lo que resulta esencial porque el exceso de poliaminas es tóxico e induce apoptosis (Packham y Cleveland, 1994; Jiménez-Bremont *et al.*, 2008). Al igual que todas las proteínas que controlan procesos celulares importantes, la ODC tiene un tiempo de vida muy corto y una tasa de degradación elevada (Li y Coffino, 1993; Liu *et al.*, 2011), lo que sugiere un balance dinámico entre la síntesis e inactivación.

El mecanismo de regulación de la ODC es único. Se sabe que en eucariotas superiores como en los mamíferos, la regulación de la expresión enzimática ocurre a nivel transcripcional, traduccional y de la vida media de la proteína y el RNA (Pendeville *et al.*, 2001). No obstante, los resultados de investigación sobre regulación transcripcional de la ODC en hongos, son contrastantes, razón por la cual se desconoce cómo ocurre la regulación a este nivel en estos organismos y si se trata o no, de un mecanismo generalizado (Jiménez–Bremont y Ruiz-Herrera, 2008).

La degradación de la ODC es el mecanismo de regulación post traduccional mejor estudiado. Se trata de una proteólisis independiente de ubiquitinación, mediada por la antienzima (AZ), una proteína inhibidora de alta afinidad por la ODC, que favorece un circuito de retroalimentación negativa: la ODC inicia la síntesis de las poliaminas; el exceso de poliaminas induce la producción de AZ quien a su vez, inhibe la actividad de la ODC y cataliza su destrucción por el proteasoma 26S (Li y Coffino, 1993).

La Az actúa entonces, como un sensor de poliaminas que se sintetiza a partir de dos marcos de lectura abiertos (ORF) sobrepuestos, a través del desplazamiento de un nucleótido específico que genera un cambio del marco de lectura (*frameshifting* +1) a nivel ribosomal, estimulado por las poliaminas, en un mecanismo inusual de inactivación y reconocimiento de la ODC, para su posterior hidrólisis por el proteasoma 26S (Chattopadhyay *et al.*, 2011). La Az genera una disrupción en la actividad de los homodímeros de ODC al unirse al sitio catalítico para constituir un heterodímero afuncional (ODC-Az). La formación de esta molécula, conduce a la exposición del dominio carboxi-terminal de la ODC, haciéndolo accesible para reconocimiento por el proteasoma; evento que sumado a la inhibición estequiométrica, disminuye el tiempo de vida media de la enzima y favorece su hidrólisis. La eficiencia de esta proteólisis, está mediada por un dominio que reside en la región N-terminal de la Az. Una vez el proteasoma procesa el complejo ODC-Az, se prosigue con la hidrólisis de ODC y subsecuente liberación de la Az, para dar continuidad al proceso regulador (Coffino, P., 2001).

La actividad inhibitoria de la Az también se lleva a cabo por modulación del transporte de poliaminas y puede ser desregulada por una proteína inhibitoria de la antienzima (AZI), a través de un mecanismo de hidrólisis dependiente de ubiquitinación, que a su vez, es regulado negativamente por las poliaminas (Palanimurugan *et al.*, 2004).

El cambio en el marco de lectura traduccional es el sensor y efector del circuito regulador de transporte y biosíntesis de poliaminas, que ha sido identificado en mamíferos, protistas y hongos, sugiriendo que su distribución obedece a la presencia de este mecanismo en el último ancestro común de las especies de tres de los cuatro reinos eucariotas (Ivanov y Atkins, 2007). En hongos, los genes de la Az se encuentran en al menos cuatro diferentes filos, a saber: Ascomycota, Basidiomycota, Glomeromycota y Zygomycota; aunque la mayoría de ejemplos corresponden a especies del filo Ascomycota (Ivanov y Atkins, 2007), donde se ubica taxonómicamente *M. phaseolina*.

2.3.3 El papel de las poliaminas en el proceso infectivo de hongos fitopatógenos

Las poliaminas tienen una multitud de funciones que afectan el crecimiento y el desarrollo; y es precisamente este efecto pleiotrópico, el que dificulta el entendimiento de los efectos fisiológicos y fisiopatológicos de la alteración del contenido celular de las poliaminas (Pegg y Casero, 2011).

El estudio de estas poliaminas en modelos fúngicos ha permitido demostrar, como en el resto de organismos vivos, que las poliaminas desempeñan un papel esencial en el crecimiento, proliferación y diferenciación celular, lo que las habilita para regular, de una u otra forma, la virulencia de hongos patógenos de plantas y animales (Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

La formación del microsclerocio por ejemplo, es un evento de diferenciación de gran importancia para la supervivencia de los hongos filamentosos, cuyo desarrollo es inducido, entre otros, por estrés oxidativo (Georgiou *et al.*, 2006). Existen reportes que demuestran la estrecha relación entre el estrés oxidativo y la diferenciación esclerótica

de hongos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia minor* (Patsoukis y Georgiou, 2006; Papapostolou y Georgiou, 2010). Diferentes estudios han revelado el papel de las poliaminas como agentes protectores frente al estrés oxidativo (Gropa *et al.*, 2001; Fujisawa *et al.*, 2005; Chattopadhyay *et al.*, 2006), demostrando la correlación directa que existe entre el número de grupos amino de sus moléculas y su poder antioxidante (Lovaas, 1991). Shapira *et al.*, en 1989, describieron que durante la formación del esclerocio de *Sclerotium rolfsii*, el nivel de poliaminas endógenas disminuye, pero incrementa durante la germinación del esclerocio y el crecimiento micelial. Lo anterior pone de manifiesto, el papel potencial de las poliaminas como moduladores de la esclerogénesis, gracias a su actividad como secuestradores de radicales libres y a su capacidad para neutralizar los procesos de peroxidación lipídica.

La formación de apresorio es otra de las características del proceso infectivo de muchos fitopatógenos, su desarrollo deriva de la formación del tubo germinal y favorece la adherencia e invasión del hospedador a través de su epidermis, coadyuvado por enzimas que hidrolizan la pared celular y favorecen el proceso invasivo (Cervantes-García *et al.*, 2003). La participación de las poliaminas en la regulación del desarrollo del apresorio ha sido estudiada en hongos como *Magnaporthe grisea* y *Uromyces viciae-fabae*. Se encontró que el uso de inhibidores de ODC, SAMDC y espermidina sintasa, puede reducir parcial o completamente la formación del apresorio por uredosporas de *Uromyces viciae-fabae*, haciendo uso de concentraciones tan bajas como 0.025mM del inhibidor de SAMDC; en general, la reducción de la formación del apresorio a las diferentes concentraciones evaluadas, osciló entre 63-100% y no se obtuvo efecto alguno sobre la germinación de las conidias (Reitz *et al.*, 1995). En el caso de *M. grisea*, se evaluó el efecto de la adición de putrescina, espermina y espermidina a nivel exógeno, sobre una suspensión de conidias; el experimento puso en evidencia la capacidad de las poliaminas para reducir el AMP cíclico, importante modulador de la formación del apresorio en este fitopatógeno, con la subsecuente inhibición de esta estructura; efecto que se revirtió al adicionar el AMPc (Choi *et al.*, 1998).

El crecimiento del micelio es un evento relacionado con los niveles endógenos de poliaminas. Estudios en *Glomus mosseae* sugieren que la concentración intracelular elevada (10mM) de estos compuestos, puede ser un factor limitante del crecimiento, o ejercer efectos estimulantes a bajas concentraciones (1mM). La toxicidad observada en esta micorriza, puede ser el resultado de la alteración de diferentes efectos fisiológicos por acumulación de poliaminas, dentro de los que se cuentan la despolarización de la membrana celular, que aumenta la fuga de cationes (K^+ , Mg^{2+}), o la acumulación de los productos de la oxidación de las poliaminas, peróxido de hidrógeno y radicales libres, que pueden tener efectos deletéreos sobre el microorganismo (El Ghachtouli *et al.*, 1996). Otros estudios han revelado el papel de la putrescina en el crecimiento del micelio de *Aspergillus flavus* (Khurana *et al.*, 1996) y en la transición dimórfica de *Yarrowia lipolytica* (Jiménez-Bremont *et al.*, 2001).

La función de las poliaminas también ha sido estudiada en otros eventos morfogénicos de los hongos, que ponen de manifiesto la actividad biosintética de estos policationes durante la elongación del tubo germinal y la germinación de esporas; se ha reportado que para el desarrollo de estos procesos, *Aspergillus flavus* requiere una alta tasa de putrescina/espermidina, mientras que la diferenciación de esporas bajo el microciclo de conidiación, se favorece con una baja tasa de putrescina/espermidina; esto revela el papel que ejerce la espermidina en los procesos de diferenciación celular y de desarrollo de las conidias bajo el microciclo de conidiación, característico de hongos de este género (Khurana *et al.*, 1996).

Así mismo, otros estudios de inhibición de la ODC en cepas no esporogénicas de *Aspergillus parasiticus* han permitido demostrar la correlación existente entre la regulación de la producción de aflatoxinas y el proceso de esporulación (Guzmán-de-Peña y Ruiz-Herrera, 1997), que está modulado a su vez, por el metabolismo de las poliaminas.

Aunque el papel de las poliaminas en los patosistemas no es comprendido del todo, existe evidencia que revela su paradójico papel en la interacción planta-hongo, ya que

actúan como moduladores del proceso invasivo del patógeno y a su vez, del mecanismo defensivo de la planta (Chibucos y Morris, 2006), constituyen un sistema finamente regulado cuya disrupción se perfila como una alternativa ideal para el desarrollo de técnicas de control de fitopatógenos. No obstante, deben investigarse las respuestas particulares de los microorganismos, ya que los resultados experimentales existentes ponen de manifiesto por una parte, la actividad de las poliaminas como promotores de eventos involucrados en la colonización del hospedero, tales como germinación de semillas, crecimiento micelial, desarrollo de apresorios y esclerocios (Rajam *et al.*, 1986; Reitz, 1995; Pieckenstain *et al.*, 2001) y del otro, su efecto inhibitorio asociado a interacciones con las cascadas de señalización dependientes de calmodulina/calcineurina y AMP cíclico, importantes para la morfogénesis, adaptación y virulencia (Choi *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

La pudrición carbonosa causada por *M. phaseolina*, es una de las enfermedades de la raíz y el tallo con gran potencial destructivo, ampliamente distribuida en las regiones donde se cultiva frijol común (*P. vulgaris* L), la leguminosa de grano de más alto consumo humano. Teniendo en cuenta que la mayor parte de la proteína consumida por la población de escasos recursos proviene de fuentes vegetales, el frijol juega un papel fundamental en la dieta humana, gracias al valor nutricional derivado de su elevado contenido proteico, de carbohidratos y minerales, especialmente hierro.

La literatura contiene numerosos informes sobre la destrucción de cultivos en múltiples hospedantes por *M. phaseolina*. Los reportes más recientes estiman pérdidas del rendimiento de hasta el 57% en Sésamo (*Sesamum indicum* L.); reducción del rendimiento de la fibra de Yute (*corchorus capsularis*) del 30% y pérdidas millonarias en plantaciones de sorgo en Estados Unidos de América. Aunque la pudrición carbonosa no es la enfermedad de mayor relevancia en *P. vulgaris*, se sabe que ésta puede causar pérdidas severas o incluso totales en las regiones áridas y semi-áridas, donde se establecen cultivos de temporal, bajo las condiciones de estrés por temperatura y sequía predominantes.

En la actualidad, poco se conoce acerca de las bases moleculares del proceso patogénico de *M. phaseolina* en *P. vulgaris* o en otros hospedantes. El estudio del patógeno ha sido abordado desde una perspectiva bioquímica, morfológica y de diversidad genética principalmente, pero es necesario dilucidar los mecanismos genéticos involucrados en la modulación de la virulencia y patogenicidad, para progresar en el manejo integral de la enfermedad.

El estudio de las poliaminas en hongos fitopatógenos por su parte, ha permitido establecer su función como reguladores de estos procesos, razón por la cual el estudio molecular de la ornitina descarboxilasa de *M. phaseolina*, la enzima limitante del

metabolismo de las poliaminas, constituye un eslabón fundamental para el entendimiento del patosistema y la formulación de estrategias de control específicas.

4. HIPÓTESIS

La ornitina descarboxilasa (ODC) de *Macrophomina phaseolina* cumple un papel esencial como factor de patogenicidad en *Phaseolus vulgaris*.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el papel de la ODC de *Macrophomina phaseolina* durante el proceso patogénico en *Phaseolus vulgaris*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar el gen de la ODC en *Macrophomina phaseolina*.
- b) Analizar las estructuras de regulación del gen de la ODC en *Macrophomina phaseolina*.
- c) Evaluar la actividad del gen de la ODC durante la patogénesis de *Macrophomina phaseolina* en *Phaseolus vulgaris*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE LA ODC EN *M. phaseolina*

6.1.1 Material biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

La cepa de *M. phaseolina* HMP05 fue obtenida de la de colección del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, proveniente de Cotaxtla, Veracruz. Para obtener cultivos puros, la cepa fue cultivada por la técnica de punta de hifa, a partir de un solo microesclerocio, utilizando el detector microbiológico Papa Dextrosa Agar (PDA). Se incubó en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 30°C, hasta evidenciar colonización completa de la caja y maduración del micelio (coloración oscura). Posteriormente se obtuvieron los microesclerocios con escalpelo estéril y se maceraron en mortero, con solución salina fisiológica. Se hicieron 3 lavados consecutivos del macerado a 3400 rpm por 30 minutos. Finalmente se resuspendió en 50mL de solución salina estéril. La suspensión de microesclerocios fue utilizada para inocular reactores con 50mL de caldo papa dextrosa (PDB), que se incubaron a 30°C, con agitación orbital (200 rpm) por 7 días. Finalizado el periodo de incubación se verificó la pureza del cultivo por observación microscópica (1000X) para confirmar la ausencia de bacterias y/u otras estructuras fúngicas contaminantes.

El micelio obtenido fue depositado en tubos Falcon de 50mL, en condiciones de esterilidad (Cabina de flujo laminar Lumistell MR LV-120 Tipo II A, Celaya, Gto, Mex). Se centrifugó a 3500 rpm por 30 minutos, se descartó el sobrenadante y se congeló a -80 °C, toda la noche. La biomasa congelada se liofilizó durante 5 días a -49 °C, con presión de vacío de 47×10^3 mbares (Freezone 12, Labconco Freeze Dry System. Labconco Co. Kansas City, MI, EUA). El producto de la liofilización fue almacenado a -80°C en el ultracongelador (So-Low Premier Freezer) hasta su uso.

Para la técnica de clonación se emplearon células competentes de *Escherichia coli* JM109 (Promega), que fueron cultivadas a 37°C en caldo y agar Luria-Bertani (Apendice), con adición de ampicilina (100mgmL⁻¹) para selección de plásmidos.

6.1.2 Análisis bioinformáticos y diseño de oligonucleótidos específicos

La identificación *in silico* del gen ODC de *M. phaseolina* así como la de *Phaseolus vulgaris* se hizo utilizando la plataforma del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Se obtuvo la secuencia de aminoácidos del gen ODC anotada para ambos organismos y se ejecutó un alineamiento en el programa Mega 5.1, utilizando el algoritmo Muscle con el propósito de identificar las regiones no homólogas más adecuadas para el diseño de los oligonucleótidos. Una vez identificadas estas regiones, se diseñaron cebadores específicos de acuerdo a los lineamientos de Dieffenbach *et al.* (1993) y Sambrook y Russell (2001). La longitud de los oligonucleótidos osciló entre 18 y 21pb, con temperaturas de fusión (T_m) superiores a 50°C. La verificación termodinámica se hizo en el programa PrimerSelect™ de DNASTAR®.

El análisis de las secuencias se hizo con ayuda de la suite bioinformática DNASTAR®. Las secuencias obtenidas (en formato .ab1) fueron visualizadas en el editor de secuencias BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) y convertidas a formato Seq en el software Lasergene EditSeq. Posteriormente, las secuencias fueron ensambladas en el programa Seqman™ de la misma suite. La secuencia consenso fue analizada en la plataforma del NCBI, con la herramienta BLASTx, buscando secuencias de proteínas no redundantes de alta similitud, tomando como parámetros de selección la cobertura, el valor de expectación y el porcentaje de identidad con las proteínas de la base de datos.

Para el modelamiento de la estructura terciaria de la ODC de *M. phaseolina* HMP05 se tradujo la secuencia nucleotídica del marco de lectura abierto aislado, utilizando el programa bioinformático Serial Cloner 2.6.1. La secuencia aminoacídica obtenida fue

utilizada para hacer el modelamiento molecular basado en proteínas homólogas incluídas en la base de datos Protein Data Bank, usando el software Modeller y el servidor I-Tasser. Para la predicción del modelo en Modeller se usó la estructura cristalográfica de la ODC del ratón (PDB7ODC_A) como molde y el servidor Anolea (<http://melolab.org/anolea/>), que permitió evaluar la calidad de los modelos obtenidos y la posterior selección del mejor de ellos, basado en cálculos de energía a nivel atómico hechos para cada uno de los 20 aminoácidos de cada una de las estructuras protéicas predichas. Así mismo se hizo el modelamiento de la proteína usando el servidor I-Tasser. Teniendo en cuenta que la ODC es un homodímero y que la estructura cristalográfica del ratón, disponible en el PDB, corresponde a uno de los monómeros, se utilizó el mejor de los modelos predichos por I-Tasser para determinar la orientación de la segunda de las cadenas. Finalmente, se superpusieron los dos modelos predichos con fines comparativos.

6.1.3 Técnicas moleculares de manipulación de ácidos nucleicos

6.1.3.1 Extracción de ácido desoxirribonucleico genómico (ADNg)

La extracción de ADN genómico de *M. phaseolina* HMP05 se realizó de acuerdo al protocolo modificado de Reader y Broda (Raeder y Broda, 1985). El micelio previamente liofilizado se pulverizó con nitrógeno líquido en un mortero estéril que se enfrió a -80°C antes de iniciar el protocolo, hasta lograr la obtención de un polvo fino. Se dispensó una cantidad aproximada de 0.4 g del pulverizado en un tubo Falcon de 15 mL estéril al cual se le adicionó 5 mL de buffer de extracción (apéndice A). La suspensión se homogenizó en agitador tipo vórtex a máxima velocidad durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 5 mL de Fenol-Cloroformo-Isoamílico (24:24:1) y se agitó en vórtex bajo iguales condiciones. La mezcla se centrifugó a 13500rpm por 30 minutos (Allegra™ 6R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA); la fase acuosa se transfirió a un tubo Falcon estéril de 15 mL y se adicionaron 4 mL de cloroformo frío. Se mezcló por 1 minutos a máxima velocidad en vórtex y se centrifugó nuevamente (13500rpm, 5 minutos). La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo

Falcon, al cual le fueron adicionados 3 mL de Isopropanol frío, mezclando por inversión ligera. La suspensión se mantuvo a -20 °C (Cool-Lab Refrigerator, Thermo Scientific) durante 1 hora. Posteriormente, se llevó a centrifugación (13500rpm por 5 minutos) y se descartó el sobrenadante.

Para secar el ADN los tubos se invirtieron sobre papel absorbente durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en 1 mL de agua desionizada estéril, se agregó 10 µL de RNasa (10 mg mL⁻¹) y se incubó durante 60 min a 37 °C en baño serológico. Se realizó una segunda limpieza del ADN agregando 5 mL de fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1) y mezclando en vórtex por 1 minuto. Después se centrifugó (5 min a 13500rpm) y se recuperó la fase acuosa, que fue precipitada con isopropanol frío, 0.6 v/v (aproximadamente 600 µL) y 1/10 volumen total de acetato de potasio 5M (aproximadamente 150 µL), se mezcló por inversión y se incubó por 30 min a -20 °C. A continuación, la mezcla fue centrifugada (13500rpm, 5 minutos), se desechó el sobrenadante y se hicieron dos lavados del sedimento con etanol al 70 %. El sedimento se secó por inversión de los tubos Falcon sobre papel absorbente, durante 30 min.

Finalmente, el ADN fue resuspendido en 200 µL de TE 1X estéril (Promega) (apendice A), volumen que fue transferido a tubos Eppendorf de 1.5 mL. La concentración del ADN extraído se estimó en gel de agarosa al 1% (disuelta en TAE 1X), cargando 3µL de la muestra, 2µL de Orange y 1µL de Sybr® Gold. Como marcador de peso molecular se usó el fago Lambda digerido con HIND III. La visualización se realizó en fotodocumentador (Gel Doc™ XR System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), empleando el software Quantity One™ Versión 4.6.7 de la compañía Bio-Rad. El ADN se almacenó a -20 °C para su posterior uso.

6.1.3.2 Reconstitución de los oligonucleótidos liofilizados

Los oligonucleótidos liofilizados (Eurofins mwglOperon, USA; Integrated ADN Technologies (IDT), USA) se centrifugaron durante 1 minuto (HermLe Z300K, Labnet International Inc. Woodbridge, NJ, USA). Posteriormente se resuspendieron en la

cantidad de agua libre de nucleasas estéril (Promega) necesaria para obtener una solución concentrada de 100 μ M (solución stock), permitiendo su hidratación en hielo durante 1 minuto. El contenido del tubo se sometió a tres ciclos de agitación en vortex, a máxima velocidad durante 1 minuto, con intervalos de reposo en hielo de igual duración, para garantizar la homogeneidad de la solución concentrada. El tubo se centrifugó durante 30 segundos para recolectar toda la solución en el fondo del vial. A continuación se tomaron alícuotas de 10 μ L de la suspensión que se diluyeron en un volumen final de 100 μ L de agua libre de nucleasas estéril (Promega), para obtener soluciones de trabajo con concentración 10 μ M de cada oligonucleótido.

6.1.3.3 Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación del gen ODC de *M. phaseolina* HMP05 por técnica de PCR se hizo con base en un protocolo de amplificación estándar incluido en los productos de Promega®, considerando la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos diseñados y la longitud teórica del gen. Las concentraciones finales utilizadas para cada uno de los componentes de reacción, en un volumen de 50 μ L, fueron las siguientes: 0.002 μ g/ μ L ADNg, 0,4 μ M de oligonucleótido sentido; 0,4 μ M de oligonucleótido reverso, 0.2 mM de cada uno de los dideoxinucleótidos (dNTPs) [10 mM], 1X de buffer de reacción [10X] (M890A, Promega®), MgCl₂ [1,5 mM] y 1.25 U de GoTaq® [5 U μ L⁻¹] (M829B, Promega®). Se utilizó agua libre de nucleasas estéril para completar el volumen final.

La reacción de PCR se llevó a cabo en tres pasos: el primero, un ciclo de desnaturalización a 95°C, durante 3 minutos; luego, un ciclo de 30 repeticiones con tres fases a saber: etapa de desnaturalización a 95°C por 1 minuto; alineamiento a 50°C por 1 minuto y una fase de extensión a 72°C durante 1 minuto; finalmente, la reacción se sometió a un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 minutos y se mantuvo en refrigeración a 4°C en el termociclador (Applied Biosystems 9800, Fast Thermal Cycler, Foster City, CA, USA). El producto amplificado se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (disuelta en TAE 1 X), cargando una alícuota de 3 μ L de producto

de PCR con Orange y Sybr® Gold. Como marcador de peso molecular se usó 1Kb ADN ladder de Promega. La observación del producto de amplificación se hizo en el fotodocumentador (Gel Doc™ XR System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) empleando el software Quantity One™ Versión 4.6.7 de la compañía Bio-Rad. Las amplificaciones obtenidas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

6.1.3.4 Limpieza de los productos de PCR

Los productos de PCR se limpiaron con el estuche comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9285, Promega®), para lo cual se adicionó un volumen de la solución de unión a membrana (Membrane Binding Solution), equivalente al del producto de PCR que se deseaba limpiar. La mezcla fue transferida a una minicolumna previamente ensamblada en un tubo colector incluido en kit, que fue incubada a temperatura ambiente durante 1 minuto. A continuación, la columna se centrifugó a 16000rpm durante 1 minuto y se descartó el fluido del tubo colector. La columna se ensambló nuevamente y se le adicionaron 700µL de solución de lavado (Membrane Wash Solution), centrifugando a 16000rpm durante 1 minuto. Se descartó el fluido del tubo colector y se hizo un segundo lavado, adicionando 500µL de Membrane Wash Solution y centrifugando a 16000rpm por 5 minutos. Se vació el tubo colector y se centrifugó la columna vacía, previamente reinsertada en el tubo colector, a 16000rpm por 1 minuto para favorecer la evaporación del etanol contenido en la solución de lavado. La minicolumna fue transferida cuidadosamente a un tubo eppendorf estéril de 1,5mL, a la cual se le adicionó 30µL de agua libre de nucleasas. La columna se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto, tiempo al cabo del cual se centrifugó a 16000rpm por 1 minuto. Se desechó la columna y se procedió a la visualización del producto purificado en gel de agarosa al 1% (disuelta en TAE 1 X), cargando una alícuota de 3 µL de producto limpio de PCR con Orange y Sybr® Gold, para su posterior observación en el fotodocumentador (Gel Doc™ XR System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) empleando el software Quantity One™ Versión 4.6.7 de la compañía Bio-Rad. Como marcador de peso molecular se usó 1Kb ADN ladder de Promega. El ADN purificado se almacenó a -20°C, hasta su uso.

6.1.3.5 Clonación

Para la clonación del gen de la ODC de *M. phaseolina* se utilizó el sistema comercial pGEM®-T Easy Vector System I (Promega USA). El amplicón se ligó al vector propio de acuerdo a las indicaciones del proveedor, así: se adicionaron 5µL de 2X Rapid Ligation Buffer, T4 ADN Ligase (1X) (C671A, Promega); 1µL del vector pGEM®-T Easy (50ng) (A137A, Promega); 1µL de T4 ADN Ligase (3 Weiss units/µl) y 150ng del producto de PCR limpio. Se empleó agua libre de nucleasas para completar el volumen final de la reacción, que fue de 10 µL. La reacción se homogenizó por pipeteo y se incubó a 4°C durante toda la noche, para aumentar la cantidad de transformantes.

Para la transformación se emplearon células competentes altamente eficientes de *Escherichia coli* (JM109 High-Efficiency Competent Cells, L2001, Promega), siguiendo un protocolo estándar, tal como se detalla a continuación. Las células competentes se removieron del ultracongelador y se mantuvieron en hielo hasta lograr su completa descongelación (aproximadamente 5 minutos). El producto de la ligación se centrifugó a máxima velocidad durante 30 segundos y se adicionó completamente a 100µL de células competentes previamente descongeladas, homogenizando la suspensión suavemente con ayuda de la pipeta. Los tubos se retornaron al hielo, donde se mantuvieron por 10 minutos. Seguidamente, las reacciones se sometieron a un choque térmico a 42°C, durante 45-50 segundos. Inmediatamente después, los tubos se regresaron al hielo y se mantuvieron en él durante 2 minutos. Trascorrido este tiempo, se adicionaron 1000µl de caldo Luria Bertani (LB) frío (ver apéndice A) al tubo de reacción y se incubó a 37°C con agitación orbital (~750rpm) durante 1 hora, en termomixer (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Trascorrido este tiempo, la reacción se centrifugó a 2500rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 200µL de caldo LB, volumen que fue sembrado en una placa de agar LB con ampicilina (100µg/mL), X-gal (1mg) e IPTG (0.01mM), previamente preparada (apéndice A). La placa inoculada se incubó a 37°C durante 12-14 horas.

El análisis de las clonas se hizo por el principio de la alfa complementación, seleccionando las colonias candidatas (colonias blancas) y resemebrándolas por estría con ayuda de un palillo de dientes estéril, a una caja de agar LB con ampicilina/X-Gal e IPTG, que se incubó a 37°C durante 12-14 horas. Transcurrida la incubación, las clonas candidatas fueron analizadas por PCR en colonia, conforme al protocolo descrito por McPherson (2001), previa siembra de soporte en 3mL de caldo LB con ampicilina. Los caldos se incubaron en agitación orbital (250rpm), a 37°C durante 12-14 horas.

6.1.3.6 Escrutinio de las clonas por PCR en colonia

Con el propósito de confirmar la presencia del inserto de interés en las clonas candidatas, se ejecutó una PCR en colonia para amplificar el marco de lectura abierto clonado. Para esto, se tomó asepticamente una porción de cada una de las colonias de interés y se depositó en un tubo eppendorf de 0,2mL, al cual se le agregó la mezcla de reactivos necesarios para la reacción, cuyo volumen final fue de 25µL. Las concentraciones finales de cada reactivo adicionado fueron las siguientes: 0,4 µM de oligonucleótido sentido; 0,4 µM de oligonucleótido reverso, 0.2 mM de cada uno de los dideoxinucleótidos (dNTPs) [10 mM], 1X de buffer de reacción [10X] (M890A, Promega®), MgCl₂ [1,5 mM], 1.25 U de GoTaq® [5 U µL⁻¹] (M829B, Promega®) y se completó al volumen final con agua libre de nucleasas estéril.

Se utilizó un programa de amplificación de 3 ciclos, a saber: ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos; Ciclo de 30 repeticiones con temperatura de desnaturalización de 95°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento de 50°C durante 30 segundos y fase de extensión a 72°C por 1 minuto; y un ciclo de extensión final, a 72°C durante 7 minutos con enfriamiento a 4°C. Los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1% (disuelta en TAE 1 X), cargando una alícuota de 3 µL de producto de PCR con Orange y Sybr® Gold. Como marcador de peso molecular se usó 1Kb ADN ladder de Promega. La observación del producto de amplificación se hizo en el fotodocumentador (Gel Doc™ XR System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) empleando el

software Quantity One™ Versión 4.6.7 de la compañía Bio-Rad. Se seleccionaron 14 clonas para secuenciar

6.1.3.7 Extracción del ADN plasmídico

Para la extracción del ADN plasmídico se empleó el estuche comercial Wizard® Plus SV Miniprep ADN purification (Promega). Se tomaron 2mL del cultivo en medio líquido de cada una de las clonas elegidas y se centrifugaron a 12000rpm por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 250µL de la solución de resuspensión, mezclando en agitador tipo vórtex hasta lograr la resuspensión de las células. A continuación, se transfirió la suspensión a un tubo eppendorf de 1.5mL estéril, y se adicionaron 250µL de solución de lisis, mezclando 4 veces los tubos por inversión. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, hasta que la solución clarificó, tiempo al cabo del cual se adicionaron 10µL de proteasa alcalina, homogenizando por inversión de los tubos en cuatro oportunidades. La mezcla se incubó por 5 minutos y posteriormente se adicionaron 350µL de solución de neutralización, mezclando inmediatamente por inversión. El lisado se centrifugó a 16000rpm por 10 minutos, a temperatura ambiente. A continuación, se transfirió el sobrenadante a una columna previamente ensamblada en un tubo colector de 2mL, incluidos en el kit. El sobrenadante fue centrifugado a máxima velocidad por un minuto y se descartó el fluido del tubo colector. La columna fue reensamblada y se le adicionó un volumen de 750µL de solución de lavado. Se centrifugó nuevamente bajo iguales condiciones y se descartó el flujo que pasó al tubo colector a través de la columna. Se repitió el procedimiento utilizando 250µL de solución de lavado y centrifugando a máxima velocidad, a temperatura ambiente durante dos minutos. La columna fue transferida a un tubo Eppendorf de 1.5mL estéril para la elución del ADN plasmídico por adición de 100µL de agua libre de nucleasas. Se centrifugó a máxima velocidad por un minuto, se descartó la columna y se procedió a la visualización y cuantificación del ADN extraído, en gel de agarosa al 1%, tenido con Sybr® Gold. Las muestras se almacenaron a -20°C, hasta su uso.

6.1.3.8 Secuenciación

Para la reacción de secuenciación del marco de lectura abierto del gen ODC de *M. phaseolina* HMP05 se utilizó el estuche comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystem (Foster City, California). A cada reacción de secuenciación se le adicionó 300ng del ADN plasmídico extraído de las clonas, 4µL de Buffer BigDye v3.1, 5X; 5µM de uno de los dos iniciadores M13 (Invitrogen); 4µL de BigDye Ready Mix y agua MiliQ estéril para completar un volumen final de 20µL. Las reacciones se mezclaron y se centrifugaron a máxima velocidad por 30 segundos.

Finalmente se llevaron al termociclador y se siguió un programa de amplificación de 2 ciclos, a saber: un ciclo inicial de 96°C por 1 minuto; un segundo ciclo de 25 repeticiones con temperaturas de desnaturalización de 96°C por 10 segundos, temperatura de alineamiento de 50°C por 5 segundos y temperatura de polimerización de 60°C por 4 minutos. La reacción se enfrió a 4°C y se procedió a la purificación de la reacción con XTerminator®, para lo cual se tomaron 10µL de la reacción de amplificación que fueron depositados en un tubo eppendorf de 0,6µL, al cual se le agregó 45µL de de solución SAM™ y 10µL de XTerminator®, previa agitación de la resina, hasta lograr su completa homogenización. Los tubos se agitaron en termomixer a 1400rpm, a temperatura ambiente, durante 30 minutos, tiempo al cabo del cual las reacciones fueron centrifugadas (12000rpm, temperatura ambiente, 2 minutos). Se tomaron 20µL del sobrenadante que fueron usados para la secuenciación con el software BigDye® Xterminator™ run module (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

6.2 ANÁLISIS DE LAS ESTRUCTURAS REGULATORIAS DEL GEN DE LA ODC EN *M. phaseolina*.

6.2.1 Material biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

El cultivo de las cepas de *M. phaseolina* HMP05 y *E. coli* JM109 se hizo de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.1.1.

6.2.2 Técnicas moleculares de manipulación de ácidos nucleicos

6.2.2.1 Extracción de Ácido Ribonucleico (RNA) de *M. phaseolina*

Para la extracción del RNA se utilizó el método TRI REAGENT® (Molecular Research Center, INC.) El tejido de *M. phaseolina* previamente congelado se retiró del ultracongelador y se maceró en mortero estéril con ayuda de nitrógeno líquido hasta la obtención de un polvo uniforme y fino. A continuación se colocaron 100 mg del pulverizado en tubos eppendorff de 1.5mL a los cuales se les adicionaron 1000 µL de Trizol® frío. Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente para favorecer la disociación del complejo de nucleoproteínas y se les adicionó 0.2 mL de cloroformo frío, agitando en vórtex por 15 segundos. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente por 3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13200 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Las fases acuosas se transfirieron a tubos eppendorff de 1,5mL con 0.5 mL de isopropanol frío al 100%, se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13200 rpm por 8 min a 4°C, descartando el sobrenadante. La pastilla de RNA se lavó con 1 mL de etanol al 75 % preparado con agua tratada con dietilpirocarbonato al 0.1 % (DEPC) (Apendice), agitando en vórtex y centrifugando a 8.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de RNA se secó por inversión de los tubos sobre papel absorbente, a temperatura ambiente, durante 10 minutos.

Finalmente, el RNA fue resuspendido en 30 μL de agua tratada con DEPC al 0.1 %, se incubó a 50°C durante 10 minutos y se almacenó a -80 °C (So-Low Premier Freezer) hasta su uso. El RNA se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (preparada en TBE 0.5 X (Apendice) con agua DEPC y tiocianato de guanidina (0.12 gramos por cada 100mL), cargando una alícuota de 4 μL de RNA previa desnaturalización por calentamiento en termobloque a 65°C durante 5 minutos, con 3 μL de Orange y 1 μL de Sybr® Gold, para su posterior observación en el fotodocumentador (Gel Doc™ XR System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) empleando el software Quantity One™ Versión 4.6.7 de la compañía Bio-Rad. La concentración y la calidad del RNA se establecieron en el espectrofotómetro (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, DE, USA).

6.2.2.2.Limpieza del RNA

Las muestras de RNA se sometieron a un tratamiento de limpieza para eliminar los restos de ADN, empleando la enzima ADNsa I (Invitrogen) De acuerdo a las instrucciones del fabricante se dispensó 1 μg de RNA en un microtubo de 0.6 mL, 1 μL de Buffer de reacción ADNsa I 10X, 1 μL de ADNsa grado amplificación 1 U/ μL y se completó con agua tratada con DEPC 0.1% hasta completar un volumen final de 10 μL . La reacción se preparó en hielo, se homogenizó con pipeta y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. La inactivación de la ADNsa I se realizó adicionando 1 μL de EDTA 25 mM e incubando por 10 minutos a 65 °C en termociclador. El RNA tratado se almacenó a -80°C hasta su uso.

6.2.2.3 Análisis RACE

Para la identificación del inicio de la transcripción (*tsp* o *tss*) y del sitio de poliadenilación del gen ODC de la cepa HMP05, se condujo un análisis RACE (Rapid Amplification cDNA Ends) con el estuche comercial SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) y el kit de polimerasa Advantage® 2 PCR Kit (Cat. Nos. 639206 & 639207). Se diseñaron

oligonucleótidos específicos: uno sentido, para amplificar la región 3'UTR, y uno reverso, para amplificar la región 5' UTR. Adicionalmente se sintetizaron dos oligonucleótidos internos para la ejecución de PCRs anidadas.

Para la síntesis de la primera hebra de ADNc, se preparó un master mix con 2.0 µl de 5X First-Strand Buffer, 1.0 µl DTT (20 mM) y 1.0 µl dNTP Mix (10 mM) por reacción. La mezcla se homogenizó con ayuda de la micropipeta, se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos y se reservó a temperatura ambiente para uso posterior. A continuación se procedió a desnaturalizar el RNA para la síntesis del ADNc correspondiente a la porción 5' y 3' del gen, utilizando 2 tubos eppendorf estériles de 0,6µL a los cuales se les adicionó 2,75 y 3,75µL de RNA tratado, respectivamente.

Seguidamente, se agregó 1µL del oligonucleótido 5'-CDS Primer A a la reacción 5' y 1.0 µl del cebador 3'-CDS Primer A al tubo de reacción para sintetizar la región 3'. El contenido de cada vial se homogenizó y se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos. Las reacciones se llevaron al termociclador para incubación a 72°C por 3 minutos, con enfriamiento posterior a 42°C durante 2 minutos. Al final del periodo de incubación se adicionó 1µL del oligo SMARTer IIA, incluido en el kit, al tubo de reacción para síntesis de la región 5'. Durante la incubación de las muestras se mezclaron en tubo eppendorf estéril, 4µL del master mix preparado previamente, 0.25 µl de inhibidor de RNasas (40 U/µl) y 1.0 µl SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U), por reacción. Se homogenizó con ayuda de micropipeta y se adicionaron 5,25µl a cada uno de los tubos que contenían el RNA desnaturalizado, logrando un volumen final de 10µL para cada reacción. El contenido de los tubos se mezcló suavemente y se centrifugó para colectar el volumen total de la reacción en el fondo del recipiente. Las reacciones se sometieron a dos ciclos de incubación a 42°C por 90 minutos y a 70°C durante 10 minutos. Finalmente, el producto de la síntesis de cada reacción fue diluído con 20µL de Tricina-EDTA Buffer. Las reacciones se almacenaron a -20°C.

Una vez sintetizadas las primeras hebras de ADNc, se procedió a la amplificación de las regiones UTR respectivas por medio de reacciones en cadena de la polimerasa,

utilizando los oligonucleótidos específicos diseñados, en combinación con el oligonucleótido universal (UMP), incluido en el kit.

Para la PCR se utilizó el estuche comercial Advantage 2 polymerase kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA), adicionando 5.0 μL de 10X Advantage 2 PCR Buffer, 1.0 μL de dNTP Mix (10 mM), 1.0 μL de 50X Advantage 2 Polymerase Mix, 5 μL de oligonucleótido universal (UMP) (10X), 1 μL de Oligonucleótido específico (10 μM) y 34.5 μL de agua grado reactivo (PCR-Grade Water), para completar un volumen de reacción final de 50 μL , de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El programa empleado para la amplificación de la región 3'UTR consistió en una PCR touchdown de cinco ciclos a saber: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos; dos ciclos de 5 repeticiones cada uno con temperaturas de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, temperaturas de alineamiento de 60 y 55°C respectivamente, por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto; un ciclo de 25 repeticiones con temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, temperaturas de alineamiento de 50°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Por último, un ciclo de extensión final a 72°C por 7 minutos. 0,5 μL del producto de PCR obtenido fueron utilizados como templado para una reacción de reamplificación utilizando el kit GoTaq® DNA polymerase (Promega) y el mismo juego de oligonucleótidos, adicionados a una concentración final de 0,4 μM ; la concentración de dNTPs utilizados fue 0,2mM; se adicionaron 10 μL de 5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer (concentración final: 1X; MgCl₂ 1,5mM); 1,25U de GoTaq® DNA Polymerase y se completó la reacción con 31,25 μL de agua para un volumen final de reacción de 50 μL . Se utilizó el mismo programa de amplificación.

El producto de PCR obtenido, fue utilizado como templado para ejecutar una reacción de PCR anidada, usando los oligonucleótidos internos diseñados para tal fin. Se empleó el kit TopTaq DNA Polymerase (Qiagen, Duesseldorf, Germany.). Las reacciones de PCR se desarrollaron de acuerdo a las instrucciones de la casa matriz, adicionando 5 μL de 10X TopTaq PCR Buffer; 1 μL de dNTP mix (10 mM de cada uno); 0,4 μM del cebador interno; 5 μL de oligonucleótido universal (UMP) (10X); 0,25 μL de TopTaq

DNA Polymerase (1,25U/reacción) y agua libre de nucleasas para un volumen final de 50µl por reacción. Los productos obtenidos se visualizaron en gel de agarosa al 1% (disueltos en TAE 1X), cargando 3µL de la muestra, 2µL de Orange y 1µL de Sybr® Gold, para su posterior observación en el fotodocumentador (Gel Doc™ XR System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) empleando el software Quantity One™ Versión 4.6.7 de la compañía Bio-Rad. El producto de PCR fue limpiado con el estuche comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9285, Promega®), de acuerdo a las especificaciones del numeral 5.1.6 y secuenciado directamente, con base al protocolo descrito en el numeral 5.1.10 de este apartado. Para la secuenciación se utilizó el oligonucleótido interno diseñado para el análisis.

La amplificación de la región 5'UTR se hizo siguiendo un esquema similar al descrito para la región 3'UTR. Se utilizó un programa de amplificación touchdown con cinco ciclos a saber: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos; dos ciclos de 5 repeticiones cada uno con temperaturas de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, temperaturas de alineamiento de 70 y 65°C respectivamente, por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto; un ciclo de 25 repeticiones con temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, temperaturas de alineamiento de 60°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Por último, un ciclo de extensión final a 72°C por 7 minutos. A continuación se procedió a hacer una PCR anidada, utilizando 1µL del producto de PCR como templado, el oligonucleótido interno diseñado para tal fin (concentración final: 0,4µM) junto con el cebador universal UMP 10X (2,5µl adicionados). Para la PCR se empleó el kit TopTaq DNA Polymerase adicionando los dNTPs a una concentración de 10 mM de cada uno; se agregaron 2,5µL de 10X TopTaq PCR Buffer y 0,625U de TopTaq DNA polimerasa. Se empleó agua libre de nucleasas para completar un volumen de 25µL por reacción.

La PCR anidada se ejecutó bajo un programa de amplificación touchdown de 5 ciclos: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos; dos ciclos de 5 repeticiones cada uno con temperaturas de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, temperaturas de alineamiento de 72 y 67°C respectivamente, por 30 segundos y extensión a 72°C por

1 minuto; un ciclo de 30 repeticiones con temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento de 62°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Por último, un ciclo de extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos se visualizaron en gel de agarosa 1%, con ayuda de fotodocumentador (Gel Doc™ XR System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) empleando el software Quantity One™ Versión 4.6.7 de la compañía Bio-Rad. Los productos de amplificación fueron purificados a partir de un gel preparativo de agarosa al 0,8%, con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9285, Promega®), se clonaron y se secuenciaron con los cebadores M13, de acuerdo a las especificaciones de los numerales 6.1.3.5 al 6.1.3.8.

6.2.2.4 Confirmación de la secuencia intrónica del gen ODC aislado

Con el objetivo de confirmar la existencia de la secuencia intrónica descrita para el gen ODC de la cepa MS6 del banco de datos del NCBI en la cepa HMP05, se utilizó el ADNc sintetizado para el análisis 3'RACE para amplificar la región correspondiente y verificar la posición de dicho intrón en la cepa de interés. Se utilizaron los oligonucleótidos RT248F y ODCR. La reacción de amplificación se hizo en un volumen de 50µL, utilizando el protocolo del kit TopTaq DNA Polymerase (Qiagen, Duesseldorf, Germany). Se adicionaron 2µL del producto de amplificación del ensayo 3'RACE como templado, 5µL de 10X TopTaq PCR Buffer; 1µL de dNTP mix (10 mM de cada uno), 2µL de los cebadores a una concentración 10µM y 1.25U de TopTaq DNA Polymerase. Se hizo una amplificación touchdown con 5 ciclos, así: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 1 minuto; dos ciclos de 5 repeticiones cada uno con temperaturas de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, temperaturas de alineamiento de 60 y 55°C respectivamente, por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos; un ciclo de 30 repeticiones con temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento de 50°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos.

El producto de PCR fue visualizado en gel de agarosa 1.5%, tenido con Sybr® Gold con ayuda de fotodocumentador (Gel Doc™ XR System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) empleando el software Quantity One™ Versión 4.6.7 de la compañía Bio-Rad. El

amplificón se purificó por medio del estuche comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9285, Promega®) y se secuenció directamente, de acuerdo a lo especificado en el numeral 6.1.3.8, utilizando los mismos cebadores para la secuenciación. Para el ensamble y análisis de la secuencia se utilizó el paquete bioinformático DNASTAR® y se alinearon con Mega 6.06 para evaluar la similitud con las secuencia reportada en el banco de datos.

6.2.2.5 Análisis bioinformáticos y diseño de oligonucleótidos

La construcción del gen ODC se logró ensamblando la secuencia consenso del ORF de la ODC de la cepa HMP05 con las regiones consenso UTR identificadas en el análisis RACE. El ensamble se hizo en el paquete informático SeqMan de la suite DNASTAR® Lasergene.

Para el análisis de la región promotora del gen ODC de la cepa HMP05 se diseñó un par de oligonucleótidos que permitió la amplificación de 1123pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen (TSS) y 462pb aguas abajo, tomando como referencia la secuencia anotada en la base de datos del NCBI y en www.jutegenome.org. El diseño de los cebadores, así como la verificación termodinámica se hizo de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.1.2. El fragmento amplificado fue limpiado, clonado y secuenciado de acuerdo a lo especificado en los apartados 6.1.3.5 - 6.1.3.8.

La secuencia consenso se comparó con el banco de datos del NCBI a través de un análisis BLASTn y fue alineada con la región correspondiente de la cepa MS6 del banco de datos para confirmar su identidad, usando el paquete informático Serial Cloner 2.6.1.

Para el análisis *in silico* basado en dominios de unión a factores de transcripción (TFBSs) se consideraron las 1288pb ubicadas aguas arriba del codón de inicio de la traducción. La predicción de TFBSs de la secuencia se hizo con la base de datos Transfac®, versión 2014.3, utilizando la herramienta de búsqueda basada en matrices de peso Match™. El análisis se restringió a perfiles fúngicos, utilizando únicamente

matrices de alta calidad. La secuencia fue analizada estableciendo puntos de corte para minimizar falsos positivos, falsos negativos y para minimizar la suma de ambos errores. Así mismo, se hizo la evaluación estableciendo como punto de corte de similitud de la matriz 0,86 y 0,96 para la similitud con el CORE (núcleo de la matriz compuesto por una secuencia consenso de 5 nucleotidos en este banco de datos).

La región promotora fue analizada a su vez en la base de datos de perfiles de sitios de unión a factores de transcripción Jaspar (<http://jaspar.genereg.net>), utilizando la colección de datos para hongos *Core fungi* disponible en la plataforma, la cual incluye perfiles de TFBSs curados, no redundantes, basados en evidencia experimental. Se usó un umbral de predicción del 86%.

Las predicciones obtenidas por los distintos tipos de análisis en las dos plataformas bioinformáticas elegidas fueron comparadas entre sí y solo se consideraron para el análisis aquéllos TFBSs predichos por al menos uno de los algoritmos de las 2 bases de datos empleadas.

6.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL GEN DE LA ODC DURANTE LA PATOGÉNESIS DE *M. phaseolina* EN *P. vulgaris*

6.3.1 Material biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

6.3.1.1 Preparación de inóculos para ensayo de interacción *M. phaseolina*-*P. vulgaris*

La cepa HMP05 se cultivó en 200mL de caldo de Czapek Dox (BD Bioxon) (apéndice A) a partir de una suspensión de microesclerocios preparada de acuerdo a las especificaciones detalladas en el numeral 6.1.1. El reactor inculado fue incubado a 30°C, con agitación orbital (200 rpm), durante 5 días, tiempo al cabo del cual se hicieron 2 pases consecutivos, inoculando reactores con 400mL de caldo de Czapek Dox al 10% e incubando bajo iguales condiciones para garantizar que la poza de poliaminas de la cepa alcanzara sus niveles basales. Finalizado el tiempo de incubación, el volumen

cultivado fue distribuido en tubos Falcon de 50mL estériles que se centrifugaron a 3400 rpm por 15 minutos. Se hicieron 2 lavados consecutivos de la biomasa con solución salina fisiológica. La biomasa se maceró en mortero, en condiciones de esterilidad y se resuspendió en 50mL de solución salina 0,85%. La concentración del inoculo se verificó por recuento en placa, utilizando PDA como detector microbiológico. Se hicieron 3 diluciones seriadas (1:10), utilizando solución salina fisiológica como diluyente. Se sembraron 100 µL de cada dilución en la superficie del medio de cultivo utilizando perlas de vidrio estériles para lograr una distribución homogénea. Se incubó a 30°C durante 48 horas, tiempo al cual se contaron las colonias. El procedimiento se hizo por triplicado.

6.3.1.2 Desinfección de semillas de *P. vulgaris*

Para el experimento de interacción se seleccionaron dos variedades de *P. vulgaris*, a saber: var. Pinto saltillo y var. Negro Jamapa, genotipos susceptibles y resistentes a la infección por *M. phaseolina*, respectivamente (Mayek-Pérez et al, 2001).

Las semillas de frijol se lavaron con agua de la llave y jabón, agitando manualmente durante 5 minutos para eliminar los residuos de tierra del tejido vegetal. Posteriormente, las semillas de cada variedad fueron depositadas en vasos de precipitado estériles de 250 mL a los que se les adicionó etanol al 70%. Las semillas se mantuvieron sumergidas en el alcohol durante 30 segundos, tiempo al cabo del cual se ejecutaron 4 lavados consecutivos con agua desionizada estéril. A continuación, las semillas fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 3% durante 8 minutos. Seguidamente, las semillas se lavaron con agua desionizada estéril y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio 0,5% v/v (Cloralex®) y Tween 20 al 0,2% durante 10 minutos. Se hicieron 4 lavados con agua desionizada estéril, agitando manualmente para garantizar la remoción total del hipoclorito de sodio y el detergente. Finalmente, las semillas se colocaron en una solución de ácido cítrico (150 mg/L) y ácido ascórbico (100 mg/L), por cinco minutos (para evitar la oxidación). La solución fue decantada y con ayuda de pinzas estériles, las accesiones de cada variedad fueron depositadas sobre papel absorbente estéril, en donde permanecieron hasta el momento de la siembra. El procedimiento de desinfección de las semillas se llevó a cabo dentro de la campana de flujo laminar (Modelo LV-120, Lumistell®).

6.3.1.3 Germinación de semillas de *P. vulgaris*

Una vez culminado el proceso de desinfección de las semillas de *P. vulgaris*, se dio paso al proceso de germinación, para lo cual se utilizaron frascos de propileno estériles de 105mm de alto por 55mm de ancho, con 30mL de medio de cultivo sólido MSO (Murashige y Skoog, 1962) (apéndice A). Se germinó una semilla por frasco y se incubaron a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una intensidad lumínica de 1000 lux (lámparas fluorescentes blancas), durante 21 días. Estas condiciones garantizaron que todas las unidades experimentales al final del periodo de incubación, hubieran alcanzado la fase de crecimiento V3 y evidenciaran producción de raíz abundante.

6.3.1.4 Condiciones experimentales de la interacción planta-hongo

Para el establecimiento de la interacción se definió como unidad experimental una plántula de *P. vulgaris* de las variedades Pinto Saltillo o Negro Jamapa, germinadas bajo las condiciones antes descritas. Las plántulas fueron transplantadas a frascos de propileno con 10mL de medio de cultivo líquido MSO, previa inmersión de la raíz en agua destilada estéril para remoción de los residuos de agar adheridos al tejido radicular. Inmediatamente después, se adicionaron $1,3 \times 10^4$ UFC de *M. phaseolina* a cada unidad experimental. Como testigos del experimento se inocularon frascos con 10mL de medio líquido MSO, bajo iguales condiciones. Se consideraron 5 repeticiones para cada tratamiento. Las interacciones y controles se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una intensidad lumínica de 1000 lux, durante 54 horas. Se tomaron muestras cada 6 horas, a partir de las 18 horas del establecimiento de la interacción. El muestreo se hizo al azar, elaborando una tabla de números aleatorios en el programa Excel (Microsoft Office 2010).

La recolección de las muestras se hizo con escalpelo estéril, teniendo especial predilección por aquellas zonas de la planta donde se evidenciaron más francamente los síntomas de la infección. El material recolectado se dispensó inmediatamente en tubos de 50 mL estériles que fueron sumergidos en nitrógeno líquido para una rápida congelación. Posteriormente,

las muestras fueron almacenadas en el ultra-congelador (So Low PV8521, Environmental Equipment, Cincinnati, OH, USA) a -80°C, hasta su procesamiento. Para el caso de los controles, el micelio fue recuperado por centrifugación a 3500 rpm, 4°C por 15 minutos. Se ejecutó un lavado de la biomasa recuperada con Agua miliQ estéril tratada con DEPC 0,1% (Apendice), bajo iguales condiciones. El micelio fue depositado en tubos Falcon estériles de 15mL, congelados por inmersión en nitrógeno líquido, y almacenados en ultracongelación, junto con las muestras de las unidades experimentales correspondientes.

6.3.1.5 Evaluación del impacto de la inhibición química de la ODC sobre el crecimiento vegetativo de *M. phaseolina*

Para evaluar el efecto de la inhibición química de la ODC sobre el crecimiento vegetativo de *M. phaseolina* se seleccionó el compuesto 1,4-diamino-2-butanona dihidrocloruro (DAB) (Sigma-Aldrich co.), un inhibidor competitivo de la ODC. Se definieron tres concentraciones de prueba, a saber: 1mM, 5mM y 10mM, teniendo en cuenta los reportes bibliográficos precedentes. Para el desarrollo de la prueba se cultivó la cepa HMP05 en agar Czapek- Dox, incubando a 30°C hasta evidenciar colonización completa de la caja y maduración del micelio. Se hicieron 3 pases consecutivos para garantizar que la reserva metabólica de poliaminas se encontrara en sus niveles basales. Para la preparación de los detectores microbiológicos suplementados con la concentración del inhibidor correspondiente, se preparó una solución stock 100mM de DAB en Buffer fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich Co.) (Apéndice A), que fue almacenada a -20°C.

Se realizaron cinéticas de crecimiento en placa para cada uno de los tratamientos, inoculando cada caja de agar con un disco de 6 mm de diámetro, tomado del borde de la colonia del hongo, cultivado de acuerdo a lo descrito anteriormente. El disco se posicionó en el centro de las cajas de Petri, que fueron selladas con Parafilm® e incubadas durante 116 horas, a 30°C. La medición del diámetro de la colonia se realizó en dos sentidos perpendiculares, a intervalos de 8 y 12 horas. Cada pareja de datos se promedió y los resultados se analizaron estadísticamente en el programa SPSS 15.0 para Windows. La tasa de crecimiento se determinó con la fórmula: Tasa de crecimiento= (diámetro al final del período de mayor crecimiento-Diámetro inicial del período de mayor crecimiento)/N° de

horas del período. Se establecieron 4 repeticiones por tratamiento. Se incluyeron dos tratamientos adicionales para evaluar la capacidad inhibitoria del vehículo de resuspensión, utilizando 5 y 10mL de PBS (cantidades adicionadas a los medios de cultivo utilizados para la evaluación del DAB a 5 y 10mM, respectivamente). Como testigo del experimento se ejecutó una cinética en agar Czapek-Dox, a iguales condiciones.

6.3.2 Análisis bioinformáticos y diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos y sondas TaqMan® para el análisis de expresión en tiempo real (RT qPCR) se llevó a cabo con ayuda de la herramienta en línea Custom TaqMan® Assay Design Tool (Applied Biosystems®).

Se eligió como control de los ensayos de expresión el gen constitutivo GAPDH de *M. phaseolina*, que codifica para la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.

Las secuencias de los ensayos TaqMan® diseñados para detección del gen ODC fueron las siguientes: cebador sentido: 5'CGGGCCGCTTCATGGT 3'; Cebador reverso: 5'ACCTCCGCGACGTGATG 3' y sonda: 5'CAACAGCGCCTTCACG 3'. Las secuencias sentido: 5'GACAAGTACGGCATCGTTGAG 3'; la reversa: 5'GGTCTTCTGGGTAGCAGTGT 3'y la sonda: 5'ACCACCGTCCACTCCT 3' fueron sintetizadas para evaluar la expresión del gen GAPDH en el experimento. Las sondas fueron marcadas en el extremo 5' con el colorante 6-carboxi-fluoresceína (FAM) y en el extremo 3' con el desactivador no fluorescente (NFQ) (Applied Biosystems®).

6.3.3 Técnicas moleculares de manipulación de ácidos nucleicos

6.3.3.1 Extracción de RNA total de *M. phaseolina*, *P. vulgaris* y de la interacción planta-hongo

El tejido extraído de las pruebas de interacción de *M. phaseolina* con *P. vulgaris*, así como aquél de los controles, fue macerado con ayuda de nitrógeno líquido hasta la

obtención de un polvo uniforme y fino. La extracción del RNA se hizo de acuerdo al protocolo del estuche comercial MagMAX™ -96 Total RNA Isolation Kit (Life Technologies), en procesador de partículas magnéticas Thermo Eletron's KingFisher (Thermo Scientific) para lo cual se pesaron 10mg del pulverizado en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL, que fueron homogenizados con 100µl de la solución de lisis incluida en el kit, preparada previamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante (apéndice A). A continuación, el lisado fue centrifugado a 1000 x g durante 10 min a temperatura ambiente (Hermle Z400K, labnet) con el fin de remover el detritus insoluble. Se transfirieron 50µL del sobrenadante obtenido por muestra homogenizada a cada uno de los 12 pozos de las placas de procesamiento (identificados como fila A), adicionando a continuación, 35µL de isopropanol al 100% y 20µL de Bead mix (apéndice A) por reacción. Seguidamente se adicionaron los volúmenes requeridos de cada una de las soluciones necesarias para la ejecución del protocolo en los pozos de las filas correspondientes de las placas de procesamiento, así: 150µL de solución de lavado 1, en la fila B; 150µL de solución de lavado 2, en la fila C; 50µL de TURBO DNAsa diluída, en la fila D (apéndice A); 150µL de solución de lavado 2 en las filas E y F y 50µL de buffer de elución, en la fila G. Una vez se cargaron las placas, se introdujeron en el procesador KingFisher, usando el programa MagMAX™ Total. Finalizado el tratamiento con la TURBO DNAsa se adicionaron manualmente 100µL de Rebinding solution por cada pozo de reacción. La placa se insertó nuevamente en el KingFisher y se continuó con el procesamiento automatizado. Finalmente el RNA extraído de cada espécimen fue recuperado en el buffer de elución que fue transferido a tubos eppendorf de 0.6µL libres de nucleasas y almacenado -80°C (So-Low Premier Freezer) hasta su uso.

El mismo protocolo fue utilizado para extraer RNA de las dos variedades de frijol incluidas en el estudio con el fin de probar la especificidad de los ensayos de expresión diseñados.

La visualización y verificación de la integridad del RNA total extraído se hizo en gel de agarosa al 0,8 % (preparada en TBE 0.5X (apéndice A), con agua DEPC y tiocianato de

guanidina (0.12 mg por cada 100mL)), teñido con PAGE GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, USA). Se cargó una alícuota de 1 µL de RNA con 2 µL de Orange, para su posterior observación en el fotodocumentador (Gel Doc™ XR System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) empleando el software Quantity One™ Versión 4.6.7 de la compañía Bio-Rad. La concentración y la calidad del RNA se establecieron en el espectrofotómetro (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, DE, USA).

6.3.3.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis de ADNc se hizo con el estuche comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems P/N 4375222). De acuerdo a las instrucciones del fabricante se preparó una mezcla concentrada 2X con todos los componentes de la reacción de retrotranscripción (para 20µL: 2µL de 10X RT Buffer; 0,8µL de 25X dNTP mix (100mM); 2µL de 10X Random primers; 1µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase y 4,2µL de agua libre de nucleasas (P119A, Promega®)), con excepción del RNA, que se adicionó al final, a cada pozo de reacción, en un volumen de 10µL. Se partió de 150ng de RNA en todos los casos. Se incluyeron dos controles negativos a saber: el primero consistió en una reacción réplica de una muestra (elegida al azar) por cada tratamiento, pero sin adición de la MultiScribe™ Reverse Transcriptase; y un control sin RNA. Las reacciones se llevaron al termociclador y se sometieron al siguiente programa de incubación: 10 min a 25°C; 120min a 37°C y 5 min a 85°C. Finalmente, se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.3.3.3 Cuantificación de la expresión del gen de la ODC de *M. phaseolina* por RT-PCR en tiempo real (RT qPCR)

La cuantificación del gen ODC de *M. phaseolina* se hizo amplificando 2µL de ADNc (1/10 parte del rendimiento total del ADNc obtenido de 150ng de RNA) utilizando el kit comercial TaqMan® Universal PCR Master Mix ((P/N 4304437; Applied Biosystems, Foster City, CA), en el sistema de detección en tiempo real StepOne™ Real Time PCR System (Life Technologies). La RT PCR en tiempo real se llevó a cabo en un volumen

de reacción de 20 μ L, adicionando 10 μ L de TaqMan® Universal PCR Master mix (2X); 1 μ L de TaqMan® Gene Expression Assay (20X) para detección de ODC y/o GAPDH y 7 μ L de agua libre de nucleasas. Se utilizó un programa de amplificación estándar que consistió en un ciclo de incubación a 50°C durante 2 minutos, para garantizar la actividad de la enzima AmpErase® uracil-N-glycosylase (UNG), incluida en el master mix; a continuación se ejecutó un ciclo de incubación a 95°C durante 10 minutos para inactivación de la UNG y activación de la enzima DNA polimerasa AmpliTaq Gold. Finalmente se ejecutó un ciclo de 40 repeticiones con temperaturas de desnaturalización de 95°C durante 15 segundos y temperatura de alineación/extensión de 60°C por 1 minuto. El ciclo umbral o CT (número de ciclos de PCR requeridos para que la fluorescencia emitida por las sondas TaqMan® cruce el umbral de detección, indicando la existencia de incremento significativo de la fluorescencia) fue obtenido con el programa StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se cuantificó el gen ODC y el GAPDH en cada una de las muestras, por duplicado. Adicionalmente, se incluyó un control negativo (sin adición de ADNc) para cada set de muestras procesadas, el cual también fue analizado por duplicado.

Para evaluar la especificidad de los oligonucleótidos y sondas diseñadas se probaron los ensayos TaqMan® utilizando ADNc sintetizado bajo iguales condiciones, a partir de RNA proveniente de las dos variedades de frijol incluidas en el estudio. Así mismo se seleccionaron muestras de RNA que exhibieron residuos de ADNg luego del tratamiento con la Turbo DNAsa, y muestras aparentemente libres de ADNg, que fueron utilizadas para ejecutar una reacción de síntesis de ADNc sin adición de la Transcriptasa reversa. El producto de estas reacciones se analizó por tiempo real, junto con aquél resultante de las reacciones positivas, que se lograron adicionando todos los componentes necesarios para la síntesis del ADNc, a partir de las mismas muestras seleccionadas.

Con el fin de validar el rango dinámico de detección se procesaron muestras escogidas al azar, provenientes de la interacción en tres tiempos distintos de la cinética ejecutada y una muestra de ADNc sintetizado a partir de RNA extraído de biomasa de *M.*

phaseolina, cultivada bajo condiciones inductoras de la ODC (cultivos sucesivos en medio mínimo para deprivar la reserva metabólica de poliaminas).

Posteriormente se ejecutaron preamplificaciones de las muestras analizadas por RT-qPCR con el propósito de validar el mismo rango de cuantificación para el gen constitutivo y el gen ODC, debido a diferencias significativas detectadas en el nivel de expresión de ambos genes. Para la reacción de preamplificación se utilizaron 2 µL del ADNc sintetizado en cada uno de los casos; 1 µL del ensayo de detección de la ODC TaqMan® Gene Expression Assay (20X); 0,4 µL de dNTPs (10 mM); 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM); 4 µL de buffer de reacción [10X] y 0,1 µL de GoTaq® Polimerasa [5 U µL⁻¹]. Se utilizó agua libre de nucleasas para completar el volumen final de la reacción que fue 20 µL. La reacción de preamplificación se llevó a cabo en tres pasos: el primero, un ciclo de desnaturalización a 95 °C, durante 30 segundos; luego, un ciclo de 10 repeticiones con tres fases a saber: etapa de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos; alineamiento a 60 °C por 30 segundos y una fase de extensión a 72 °C durante 30 segundos; finalmente, la reacción se sometió a un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 minutos y se mantuvo en refrigeración a 4 °C. Como control de la reacción se preamplificó un producto de síntesis de ADNc sin adición de enzima Transcriptasa reversa. Finalizado el proceso de preamplificación se ejecutó la cuantificación de la expresión por tiempo real, adicionando 1 µL del producto de preamplificación obtenido, como templado de la reacción. La RT-qPCR se ejecutó de acuerdo a las condiciones descritas previamente.

En todos los casos la expresión de la ODC fue cuantificada con el método comparativo Ct o $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando la expresión del gen GAPDH como normalizador.

6.3.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos del ensayo de inhibición química de la ODC con DAB, se hizo bajo el modelo de dos factores con medidas repetidas en un factor, utilizando el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows.

7. RESULTADOS

7.1 IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE LA ODC EN *M. phaseolina*

La búsqueda de la proteína ODC en el genoma de *M. phaseolina* MS6, disponible en el banco de datos del NCBI reveló la presencia de una región de 945pb que codifica para una proteína de 295 aminoácidos, identificada con el número de acceso: EKG12492.1. Se identificó la presencia de un intrón de 57pb, ubicado 775pb abajo del codón de inicio de la traducción (Figura 4).

A partir de la secuencia anotada se diseñó el par de oligonucleótidos ODCF y ODCR (Cuadro 1) que permitió la amplificación por PCR de un fragmento de 945pb, que de acuerdo a los datos de anotación obtenidos del NCBI, corresponde al ORF del gen ODC en *M. phaseolina* (Figura 5A). La secuencia del gen se comparó con la base de datos de proteínas del NCBI, a través de un análisis Blastx, que reveló identidad y cobertura de la secuencia del 99% con la proteína ODC de la cepa MS6 (E-valor: 0,0) (Figura 5C). No obstante, se evidenció que el tamaño del segmento aislado es considerablemente menor al de otras ODC reportadas en hongos (Figura 5B), razón por la cual se hizo necesaria la identificación del inicio de la transcripción.

Cuadro 1. Características de los iniciadores utilizados para la amplificación de ODC por PCR

NOMBRE	SECUENCIA	T _m (°C)	%GC	TAMAÑO (pb)	AMPLICIÓN ADNg	AMPLICIÓN RNA
ODCF	ATGACGTTGACAACGCC	55.8	55.5	18	945pb	888pb
ODCR	TCAGTTCCAATCTCCATCC	51.4	47.3	19		
ODCRT113F	CATATACAAGATGTAGCACTA	46.6	33.3	21	113pb*	113pb*
ODCRT248F	TTATCCAGTCGGCTGAAAG	51.9	47.3	19	305pb*	248pb*
ODC5RACE	CGTGTCGTTCCACGTGGGC	66.6	68.4	19	1585pb	1585pb
pODCF	CAAGCTCGGCAAAGGCCAG	58,1	63,2	19		
ATGnODC	ATGGGCATTGACCCCAGC	62.2	61.1	18	1035pb*	978*

*tamaño del amplicón cuando el oligonucleótido se usa en combinación con el ODCR.

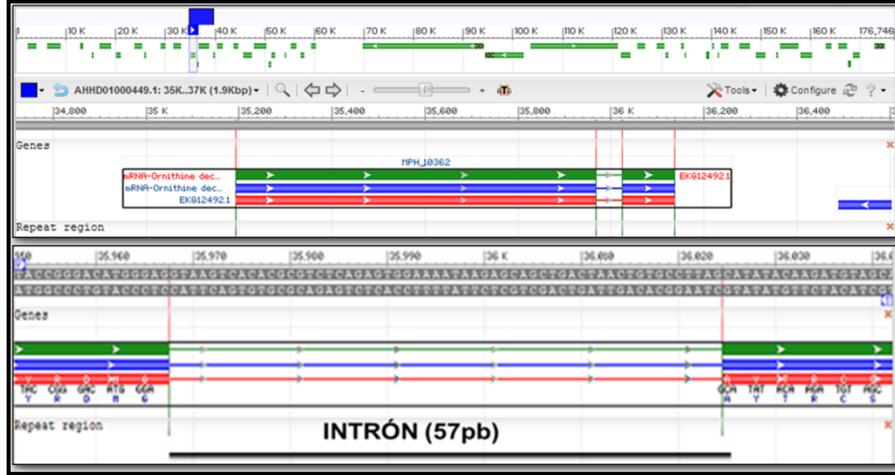


Figura 4. Representación esquemática del gen ODC en el genoma de *M. phaseolina* MS6. Se identificó una región en la posición 35193-36137 que corresponde al gen ODC de *M. phaseolina* MS6, el cual tiene un intrón de 57 pb ubicado entre las posiciones 35967 - 36025 del genoma de la cepa.

7.2 ANÁLISIS DE LAS ESTRUCTURAS REGULATORIAS DEL GEN DE LA ODC EN *M. phaseolina*

Se ejecutó el análisis RACE para determinar la localización del TSS y del sitio de poliadenilación. Como oligonucleótidos específicos se utilizaron los cebadores sentido RT248F y RT113F y los antisentido ODCR y ODC5RACE, cuyas secuencias se muestran en la Cuadro 1. De acuerdo a los resultados del experimento fue posible determinar que el inicio de la transcripción tiene lugar en el nucleótido guanina, ubicado 166pb arriba del codón de inicio de la traducción, que se ubica 90 pares de bases antes del ATG putativo predicho para la cepa MS6 en el banco de datos del NCBI. Por tal razón, se diseñó el iniciador ATGnODC (Cuadro 1), que en combinación con el ODCR, permitió la amplificación, clonación y secuenciación de esta región (Figura 6A).

Este hallazgo permite predecir una proteína de 325 aminoácidos con una masa molecular de 35.43kDa y un punto isoeléctrico de 5,64, que exhibe un porcentaje de identidad del

99% y una cobertura del 90% con la ODC de *M. phaseolina* MS6 (E-valor: 0,0) (figura 6B). La proteína predicha además, reveló un elevado grado de similitud con ODCs de otros hongos: 82% con la proteína hipotética de *Neofusicoccum parvum* (E-valor: 6e-177); 53% con la proteína putativa de *Podospora anserina* (E-valor: 1e-93) y *Myceliophthora thermophila* (valor-E: 3e-92); 52% con la proteína hipotética de *Chaetomium globosum* (valor-E: 2e-93) y con la ODC de *Ophiocordyceps sinensis* (Valor-E: 6e-90); 51% con *Metarhizium anisopliae* (valor-E: 4e-90) y *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* (E-valor: 5e-89); así como también con las proteínas hipotéticas de *Thielavia terrestris* (valor E: 1e-90) y *Phaeosphaeria nodorum* (valor-E: 2e-90) (Figura 7).

La búsqueda de dominios putativos conservados por comparación con la base de datos CDD (Conseved Domain Database) disponible en la plataforma del NCBI permitió detectar la presencia del dominio PLPDE_III_ODC (E-valor: 4.16e-68), identificado con el número de acceso: cd00622, que corresponde a una subfamilia de enzimas ornitina descarboxilasas dependientes de piridoxal fosfato tipo III (PLP) (Figura 6C).

El análisis de la secuencia aminoacídica en la base de datos PROSITE (<http://prosite.expasy.org>) permitió la identificación del motivo canónico [GSA]-x(2,6)-[LIVMSCP]-x-{N}-[LIVMF]-[DNS]-[LIVMCA]-G(3)-[LIVMFY]-[GSTPCEQ], ubicado entre los residuos aminoacídicos 122 y 139; no se encontró el sitio consenso [FY]-[PA]-x-K-[SACV]-[NHCLFW]-x(4)-[LIVMF]-[LIVMTA]-x(2)-[LIVMA]-x(3)[GTE], de unión al cofactor piridoxal fosfato. Sin embargo, como ya se describió, el análisis de la secuencia en la base de datos CDD del NCBI, predice una región de unión al cofactor, ubicada entre los residuos nucleotídicos 4-528pb del CDS (Valor E: 1.15e-27). Se identificaron también, siete motivos putativos PEST (señales de degradación proteolítica característicos de proteínas de alto recambio (Rechsteiner y Rogers, 1996)), usando el algoritmo epestfind implementado por la herramienta homónima disponible en la suite EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite). Estas regiones fueron predichas con puntuaciones muy bajas, a saber: se predijeron secuencias PEST

entre los residuos 236 y 250; 305 y 325; 190 y 203; 203 y 229; 251 y 285; 130 y 166; 54 y 69, con puntajes de -3.40, -8.48, -9.69, -9.75, -10.15, -15.87 y -20.84, respectivamente (Figura 7).



Figura 5. Amplificación del gen ODC en la cepa *M. phaseolina* HMP05 por PCR y análisis de homología. A: se presenta el negativo del gel de agarosa resultante de la amplificación de un fragmento único de 945pb (carril 2). En el carril 1 se aprecia el marcador de peso molecular 1Kb de Promega. B y C: resultados del análisis de la secuencia aislada con la herramienta BLASTx. El recuadro B destaca en un círculo rojo las posiciones en donde comienza la homología con las secuencias del banco de datos, que revelan el menor tamaño de la ODC de la cepa HMP05. Se identificó una

sustitución de una isoleucina por una valina en la cepa HMP05, que se enmarca en el alineamiento del panel C con una caja roja.

Otro de los análisis ejecutados sobre la secuencia polipeptídica se llevó a cabo en el programa WoLF PSORT para determinar la posible localización de la ODC en la célula. Los resultados indican una probable localización de la enzima en el citoplasma (26%), núcleo (3,7%), mitocondrial (29,6%), peroxisomas (3,7%) y extracelular (37%).

La secuencia aminoacídica predicha se utilizó además, para hacer el modelamiento molecular basado en proteínas homólogas incluidas en la base de datos Protein Data Bank (PDB). El modelo fue construido usando la estructura cristalográfica de la ODC de ratón (PDB70DC_A), con quien reveló homología del 42% (E-valor: $2e-80$) y 96% de cobertura de la secuencia. Se seleccionó el mejor modelo con ayuda del programa Anolea, el cual exhibió un valor RMS de 1,124. Los modelos predichos en I-tasser en su mayoría utilizaron la cadena A de la ODC de *Leishmania donovani* (PDB2oo0A) como templado. Se eligió el modelo que mostró mejor índice C-score, que fue de 1,17. Teniendo en cuenta que la ODC es un homodímero y que las estructuras modeladas por ambas plataformas bioinformáticas corresponden a una sola de las cadenas, se utilizó el templado PDB2oo0, cuyos monómeros están disponibles en el PDB para determinar la orientación del segundo de los monómeros de la ODC de *M. phaseolina*, utilizando un duplicado del modelamiento hecho en Modeller, basado en la estructura cristalográfica de la cadena A de la ODC del ratón. Adicionalmente, los modelos construidos con las dos plataformas se superpusieron con fines comparativos (Figura 8).

Finalmente se determinó que el sitio de poliadenilación se encuentra ubicado 87pb abajo del codón de stop putativo y que hay una señal de poliadenilación (AATAAAAA) ubicada 59pb antes de este sitio (Figura 9).

El ADNc de la región 3'-UTR, sintetizado durante el análisis 3'RACE, se utilizó como templado para la amplificación de una región de 248pb dentro de la cual se encuentra localizado el intrón que se reporta en la secuencia de la cepa MS6 del banco de datos. El fragmento, obtenido mediante el uso de los oligonucleótidos ODCRT248F y ODCR

(Cuadro 1), se secuenció directamente del producto de PCR y fue alineado con las secuencias nucleotídicas de los ORFs de las cepas MS6 y HMP05. La secuenciación permitió confirmar la existencia un intrón de 57pb, ubicado en la misma posición reportada para la cepa MS6 (Figura 10 y apéndice C).



Figura 6. Análisis de homología e identificación de dominios putativos conservados en la secuencia ODC de la cepa HMP05. A: Amplificación del ORF de la ODC en el ADNg de la cepa HMP05. Mp: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2: amplificación con cebadores ODCATGn-ODCR: producto de 1035pb; carril 3: amplificación ORF anotado en el NCBI para cepa MS6, con oligonucleótidos ODCF-ODCR: producto de 945pb. B: se presenta el resultado del alineamiento local de la secuencia nucleotídica aislada en la cepa HMP05 y las proteínas del banco de datos del NCBI, usando la herramienta Blastx. C: se señala con rojo la sustitución de una isoleucina por una valina, tomando como referencia la secuencia ODC de la cepa MS6. El panel inferior muestra los resultados de la búsqueda de dominios putativos conservados dentro de la secuencia aminoacídica predicha, en la plataforma del NCBI.

ODCHMP05	:	-----	:	-	ODCHMP05	:	KRAIRDARAARDQATGLGFRMHTLDIGGGFSAGPLFAQTAAGVNOALDLY	:	158
M_phaseoli	:	-----	:	-	M_phaseoli	:	KRAIRDARAARDQATGLGFRMHTLDIGGGFSAGPLFAQTAAGVNOALDLY	:	128
N_parvum_U	:	-MAPIALTPPRS---PDLNIRLNPLE-----YLETTTDNSK	:	32	N_parvum_U	:	QRAIRDARTVTDQATGMGFQMHHTLDIGGGFSAGPLFAQTAGOVNOALDLY	:	262
P_anserina	:	MVMPTLLADRFRVSLDYTELNNHVFLKSCNNGYFEQHNHHHLLGHEHHHHE	:	50	P_anserina	:	LKAVRDSHMVQQAASGFSKLTLDVGGGFCADNTEQOMAGVLRALDLY	:	300
C_globosum	:	--MPTLITDRFTPLDYTLTNNHVFLKSYNNGVFGYNQGHGPGHHDDGDR	:	48	C_globosum	:	LKAVRDAHEVQQAASGFSKLTLDVGGGFCSDNTEQOMAGVLRALDLY	:	298
M_thermoph	:	MVMPTLVTDRETFALDYTFDNNHVFLKSCNNGFFDYNQHVHHDDH--DGRH	:	49	M_thermoph	:	LKAVQDAHVQQAASGFSKLTLDVGGGFCSDSSEEQMAGVLRALDLY	:	299
T_terrestr	:	MVMPTVSDRFASLDYTEFTNNHVFLKSCNNGFFEHNNHHGHHDDH--DGGK	:	49	T_terrestr	:	LKAVQDAHVQQAASGFSKLTLDVGGGFCSDSSEEQMAGVLRALDLY	:	299
P_nodorum	:	--MAPSAIT---TTEEYQTLKDSLQSLNS-----QTLGVS--ENHG	:	34	P_nodorum	:	IKAVQDARFVDOQAASGFSKLTLDVGGGFTGDIIFEPMAAVLRALDLY	:	284
M_anisopli	:	MVMATAILDNH----QNVTHNHMSMKK-----PLLDLYLHNNV	:	34	M_anisopli	:	YKAVRDAHAVQQAASGFSKLTLDVGGGFCGD--TEQOMSSVLRALDLY	:	283
F_oxysporu	:	MVMATAVLDTYN---HNVNHPHIALKK-----PLLOEPLQYQ	:	35	F_oxysporu	:	YKAVRDAHTVQQLAHEFGFNMRTLDVGGGFCGD--TEETMAAVLRALDLY	:	284
ODCHMP05	:	-----	:	-	ODCHMP05	:	FPLDSCGRVITDEPGRFMVNSAFTAAAVTSRRCSEPLAQDSNN---LKP	:	204
M_phaseoli	:	-----	:	-	M_phaseoli	:	FPLDSCGRVITDEPGRFMVNSAFTAAAVTSRRCSEPLAQDSNN---LKP	:	174
N_parvum_U	:	G-TAEHLVKKIMHDRIQNIDCATCAPGEDDAFFVADLGEVYRLHAEWRRR	:	81	N_parvum_U	:	FPLDSCGRVITDEPGRFMVNSAFTAAAVTSRRCSEPLEEDSNN---LKS	:	308
P_anserina	:	GPTAKELIGNALRQRVESIDHEDCEPGEEDTFFVADLGEVYRQLRWKMN	:	100	P_anserina	:	FPAHSGNLIIEPGRFYASAAFTLACNVIARRTIQDITALINNGTTTPDPS	:	350
C_globosum	:	LNSAKQLIGDALRERVENVDHEFCPEGEEDTFFVADLGEVYRQLRWKLN	:	98	C_globosum	:	FPAHLGNIIEPGRFYASTAFTLACNVIARRTIEDMS-----AAS	:	339
M_thermoph	:	VNLAKQLIGEALRERVESIDHELCEPGEEDTFFVADLGEVYRQLRWKLN	:	99	M_thermoph	:	FPAHSGNLIIEPGRFYASTAFTLACNVIARRTIEDVS-----SAS	:	340
T_terrestr	:	IDSAKQLIGEALRERVENIDSECEPGEEDTFFVADLGEVYRQLRWKRN	:	99	T_terrestr	:	FPAHSGNLIIEPGRFYASTAFTLACNVIARRTIEDVS-----AAS	:	340
P_nodorum	:	AWKSKQLIGSALKSRVEAIDHDSCEPGEEDTFFVADLGEVYRQLRWKKN	:	84	P_nodorum	:	FPPH--IRVTEPGRFYASTAFTLACNVIARRTIADATLG-----TTS	:	325
M_anisopli	:	VIDPKQLIGEALHNRASVDHELCEPGEEDTFFVADLGEVYRQLRWKKN	:	84	M_anisopli	:	FPAHSGNLIIEPGRFYASTAFTLACNVIARRTIEDPPTLD-----GKG	:	326
F_oxysporu	:	VITPKQLIGQALHQRVEAIDHEMCEPGEEDTFFVADLGEVYRQLRWKKN	:	85	F_oxysporu	:	FPPHSNIEIEPGRFYASTAFTLACNVIARRTIEDPPTLD-----GKG	:	327
ODCHMP05	:	-----MGIDPSRV	:	8	ODCHMP05	:	TMLYINDGVYGNFTSICEVP--FEFRVRRRAGRITIEDP--DLIQSAERR	:	251
M_phaseoli	:	-----	:	-	M_phaseoli	:	TMLYINDGVYGNFTSICEVP--FEFRVRRRAGRITIEDP--DLIQSAERR	:	221
N_parvum_U	:	LGRVTPFF-----GFDCA SIGEIRTILAMGIDPSRI	:	112	N_parvum_U	:	TMLYINDGVYGNFTSICEVP--FEFRVRRRAGRITIEDP--DLIQSAERR	:	350
P_anserina	:	LPRVKPFYAVKCNPDMLLKLALGNGFDCASKAEIEQVLRMGVDPSRI	:	150	P_anserina	:	YMLYVNDGLYGNFSSIMFDHQHFAKVRIRAGQDLYDTPAANGMDRRSGV	:	400
C_globosum	:	LPRVRPFYAVKCNPDRLLELLSALGTGFDCAASKAEIEQVLRMGVDPSRI	:	148	C_globosum	:	YMLYVNDGLYGNFSSIMFDHQHFAKVRIRSGRRTYNTPAADATD--DGI	:	387
M_thermoph	:	LPRVKPFYAVKCNPDKLELLSALGTGFDCAASKAEIEQVLRMGVDPSRI	:	149	M_thermoph	:	YMLYVNDGLYGNFSSIMFDHQHFAKVRIRSGRRTYNTPAEASDGPCCI	:	390
T_terrestr	:	LPRVKPFYAVKCNPDKLELLSALGTGFDCAASKAEIEQVLRMGVDPSRI	:	149	T_terrestr	:	YMLYVNDGLYGNFSSIMFDHQHFAKVRIRSGRRTYNTPAEASDSDVGI	:	390
P_nodorum	:	LARVKPHYAVKCNPDQVRLRMSLELGMGFDCASKAEIETVLKLGVDPARI	:	134	P_nodorum	:	YMLYINDGVYGNFSSIMFDHQHFAKVRIRSGRRTYNTASANACNAGEGV	:	374
M_anisopli	:	LPRVKPFYAVKCNPDKVLRLLELGAELGAGFDCAASKAEIEQVLRMGVTPERI	:	134	M_anisopli	:	YMLYINDGVYGNFSSIMFDHQHFAKVRIRSGRRTYNTASANACNAGEGV	:	376
F_oxysporu	:	LPRVRPFYAVKCNPDQIILKLELGTGFDCAASKAEIEQVLRMGVTPERI	:	135	F_oxysporu	:	YMLYVNDGLYGNFSSIMFDHQHFAKVRIRSGRRTYNTAAHPTPEGEFG	:	377
ODCHMP05	:	VFAHTCKVMSAIGFARAVGVQMTFADNDELKRIKRVYFGAQLFLVYAAAC	:	58	ODCHMP05	:	EYSIWGNCTCDFGNPSCSLPGVIEIGDWLYYRDMGAYTRCSTTFNNGY	:	301
M_phaseoli	:	-----MTFADNDELKRIKRVYFGAQLFLVYAAAC	:	28	M_phaseoli	:	EYSIWGNCTCDFGNPSCSLPGVIEIGDWLYYRDMGAYTRCSTTFNNGY	:	271
N_parvum_U	:	IFAHTCKVMSAIFKARDTGVQRMFTDNEDELHKKRVYFGAQLLRLIVAC	:	162	N_parvum_U	:	-----FDVNFSCSLPGVIEIGDWLYYRDMGAYTRCSTTFNNGY	:	389
P_anserina	:	IYAQPCKTNSYVRYVAQGVVQMTFADNDELKRIKRVYFGAQLLRLIVAC	:	200	P_anserina	:	EYSIWGPTCDGIDRITBSIRFPVLDVGDWLYFEDMGAYTKCSAITFNNGF	:	450
C_globosum	:	IYAQPCKTNSYVRYVAQGVVQMTFADNDELHKKRVYFGAQLLRLIVAC	:	198	C_globosum	:	EYSIWGPTCDGIDRITBSIRFPVLDVGDWLYFEDMGAYTKCSAITFNNGF	:	437
M_thermoph	:	IYAQPCKTNSYVRYVAQGVVQMTFADNDELHKKRVYFGAQLLRLIVAC	:	199	M_thermoph	:	EYSIWGPTCDGIDRITBSIRFVLDVGDWLYFEDMGAYTKCSAITFNNGF	:	440
T_terrestr	:	IYAQPCKTNSYVRYVAQGVVQMTFADNDELHKKRVYFGAQLLRLIVAC	:	199	T_terrestr	:	EYSIWGPTCDGIDRITBSIRFVLDVGDWLYFEDMGAYTKCSAITFNNGF	:	440
P_nodorum	:	IYAQPCKTNSYVRYVAQGVVQMTFADNDELHKKRVYFGAQLLRLIVAC	:	184	P_nodorum	:	EYSIWGPTCDGIDRITBSIRFVLDVGDWLYFEDMGAYTKCSAITFNNGF	:	424
M_anisopli	:	IYAQPCKTNSYVRYVAQGVVQMTFADNDELHKKRVYFGAQLLRLIVAC	:	184	M_anisopli	:	EYSIWGPTCDGIDRITBSIRFVLDVGDWLYFEDMGAYTKCSAITFNNGF	:	426
F_oxysporu	:	IYAQPCKTNSYVRYVAQGVVQMTFADNDELHKKRVYFGAQLLRLIVAC	:	185	F_oxysporu	:	EYSIWGPTCDGIDRITBSIRFVLDVGDWLYFEDMGAYTKCSAITFNNGF	:	427
ODCHMP05	:	DPSAVSLSIKFGARMEATTLRLRLARDLGLNVVGVSVFVHVGSGGKDPGSAF	:	108	ODCHMP05	:	TDSHDVYVCSEPCAKALLGLDWN	:	325
M_phaseoli	:	DPSAVSLSIKFGARMEATTLRLRLARDLGLNVVGVSVFVHVGSGGKDPGSAF	:	78	M_phaseoli	:	TDSHDVYVCSEPCAKALLGLDWN	:	295
N_parvum_U	:	DPSAVSLSIKFGARMEATTLRLRLARDLGLNVVGVSVFVHVGSGGKDPGSAF	:	212	N_parvum_U	:	TDSHDVYVCSEPCAKALLGLDWN	:	413
P_anserina	:	DTSSLCLRLSKFGASLDSIDGLLALARELGLNVVGVSVFVHVGSGGKDPGSAF	:	250	P_anserina	:	SNSHDVYVCSEPCAKALLGLDWN	:	471
C_globosum	:	DSSSLCLRLSKFGASLDSIDGLLALARELGLNVVGVSVFVHVGSGGKDPGSAF	:	248	C_globosum	:	TNSHDVYVCSEPCAKALLGLDWN	:	459
M_thermoph	:	DSSSLCLRLSKFGASLDSIDGLLALARELGLNVVGVSVFVHVGSGGKDPGSAF	:	249	M_thermoph	:	TNSHDVYVCSEPCAKALLGLDWN	:	462
T_terrestr	:	DSSSLCLRLSKFGASLDSIDGLLALARELGLNVVGVSVFVHVGSGGKDPGSAF	:	249	T_terrestr	:	TNSHDVYVCSEPCAKALLGLDWN	:	462
P_nodorum	:	DSGSLCLRLSKFGASLDSIDGLLALARELGLNVVGVSVFVHVGSGGKDPGSAF	:	234	P_nodorum	:	TDSHDVYVCSEPCAKALLGLDWN	:	445
M_anisopli	:	DSSSLCLRLSKFGASLDSIDGLLALARELGLNVVGVSVFVHVGSGGKDPGSAF	:	234	M_anisopli	:	SNSHDVYVCSEPCAKALLGLDWN	:	447
F_oxysporu	:	DSESLCLRFMSKFGARMDTEGLLALARDLGLNVVGVSVFVHVGSGGKDPGSAF	:	235	F_oxysporu	:	SNSHDVYVCSEPCAKALLGLDWN	:	448

Figura 7. Alineamiento múltiple de proteínas derivado de la homología entre la ODC de *M. phaseolina* HMP05 con otras ODCs fúngicas. Se resaltan con negro los residuos aminoacídicos idénticos en todas las secuencias. Las regiones putativas PEST son identificadas con letras rojas subrayadas. La caja verde remarca la secuencia típica 2 de la familia 2 de las descarboxilasas (Orn/DAP/Arg Descarboxilasas).

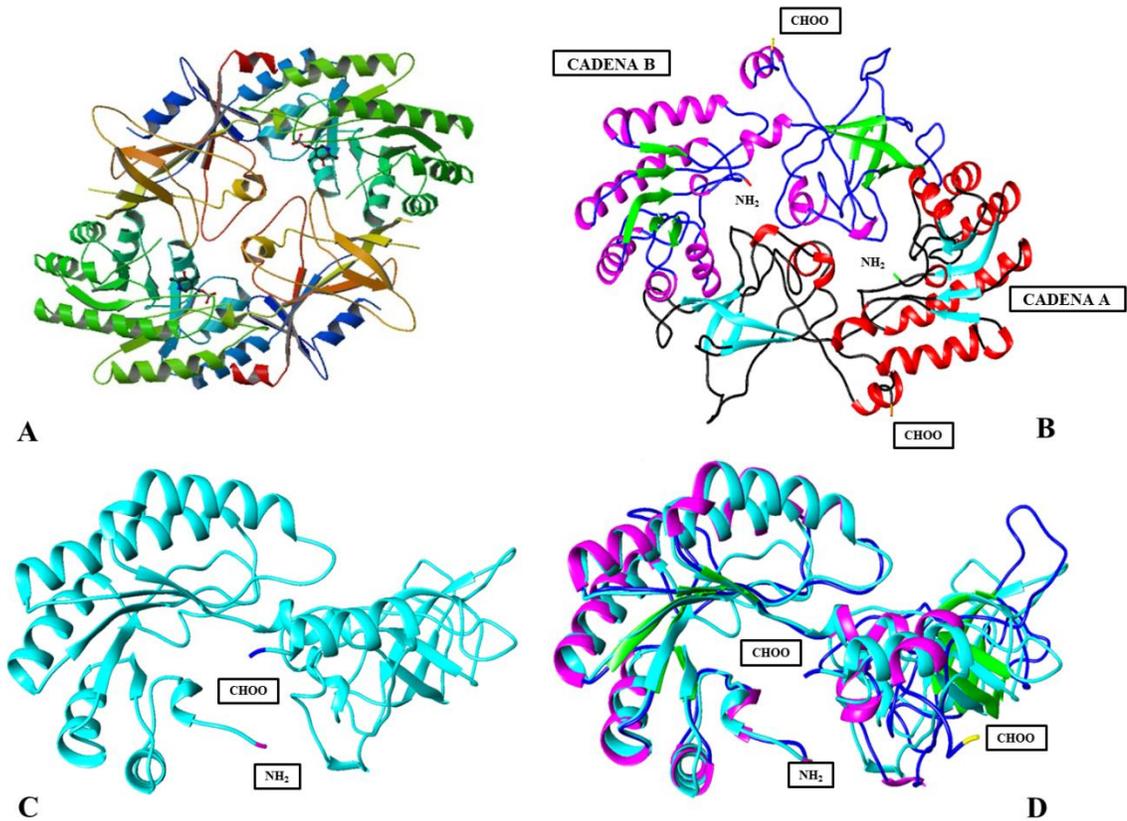


Figura 8. Modelamiento tridimensional de la proteína ODC de *M. phaseolina* HMP05, basado en proteínas homólogas. A) Estructura tridimensional del homodímero de la ODC del ratón (PDB7ODC). B: se muestra el modelamiento de la proteína homodimérica ODC de la cepa HMP05. En la cadena A los plegamientos tipo hélices se muestran en rojo, las láminas en cian y los enrollamientos en color negro. En la cadena B: las hélices están coloreadas en magenta, las láminas se muestran en verde y los enrollamientos en azul. En la figura se visualiza el extremo carboxilo (COOH) de la cadena A en amarillo y el extremo amino (NH₂) de la cadena B, en rojo. En el panel C se muestra la estructura tridimensional del monómero de la ODC de la cepa HMP05 modelado por I-Tasser usando como templado la ODC de *Leishmania donovani* (PDB2oo0A). En la figura D se muestra la superimposición de los dos modelos. Nótese la similitud estructural de ambas predicciones.

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió evaluar experimentalmente la actividad ornitina descarboxilasa del CDS identificado, por medio de un ensayo de complementación de cepas mutantes de *Yarrowia lipolytica* FJOD (Mat A, leu 2-270, ura3-302, odc) (Jimenez-Bremont *et al.* 2001), para lo cual se hizo necesario amplificar el ORF en el ADNc de la cepa HMP05. Se utilizó para tal fin el oligonucleótido

ATGnODC y el ODCR (Cuadro 1.). No obstante, pese a los múltiples intentos de optimizar la reacción de amplificación sobre ADNc, de evaluar diferentes métodos de extracción de RNA y síntesis de ADNc; no fue posible amplificar esta región. Se debe mencionar además, que tampoco se logró la amplificación de la región de 888pb correspondientes al CDS de la ODC, anotado para la cepa MS6 en el banco de datos (cebadores empleados: ODCF-ODCR). Sin embargo, se ejecutaron reacciones exitosas de amplificación del gen constitutivo GAPDH en los ADNc sintetizados, utilizando los oligonucleótidos NewMpRTS1 y MpRTR2 (Villota-Salazar, 2013) (Figura 11).

De acuerdo a los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la recurrente emergencia de formas de la ODC aparentemente inactivas catalíticamente, tales como el inhibidor de la antienzima (Ivanov *et al.*, 2010), se compilieron secuencias aminoacídicas anotadas bajo la denominación AZI en el banco de datos del NCBI para compararlas con la secuencia predicha para la ODC de *M. phaseolina* identificada, a través del cálculo de las distancias por parejas. Se utilizó el algoritmo Muscle y el modelo de sustitución por número de diferencias. La matriz de distancias resultante se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Matriz de distancias entre secuencias aminoacídicas de AZI de invertebrados y la ODC de *M. phaseolina*

Identificador	Organismo/Identificador	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	<i>M. phaseolina</i> _HMPO5												
2	<i>M. phaseolina</i> _MS6	0											
3	<i>Gallus gallus</i>	112	112										
4	<i>Bos taurus</i>	117	117	35									
5	<i>Homo sapiens</i>	115	115	33	8								
6	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	117	117	39	14	11							
7	<i>Homo sapiens</i>	115	115	33	8	0	11						
8	<i>Mus musculus</i>	116	116	34	11	5	14	5					
9	<i>Rattus norvegicus</i>	118	118	36	16	12	21	12	7				
10	<i>Pongo abelii</i>	115	115	33	8	0	11	0	5	12			
11	<i>Danio rerio</i>	112	112	73	72	70	73	70	73	71	70		
12	<i>Camelus ferus</i>	115	115	35	8	4	11	4	7	13	4	71	

```

CAAGCTCGGCAAAGGCCAGTCAGAAAACGC AATACGTTGCGGACTGGTGAGTTAGTGGCGTTCAGCAA -1051
GAAATCAAACGAATGCGGACTCGACCGACA CGGCATTTTGATGCTTCCCCCTTGCTGGAATGTAGTCCGG -981
CTGAAACCGCAAAGCTTGGCTCTGTGGCCC ATCGGGGACGGCTCGACTGCCATCCA TCGCGCCATTCTT -911
TGGTTCTATGGCGATCGAGGCTCACGATCT GCCTTTGCCAAGAT CCGTCAAATCTGCTGGGTCCAACGCG -841
CCGCCAACTTCCACATT CCCGGACTTGGCGACGTGCCAAGAGTCCCTGATCTCCCA TATTGTCCAGTCG -771
CTCCAAGTGAAGTGTGGCTGAGATCCAGGA AAGGACTACAGGATGTCTCTATAGATGTGTTCCCGTGCTA -701
ATCTTGTTTTAGTATAA GACAAACATCTCT TCCAGTTTGCGCCT TGGTCTCGATCTC CCCACACGCGAAC -631
GCGACGTCCAGGTCGAA ACTTAAAACGCCC TACAGAAGAGCTAG CACCGGGACATAC CACGCTAGAGGCA -561
ACGGTCGATGAATGCAG GGGTCCATCGCCG GCGTCTTCTCACT TCCAGCTGAGGCGCAGTCCACCAGTG -491
TTCCGAGCTTTGAGC CACCCATGTGGAA ATAATGATGGCGCT GGCCAAAGGGATAATCTGGTCATGTA -421
GAGTGAGGCGAGGCCGT CCGGAGAGGGTAG AAAAAAGATGGGCTGCCATGAAGCTTCTCGATACCCATCTC -351
CTTGGTCGACAAGCGAT CoTCAAGCAGAGGTCAATTTGATAGGCAGAACATCCCCCTCACTCACCTTCTCT -281
ATCTAATCTTCTGATCCGGGATATGACAC CAATTGCGCTCACA CCGCCGAGGTCTCCGACCCCCAACCT -211
CCCCCTCGACGGCCAGGAGAAGACCGCCAC AGACGGCAAAGGGA CAGCGGAATATCTCGTCCAGAAAATC -141
ATGCACGAGCGCATCCA GAGCATCGACGTC GCAACTGCGCACCAGGCGAAGACGACGCCTTCTTCTGTCG -71
CAGACCTGGGCGAGGTGTACCGGCTGCATG CCGAATGGCGCCAG CGCTGAGCCGAGTAACACCTTCTT -1
GTCGCGCCCCCGCCGCCG CAGGAAACCCC CGGACCGGAAAGGCTGACCAGATACTTCTCGCAGCAATC 70
AAAGCGAATCCAGACCA GCACGTCTGCGG CTACTCGCCGCCCTGGCACCGGCTTCGACTCGGCCTCGA 140
TCGGCGAGATCCGGACC GTCTCTGGGAATGGGCATTGACCCCCAGC CGCGTCGTCTTTCGCGCACACCTGCAA 210
M G I D P S R V U F A H T C K
AGTCATGTCCGCCATCGGCTTTCGCGCGGGC CGTCCGCGTCCAGCAGATGACGTTTCGACAAACGCCGACGAG 280
V M S A I G F A R A V G V Q Q M T F D N A D E
CTGGCAAGATCAAGCGCGTGTATCCCGGGGCGCAGCTCTTTCTGCGGGTCCGCCGTCGCGATCCGTCGG 350
L R K I K R V Y P G A Q L F L R V A A C D P S A
CCGTGTCGACGTGAGCATCAAGTTCGGCGCGCGCATGGAGCGACGACGAGCTGCTCCGGCTGGCGAG 420
V S Q L S I K F G A R M E A T T T L L R L A R
AGACCTGGGCCTCAACGTCGTTGGCgtgtgcttccacgtgggcAGCGCGGGAAAGA CCGGAGCGCGTTC 490
D L G L N V U G V S F H V G S G G K D P S A F
AAAAGGCGGATTCTGTA CCGGAGGCGCGTTCGACCAGGCCAC CGGCTTGGGATTCCGGATGCACACCT 560
K R A I R D A R A A F D Q A T G L G F R M H T L
TGGATATCGGCGCGGGTTTCAGCGCAGGTC CGCTCTTCGCGCAGACGGCAGCCAGGTAATCAGGCGTT 630
D I G G G F S A G P L F A Q T A A Q V N Q A L
GGACGTATACTTCCCCCTCGACTCCGGCGT CCGGGTGATTGCAGAACCGGGCCGCTT CATGGTCAACAGC 700
D V Y F P L D S G V R V I A E P G R F M V N S
GCCTTCAGCGCGCGCGCGCCGTCACGTCG CGGAGATGCTCGGA GCCACTGGCTCAGGACTCGAACAAC 770
A F T A A A V T S R R C S E P L A Q D S N N L
TGAAGCCGACAACTGCTA TACATCAACGACGCGGTGTACGGCAACTACTTCACTTCCA TCTCGCAAGTTC 840
K P T M L Y I N D G V Y G N Y F T S I C E V P
GCCAGAGCCGCGGGTGTTCAGGCGTGCCGGGCGCACCCTCATTGAGGATCCGGACCTTATCCAGTCGGCT 910
P E P R V F R A G R T V I E D P D L I Q S A
GAAAGCGCTGAATATAG CATCTGGGGAAACTTGTGACAGCTT CGATTGCGTCAAC CCTTCGTGTAGTT 980
E R R E Y S I W G N T C D S F D C V N P S C S L
TGCCGGCGTGTGGAGATTGGTGACTGGCTATACTACCGGGACATGGGAGcatatacaagatgtagcac 1050
P G V L E I G D W L Y R D M G A Y T R C S T
taCCACTTTCAATGGCTACACGGACTCTCA CGACGTGATTTACATCTGCTCAGAGCCIGAAGCTGCTACT 1120
T T F N G Y T D S H D V I Y I C S E P E A A T
CTGCTGGATGGAGATTGGAAGTGAAGAGTGC GAAAAGATAAAAAGAAATCGGTACA 1190
L D G D W N *
TTAGCGAGCATAGTAATTTATAATCATCTT TCAAGGGGTGA 1231

```

Figura 9. Secuencia nucleotídica del gen ODC de *M. phaseolina*. En color azul se señalan los oligonucleótidos específicos utilizados para el análisis 5'y 3'RACE. En letras minúsculas azules se muestran los cebadores utilizados para las PCRs anidadas. Se identifica el TSS como una G dentro de un círculo rojo y el sitio de poliadenilación como una A dentro de una caja verde. El codón de inicio de la traducción es señalado en fucsia. En amarillo, se destaca la secuencia concenso de poliadenilación identificada y en gris, los aminoácidos predichos. Existe una secuencia nucleotídica de 57pb correspondientes a un intrón, ubicado en la posición 1031 (datos no presentados).

	860	870	880	890	900	
ORF_HMP05	:	ACCGGGACATGGG	AGGTAAGTCACACGCGTCTCAGAGTGGAAAATAAGAG	:	900	
ORF_MS6	:	ACCGGGACATGGG	AGGTAAGTCACACGCGTCTCAGAGTGGAAAATAAGAG	:	900	
Sec_RT248F	:	ACCGGGACATGGG	-----	:	133	
	910	920	930	940	950	
ORF_HMP05	:	CAGCTGACTAACTGTGCCTT	TAGCATATACAAGATGTAGCACTACCACTTT	:	950	
ORF_MS6	:	CAGCTGACTAACTGTGCCTT	TAGCATATACAAGATGTAGCACTACCACTTT	:	950	
Sec_RT248F	:	-----	TAGCATATACAAGATGTAGCACTACCACTTT	:	163	

Figura 10. Alineamiento de ORFs de las cepas MS6 y HMP05 con la región de 248pb obtenida por secuenciación sobre ADNc de la región 3'-UTR. Se muestra un fragmento del alineamiento de la secuencia obtenida con los cebadores RT248F y ODCR y aquéllas correspondientes a los ORFs de las cepas MS6 y HMP05. Se señala en amarillo la región del alineamiento que permite confirmar la existencia de un intrón de 57pb en la cepa HMP05. El alineamiento de las secuencias completas puede consultarse en el apéndice C.

Para el análisis de la región promotora de la cepa HMP05 se utilizaron los iniciadores pODCF y ODC5RACE (Tabla1). Se amplificó y secuenció una región de 1585pb, que fue comparada con la de la cepa MS6, anotada en la base de datos del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI), obteniéndose un porcentaje de similitud del 99,81% (apéndice B).

Para el análisis *in silico* basado en dominios de unión a factores de transcripción se analizaron las 1288pb ubicadas arriba del sitio de inicio de la traducción, considerando únicamente aquéllos TFBSs predichos para la hebra positiva por al menos uno de los algoritmos de las 2 bases de datos utilizadas. Se predijeron en total 24 dominios de unión a factores de transcripción que se describen en la Cuadro 3 y en la figura 12.

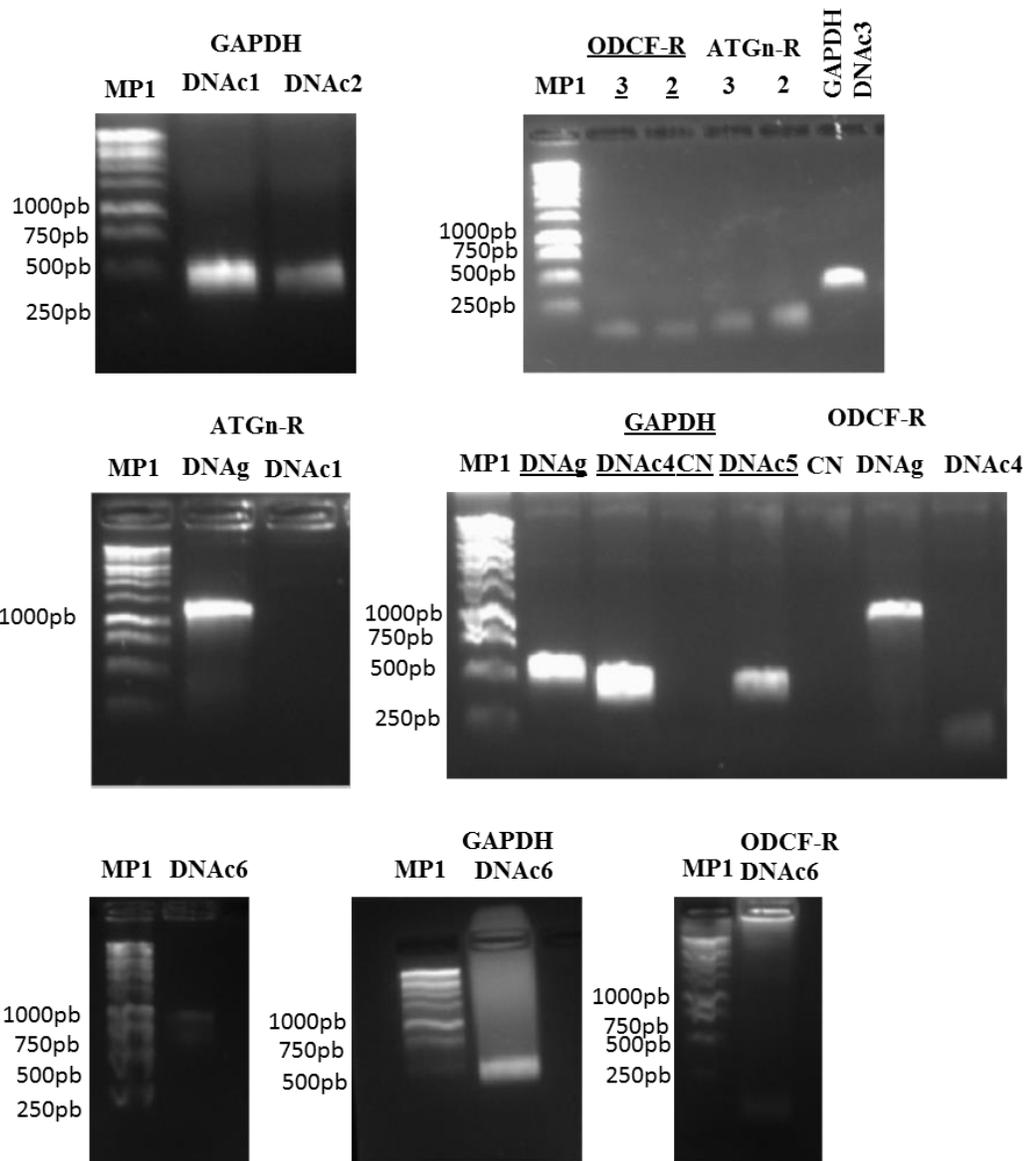


Figura 11. Análisis de ADNc de *M. phaseolina* con el gen constitutivo GAPDH y ODC. La figura muestra los geles de agarosa resultantes de la amplificación con los cebadores NewMpRTS1 y MpRTR2 que amplifican un fragmento de 462pb en el ADNg codificante del GAPDH y de 372pb en el ADNc. Se muestra el resultado obtenido al amplificar distintos ADNc con cebadores ATGnODC y ODCR (Fragmento esperado: 1035pb en ADNg y 945 en ADNc) y ODCF-ODCR (Fragmento esperado en ADNg: 945pb y 888pb en ADNc). En todos los casos, se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb de Promega®. En la figura: MP1: marcador de peso molecular 1Kb; R: cebador ODCR; CN: control negativo. Los ADNc sintetizados se identificaron con un número que se corresponde en cada uno de los geles. Para el análisis del ADNc4 se utilizó el estuche comercial RT-PCR One Step (Qiagen).

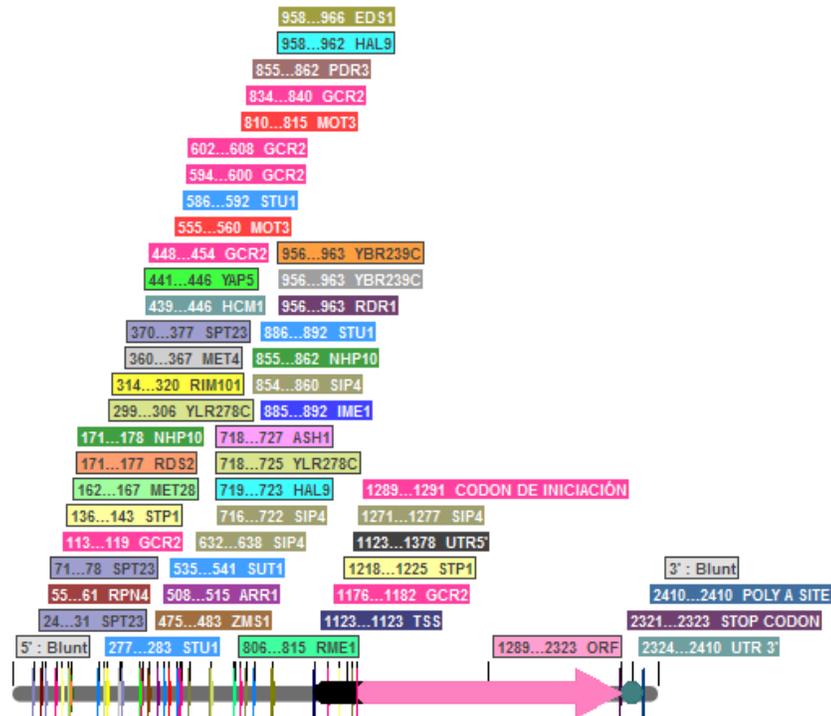


Figura 12. Dominios de unión a factores de transcripción presentes en la región promotora del gen ODC de *M. phaseolina*. En el gráfico se ilustran las posiciones y los nombres de TFBSs predichos para la región promotora de la ODC de la cepa HMP05. La región promotora se identifica como una línea de color gris, interrumpida por una región negra correspondiente a la región 5'UTR. La flecha rosada corresponde al ORF del gen ODC y es seguido por una región en azul que ejemplifica la región 3'UTR.

7.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL GEN ODC DURANTE LA PATOGÉNESIS DE *M. phaseolina* EN *P. vulgaris*.

7.3.1 Impacto de la inhibición química de la ODC sobre el crecimiento vegetativo de *M. phaseolina*

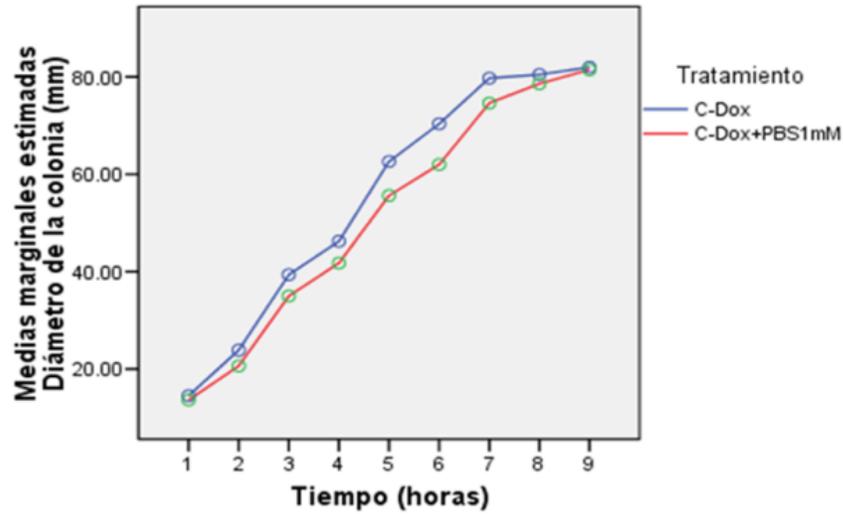
Para proporcionar evidencia de que la ODC afecta el crecimiento micelial de *M. phaseolina*, HMP05, se ejecutaron cinéticas de crecimiento en medio de cultivo Czapek-Dox suplementado con tres concentraciones diferentes de DAB, a saber: 1mM, 5mM y 10mM, mismas que fueron definidas con base en los reportes disponibles en la literatura.

Así mismo se evaluó el efecto del PBS sobre el crecimiento vegetativo del microorganismo, teniendo en cuenta que éste fue el vehículo utilizado para la resuspensión del inhibidor, en un ensayo independiente. El análisis estadístico de los datos, basado en un modelo de dos factores, con medidas repetidas en un factor, permitió demostrar que la adición de PBS a una concentración 1mM tiene efectos significativos sobre el desarrollo vegetativo de la cepa a lo largo de todos los puntos de la cinética evaluados (F: 27,051, $p= 0,002$) (Figura 13A). Se determinó que la velocidad de crecimiento de *M. phaseolina* en medio Czapek-Dox fue de 1,12mm/h y de 0,95mm/h cuando se cultivó en medio Czapek-Dox con PBS (1mM), generando una reducción neta de la tasa de crecimiento del 15,18%, a las 38 horas de evaluación, razón por la cual se decidió incluir medio suplementado con buffer salino como control, durante el ensayo de inhibición con DAB.

El ensayo de inhibición permitió determinar los efectos de las diferentes concentraciones de DAB sobre la tasa de crecimiento de *M. phaseolina* (medida como diámetro de la colonia). Se obtuvo una velocidad de crecimiento de 0,86mm/h en medio Czapek-Dox+PBS; 0,93mm/h cuando el detector microbiológico fue suplementado con DAB 1mM; 0,48mm/h y 0,49mm/h al emplear concentraciones de 5 y 10mM, respectivamente. El porcentaje de reducción del crecimiento vegetativo al final de la cinética (4,8 días) fue de 55,81% y de 56,98% con las concentraciones más altas probadas (5 y 10mM respectivamente). La exposición de la cepa a bajas concentraciones del inhibidor (1mM) no generó reducción de la velocidad de crecimiento (Figura 14).

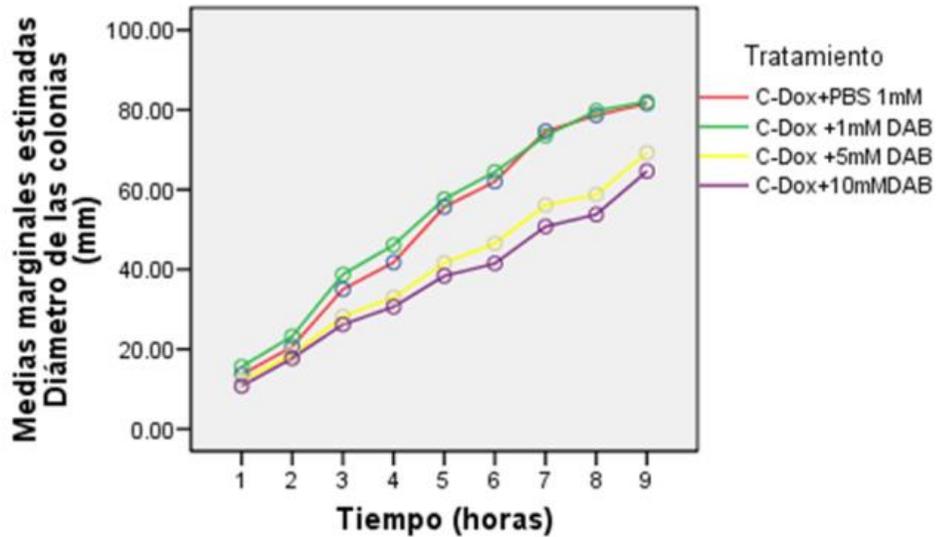
El análisis estadístico de los datos del experimento de inhibición demuestra el efecto significativo de la interacción del tiempo con el tipo de medio de cultivo (F=63,883; $p=0,000$). El crecimiento promedio del hongo en medio suplementado con DAB 1mM no fue estadísticamente diferente al obtenido cuando el hongo se cultivó en Czapek-Dox con PBS 1mM ($p=0,065$). El crecimiento promedio de *M. phaseolina* en el medio de cultivo adicionado con concentraciones más altas de DAB, por el contrario, fue estadísticamente diferente al obtenido en el medio de cultivo control ($p=0,000$) (Figura 13B).

Cinética de crecimiento de *Macrophomina phaseolina* HMP05 en agar Czapek-Dox y PBS



A 1=13h 2=21h 3=37h 4=46h 5=61h 6=70h 7=85h 8=94h 9=116h

Cinética de crecimiento de *Macrophomina phaseolina* HMP05 en agar Czapek-Dox con PBS y DAB



B 1=13h 2=21h 3=37h 4=46h 5=61h 6=70h 7=85h 8=94h 9=116h

Figura13. Cinéticas de crecimiento de *M. phaseolina* HMP05 en agar Czapek con PBS y DAB. A: Evaluación del impacto del PBS en el diámetro de las colonias de la cepa HMP05. B: Evaluación del efecto inhibitorio del DAB sobre el crecimiento vegetativo de la cepa HMP05.

Cuadro 3. Descripción general de los dominios de unión a factores de transcripción identificados en la región promotora de *M. phaseolina* HMP05.

Factor de transcripción	Número de sitios	Posición en la secuencia	Descripción general
ARR1	1	508-515	Involucrado en respuesta celular al arsénico, antimonio y al estrés híper osmótico. Regula positivamente la expresión de los genes en respuesta al estrés.
ASH1	1	718-727	Es un represor del gen HO, el cual codifica una endonucleasa responsable del cambio del tipo de apareamiento en <i>S. cerevisiae</i> . Activador epigenético; es una histona acetil transferasa multicatalítica (HMTasa) que metila los reiduos lisina 4 y 9 en H3 y el residuo 20 en H4.
EDS1	1	958-966	Factor transcripcional de función desconocida.
GCR2	6	113-119; 602-608; 448-454; 594-600; 834-840; 1176-1182	Activador transcripcional involucrado en la regulación de la expresión de la mayoría de genes de la glicólisis, regula positivamente la expresión de diversos genes funcionales en respuesta al estrés por ácidos débiles.
HAL9	2	719-723; 958-962	Involucrado en tolerancia al estrés salino.
HCM1	1	439-446	Regula la expresión de genes involucrados en el ensamblaje del cuerpo polar del huso y adaptación respiratoria a limitación de nutrientes.
IME1	1	885-892	Requerido para la esporulación, crecimiento celular de pseudohifas y la activación de genes específicos de la meiosis.
MET28	1	162-167	Activador transcripcional que regula genes involucrados en asimilación de sulfuro y biosíntesis de metionina.
MET4	1	360-367	Factor transcripcional requerido para la activación de rutas de asimilación de sulfuro en <i>S. cerevisiae</i> . Está involucrado en el reclutamiento del complejo Mediator y SAGA en promotores de genes relacionados con la biosíntesis de metionina.

MOT3	2	810-815;555-560	Involucrado en la regulación negativa y activación de genes relacionados con el crecimiento aeróbico y biosíntesis de ergosterol.
NHP10	2	171-178;855-882	Es una proteína no histónica 10. Pertenece al complejo remodelador de la cromatina Ino80, crucial para la reparación y replicación del ADN; y mantenimiento de telómeros.
PDR3	1	855-862	Relacionado con resistencia pleiotrópica a fármacos. Funciona junto con PDR1p para regular la expresión de los genes involucrados en multidrogo resistencia.
RDR1	1	956-903	Represor de resistencia a fármacos 1. Se une a elementos de drogo resistencia pleiotrópica, regulando negativamente la expresión de PDR5.
RDS2	1	171-177	Regulador de sensibilidad a fármacos 2. Regula la expresión de genes involucrados en gluconeogénesis. Proporciona tolerancia al ketoconazol y al estrés oxidativo.
RIM101	1	314-320	Regulador altamente conservado de respuesta al pH en muchos hongos. Requerido para adaptación y resistencia a ácidos débiles en <i>S. cerevisiae</i> . Involucrado en activación de rutas de crecimiento filamentoso, requerido para todas las formas de crecimiento celular filamentoso, incluyendo crecimiento invasivo haploide, crecimiento de pseudohifas y formación de biopelículas.
RME1	1	806-815	Regulador de meiosis 1. Regulador negativo de meiosis, promueve la expresión de IRT1 lncRNA, localizado aguas arriba de IME1, el cual funciona para inhibir la expresión de IME1 en células de levaduras haploides.
RPN4	1	55-61	Regula positivamente la expresión de genes que codifican subunidades del proteasoma, requeridas para la progresión del ciclo celular.
SIP4	4	632-638;716-722;854-860;1271-1277	Activador transcripcional del cluster de zinc C6 que interactua con SNF1 proteína cinasa. Regula la expresión gluconeogénica de genes en respuesta a la disponibilidad de nutrientes.
SPT23	3	71-78;24-31;370-377	Supresor multicopia de mutaciones inducidas por el retrotransposon Ty 23 en <i>S. cerevisiae</i> . Proteína del retículo endoplasmático que se transloca al núcleo para regular la transcripción. Activa la expresión del gen OLE1 que codifica la desaturasa de ácidos grasos delta 9 en <i>S. cerevisiae</i> y la biosíntesis de ácidos grasos. Es un componente de la ruta metabólica del mevalonato.
STP1	2	136-143;1218-1225	Es un gen involucrado en el procesamiento de pre -RNAt; regula la expresión de genes que codifican permeasas de alta y baja afinidad a aminoácidos, promueve la expresión de AGP1 en respuesta al exceso de aminoácidos.

SUT1	4	277-283;535-541;586-592;886-892	Involucrado en captura y biosíntesis de esteroles, se une a Ssn6p e inhibe la represión transcripcional de genes involucrados en crecimiento filamentosos y apareamiento mediado por Ssn6p-Tup1p.
YAP5	1	441-446	Involucrado en el silenciamiento génico de los telómeros.
ERT1/YBR239c	1	956-963	Involucrado en la regulación de la gluconeogénesis y la utilización de carbón fermentable.
YLR278C	2	718-725;299-306	Proteína del cluster zinc. No se trata de un gen esencial.
ZMS1/RSF2	1	475-483	Regula positivamente la expresión de GUT1, GUT2 y ATP9, así como la expresión de genes involucrados en la utilización de glicerol y respiración. Su expresión es reprimida por glucosa

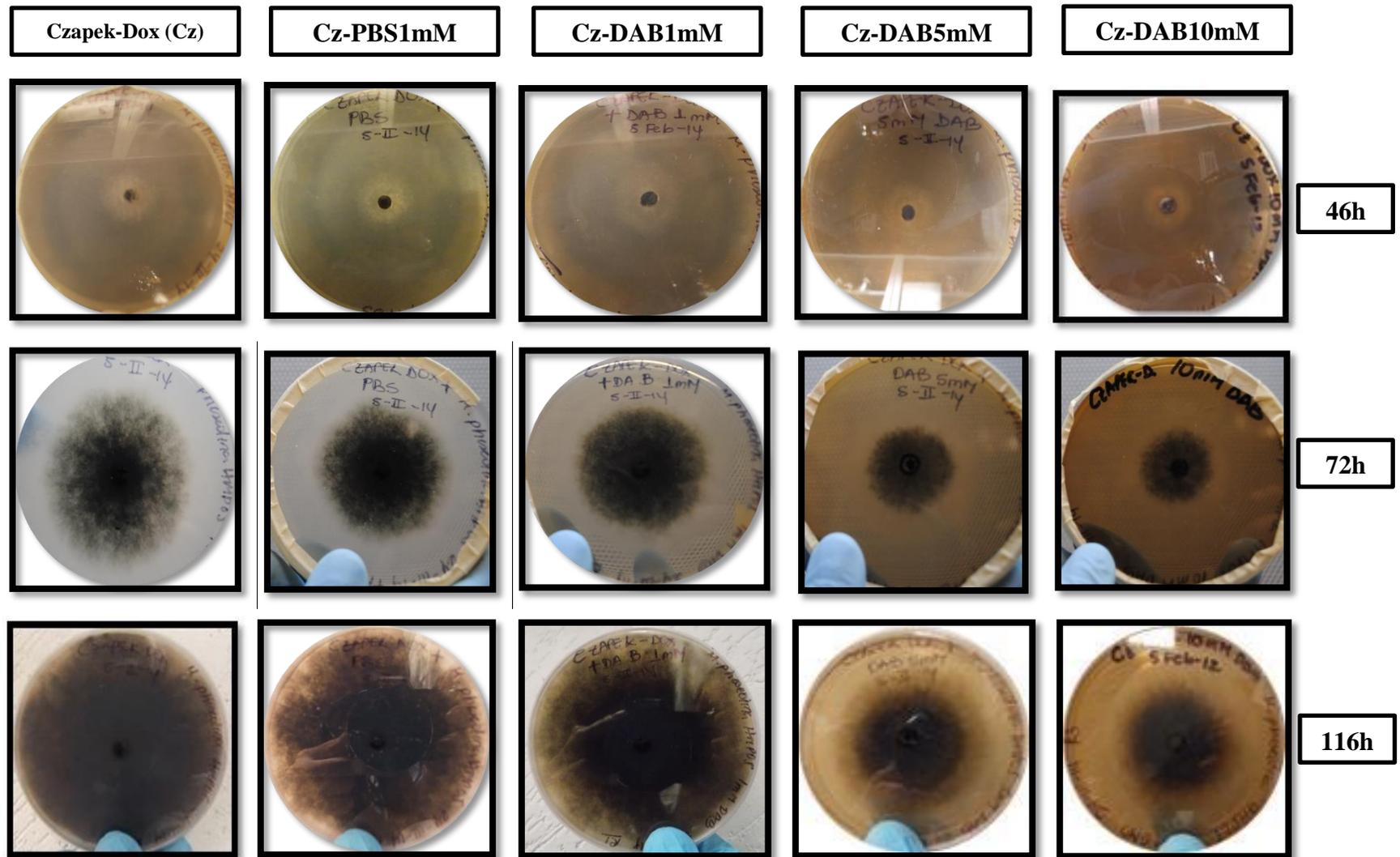


Figura 14. Cinéticas de crecimiento de *M. phaseolina* HMP05 con inhibición química por DAB, en medio Czapek-Dox y PBS

Se observó que el efecto inhibitorio generado por la adición de DAB en concentraciones de 5mM y 10mM fue similar durante las primeras 61 horas de desarrollo, tiempo a partir del cual se observa una disminución estadísticamente significativa en el diámetro promedio de las colonias que crecen a la mayor de las concentraciones probadas. El Cuadro 4 resume los resultados de la prueba de Tukey, ejecutada para hacer las comparaciones múltiples respectivas.

Cuadro 4. Resultado de la prueba Post Hoc para evaluar el efecto de la inhibición química con DAB sobre el crecimiento vegetativo de *Macrophomina phaseolina*

Prueba de Tukey				
Detector microbiológico	Número datos	Subconjuntos		
		2	3	1
Cz+DAB10mM	4	37.146		
Cz+DAB5mM	4		40.479	
Cz+PBS1mM	4			51.486
Cz+DAB1mM	4			53.451
Significación		1	1	0.065

En cuadro 4 se presentan las medias de cada tratamiento en los subconjuntos homogéneos resultantes de la prueba de Tukey.

7.3.2 Ensayo de Patogenicidad de *M. phaseolina* en *P. vulgaris* para evaluación de la expresión del gen ODC

Para la evaluación de la actividad de la ODC durante la patogénesis de *M. phaseolina* en *P. vulgaris* se ejecutaron cinéticas de expresión con muestras tomadas de la interacción planta- hongo cada 6 horas, a partir de las 18 horas post infección, por un periodo de 2,3 días (54 horas). El establecimiento de la infección se hizo por inoculación directa de $1,3 \times 10^4$ UFC de *M. phaseolina* sobre el tejido radicular de plantas de frijol de las variedades Pinto Saltillo y Negro Jamapa, germinadas previamente en medio MSO durante 21 días. Se germinaron 150 semillas de cada variedad, de las cuales se seleccionaron las 42 plantulas más homogéneas, en términos de desarrollo radicular y

altura, como las unidades experimentales para cada tratamiento. Se inocularon además, frascos con 10mL de MSO como testigos de la prueba. Se consideraron 5 repeticiones por tratamiento para cada punto de muestreo y se incluyó una unidad experimental adicional, para evaluación por microscopía óptica. Los síntomas de la enfermedad empezaron a evidenciarse a partir de las 18 horas de inoculación y coincidieron con lo reportado por otros autores previamente. (Figura 15)

Para el análisis de expresión en tiempo real se extrajo el RNA de cada una de las muestras, verificando su integridad y pureza, por observación en gel de agarosa para identificar la presencia de las bandas del RNA ribosomal 28S y 18S, tal como se ilustra en la Figura 16.

Se diseñaron 2 ensayos Taqman® para amplificación de un fragmento de la ODC y del gen constitutivo GAPDH de *M. phaseolina*, que se escogió como normalizador de la prueba. El ensayo TaqMan® para amplificación de ODC se localizó en la posición + 679pb, generando un fragmento de 60pb.

Antes de dar inicio a los experimentos de cuantificación en tiempo real se probó la especificidad de los cebadores y sondas sobre el ADNc de *M. phaseolina*, para lo cual se sintetizó ADNc de las dos variedades de frijol incluidas en el estudio. Además, se analizaron dos muestras elegidas al azar de la prueba de patogenicidad (un control y una interacción a las 42 horas). Se procesaron reacciones control sin enzima transcriptasa reversa para cada una de las muestras, teniendo en cuenta que los ensayos se posicionaron sobre exones, en ambos casos. Los resultados del tiempo real no mostraron amplificación con ninguna de las sondas cuando se empleó el ADNc de las variedades de frijol analizadas (Figura 17A). Sin embargo, al evaluar los gráficos de amplificación con las muestras de la interacción y la biomasa del hongo (muestra control), se evidenció una disparidad en los niveles de expresión detectados para la ODC y el GAPDH que impedirían una cuantificación dentro del mismo rango dinámico de detección (Figura 17B)

**Negro
Jamapa**

T0h



T18h



T24h



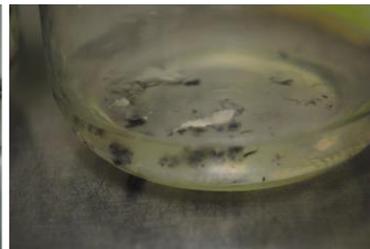
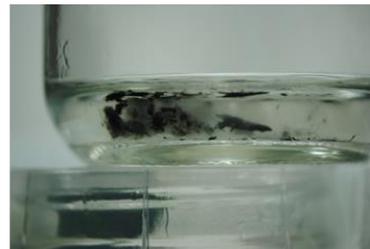
T30h



**Pinto
Saltillo**



Control



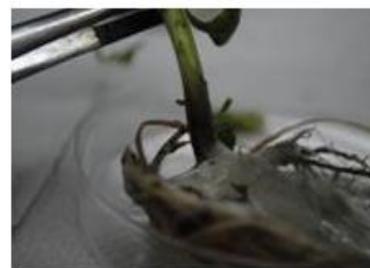
T36h

T42h

T48h

T54h

**Negro
Jamapa**

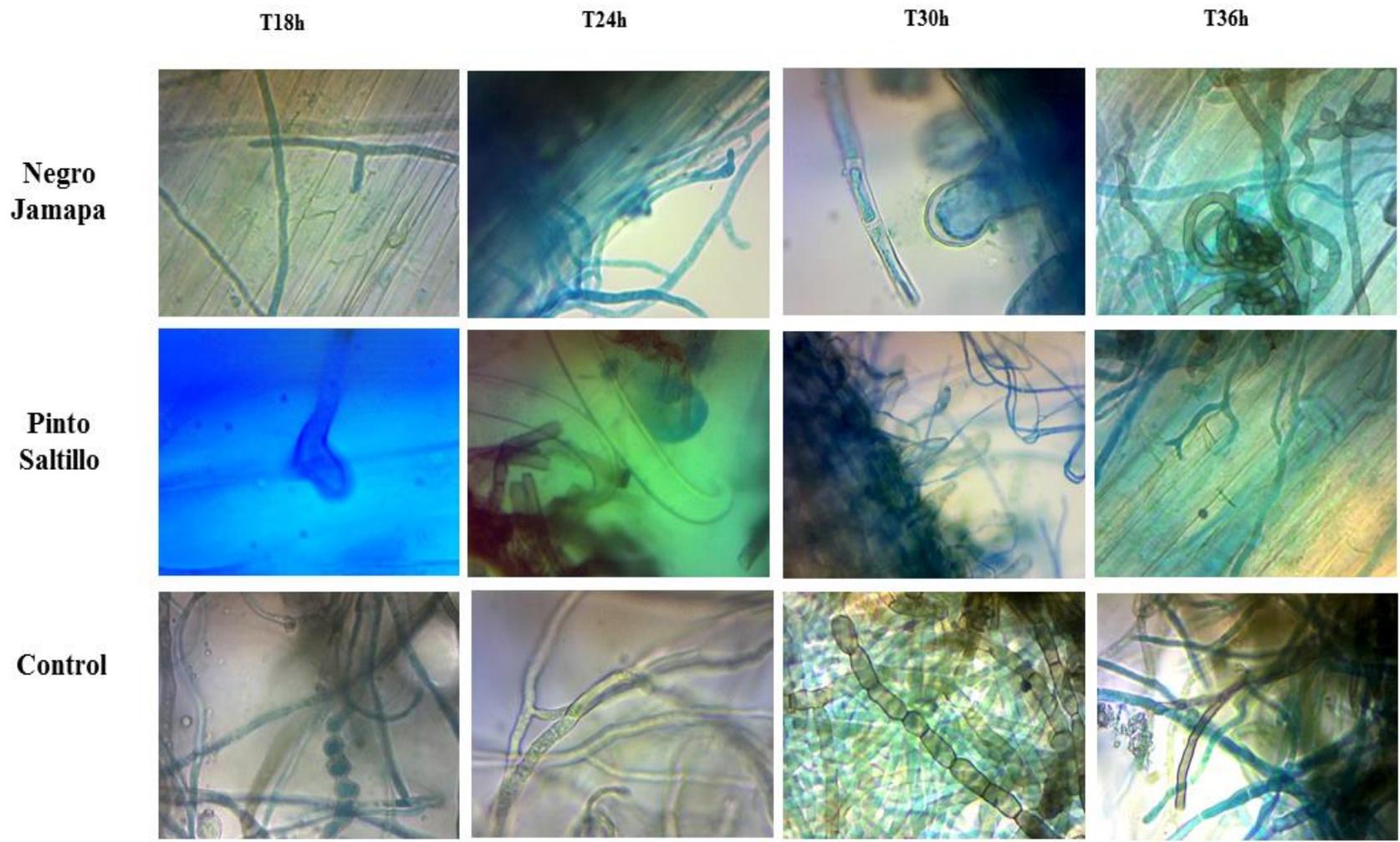


**Pinto
Saltillo**



Control





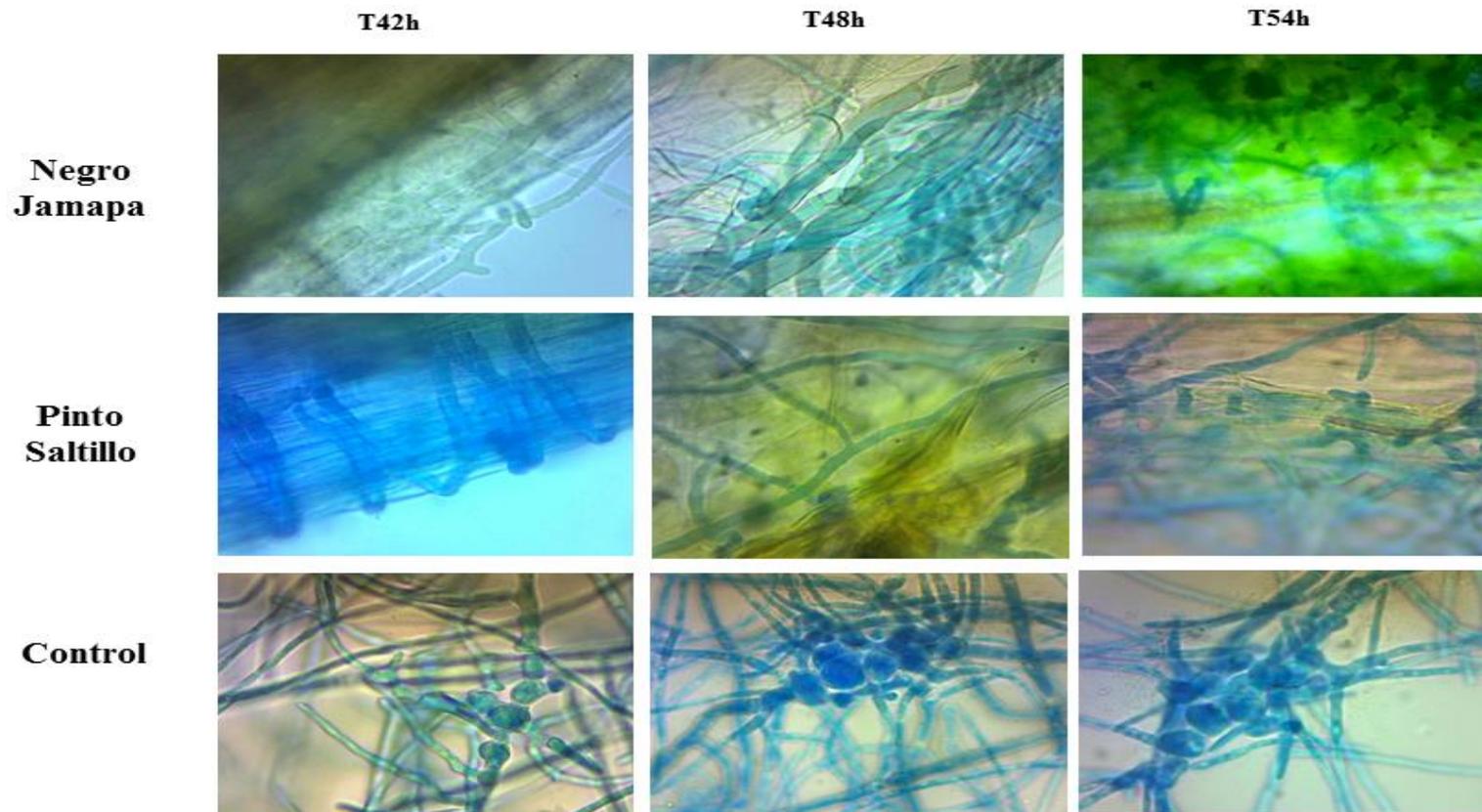


Figura 15. Ensayo de interacción entre *M. phaseolina* HMP05 y *P. vulgaris*, variedades Pinto Saltillo y Negro Jamapa. La visualización de las estructuras microscópicas se hizo a 400X. Se observaron microesclerocios a partir de las 18h post infección, que pueden apreciarse en las fotografías de los controles. En todos los casos se tomaron muestras del tejido radicular, excepto en el panel que muestra la interacción PS-Mp, a las 24 y 48h, en donde se analizaron hojas y tallo, respectivamente; e interacción NJ-Mp T54h, correspondiente a una hoja. Se evidenció la presencia de una estructura achatada, similar al apresorio a partir de las 18h (PS-Mp 18h y 36h).

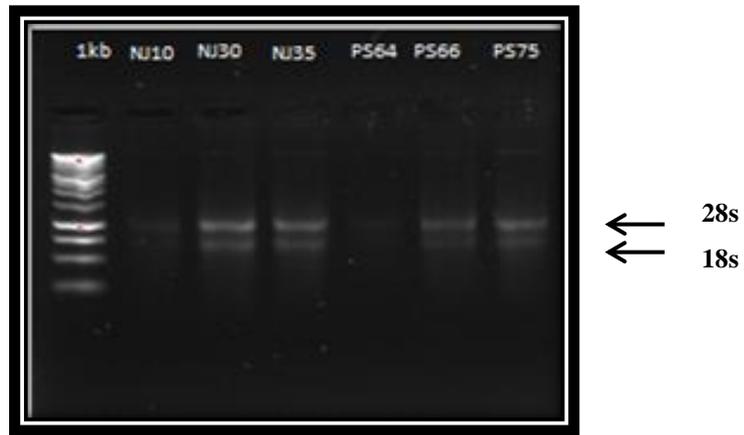
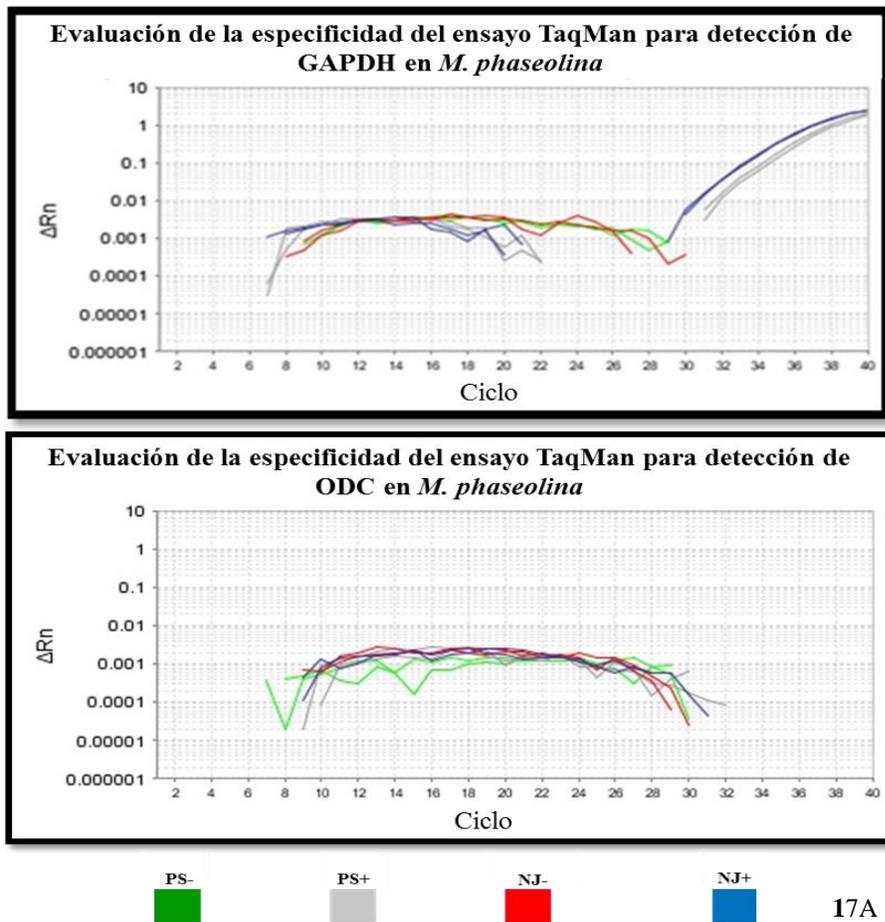
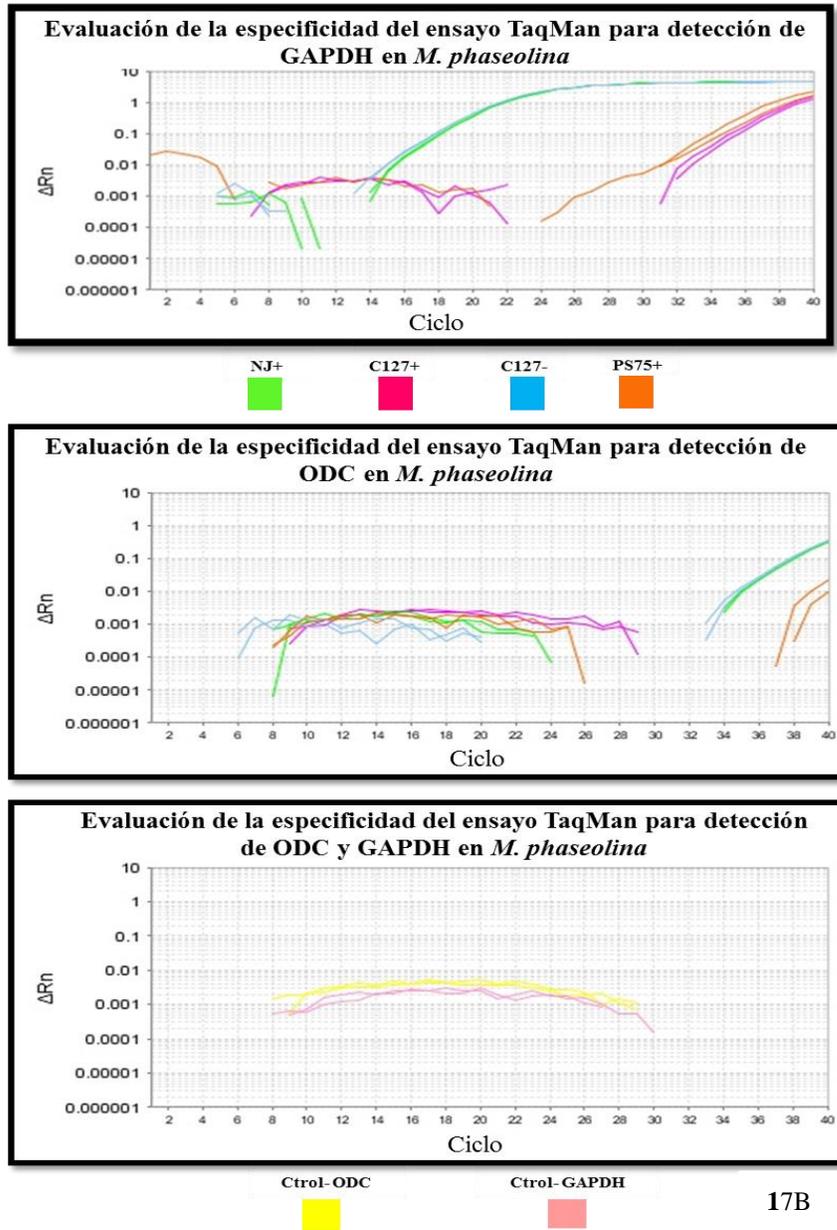


Figura 16. Extracción de RNA total. En la figura se muestra el resultado de la extracción de algunas de las muestras de la interacción correspondientes al tiempo 42 horas. NJ=Negro Jamapa; PS=Pinto Saltillo.





17B

Figura 17. Evaluación de la especificidad de ensayos TaqMan® para amplificación de ODC y GAPDH en *M. phaseolina*. A: Se muestra el gráfico de amplificación resultante de la RT qPCR sobre ADNc de las variedades Pinto Saltillo (PS) y Negro Jamapa (NJ). Se utilizaron reacciones de síntesis de ADNc sin enzima transcriptasa reversa como controles negativos (NJ- y PS -). No se observó amplicón en ninguno de los casos, lo que demuestra la especificidad de los iniciadores y sondas. B: detección de GAPDH y ODC en muestras de la interacción PS-*M. phaseolina* (PS75+) y biomasa de *M. phaseolina* (C127+), tomadas a las 42 horas de iniciada la prueba de patogenicidad. El cuadrante inferior corresponde a los controles negativos de cada ensayo que consistieron en reacciones a las que no se les adicionó muestra (NTC).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de especificidad con las sondas TaqMan® y con el fin de validar el rango dinámico de detección de la prueba, se procesaron tres muestras de diferentes tiempos de interacción, elegidas al azar y una muestra del hongo cultivado en condiciones de privación de la reserva metabólica de poliaminas, que fue tomada como muestra de referencia. Con este experimento se puso en evidencia que los niveles del transcrito de la ODC medidos bajo las condiciones experimentales definidas, no se encontraban dentro de un rango cuantificable adecuado (Figura 18)

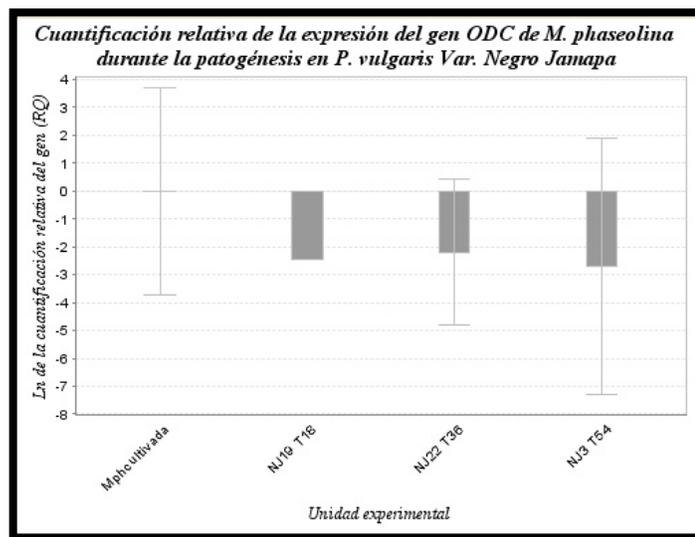


Figura 18. Cuantificación relativa de la expresión del gen ODC durante la patogénesis de *M. phaseolina* en *P. vulgaris*.Var. Negro Jamapa Para la tabulación de los datos se siguió el método comparativo o $\Delta\Delta Ct$, tomando como muestra de referencia la expresión de la ODC en el hongo cultivado bajo condiciones de privación metabólica de poliaminas. La expresión del gen se normalizó con aquella obtenida para el GAPDH. En la figura: Mphocultivada: cepa HMP05; NJ19T18: Muestra de interacción entre Negro Jamapa (NJ)-*M. phaseolina* a las 18 horas de interacción; NJ22T36: Interacción NJ-*M. phaseolina* a las 36 horas de interacción; NJ3 T54: Muestra de interacción entre Negro Jamapa (NJ)-*M. phaseolina*, 54 horas después de establecida la interacción. Las barras corresponden a la dispersión de los datos.

Con el objetivo de estandarizar un mismo rango de cuantificación para el gen de interés y el gen constitutivo, se evaluó la utilidad de un protocolo de preamplificación de las muestras con las sondas TaqMan ODC, tal como se describió en el apartado 6.3.3.3. Se

incluyeron reacciones sin transcriptasa reversa, sin embargo, no fue posible implementar este protocolo debido a la interferencia generada a expensas del ADNg contaminante. Los resultados se muestran en la figura 19.

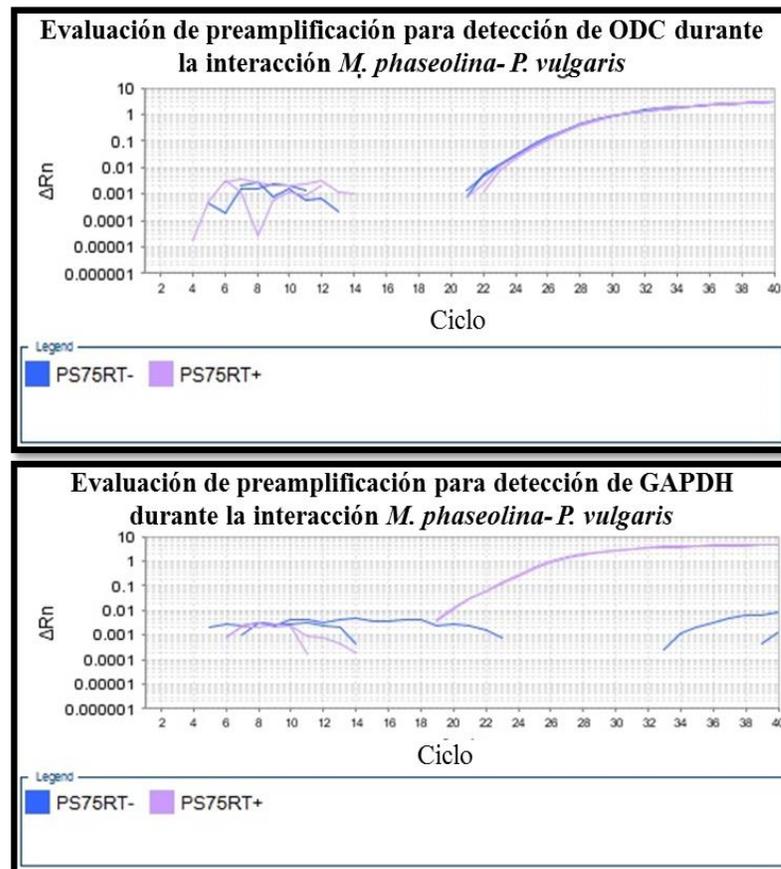


Figura 19. Ensayo de preamplificación para detección de ODC durante la interacción *M. phaseolina*-*P. vulgaris*. Se presenta el gráfico de amplificación después de la ejecución del protocolo de preamplificación de la muestra de interacción Pinto Saltillo-*M. phaseolina* (PS75+) 42 horas después de establecida la infección. Se incluyó un control sin transcriptasa reversa (PS75-). De acuerdo a lo que se observa, se puede concluir que el protocolo de preamplificación no es de utilidad dado que magnifica la interferencia generada por el ADNg contaminante que persiste en cantidades menores luego del tratamiento con TurboDNAsa. El panel inferior muestra los resultados obtenidos con el ensayo TaqMan® para detección de GAPDH, en donde se aprecia claramente que la interferencia generada obedece a que las muestras se amplificaron específicamente a través del uso de los oligonucleótidos ODC, razón por la cual solo es posible discriminar el origen de la amplificación en el ensayo con el gen constitutivo.

8. DISCUSIÓN

El estudio de los mecanismos de patogenicidad y virulencia en hongos fitopatógenos reviste particular interés, si se tiene en cuenta que menos del 10% de las aproximadamente 100,000 especies conocidas de hongos, son capaces de infectar plantas (Knogge, 1996). Resulta conveniente entonces dilucidar qué es lo que diferencia esa pequeña minoría de los otros hongos, principalmente saprófitos. Se han postulado tres posibles respuestas: los hongos saprófitos y los patógenos comparten el mismo set de genes, pero algunos de estos son diferencialmente regulados; los patógenos han sido dotados de genes que los habilitan para ser infectivos; o coexisten estas dos posibilidades (Schafer, 1994). El advenimiento de la era genómica por su parte, ha permitido ampliar el panorama a este respecto, en tanto que favorece la investigación experimental de los genes con técnicas altamente resolutivas que permiten incluso la identificación completa de grupos de genes involucrados en vías de transducción de señales necesarias para la detección del entorno del hospedero, o de genes que controlan rutas metabólicas que conducen a patogenicidad, entre otros (Yoder y Turgeon, 2001).

La Ornitina descarboxilasa (ODC) es una enzima clave en la ruta biosintética de las poliaminas, moléculas ampliamente descritas por su participación en múltiples procesos celulares incluyendo condensación de la cromatina; mantenimiento de la estructura del ADN; procesamiento del RNA; traducción y activación de proteínas (Childs *et al.*, 2003). Se ha establecido también una clara asociación entre la biosíntesis de las poliaminas y fenómenos biológicos de crecimiento, desarrollo y diferenciación (Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

El papel de la ODC en hongos ha sido ampliamente estudiado. Se han identificado, caracterizado y generado mutantes de este gen en cepas de *Sacharomyces cerevisiae* (Fonzi y Sypherd, 1987), *Neurospora crassa* (Williams *et al.*, 1992) y *Yarrowia lypolitica* (Jiménez-Bremont *et al.*, 2001); en hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* (Madrigal-Pulido *et al.* 2011) y algunos fitopatógenos como *Ustilago maydis* (Guevara-Olvera *et al.*, 1997) y *Stagonospora (Septoria) nodorum*, un

patógeno del trigo en donde se demostró por primera vez el papel de la ODC en la virulencia (Bailey *et al.*, 2000) .

Las bases moleculares del proceso patogénico de *M. phaseolina* no han sido dilucidadas completamente. La secuenciación del genoma de este patógeno (Islam *et al.*, 2012) constituye el esfuerzo más significativo por comprender el mecanismo infectivo de este necrótrofo de alto impacto para la agricultura, dada su elevada persistencia y amplio espectro de hospederos; no obstante, se necesitan estrategias experimentales basadas en las interacciones planta-*M. phaseolina* que permitan entender el mecanismo patogénico desde la perspectiva integral del patosistema.

El estudio del proceso infectivo de *M. phaseolina* en *P. vulgaris* resulta una alternativa atractiva si se tiene en cuenta la versatilidad y facilidad adaptativa de esta leguminosa, que le permite desarrollarse en una variedad de climas y condiciones agronómicas adversas, tales como sequía, estrés salino y estrés por calor, entre otras, que favorecen la infección por *M. phaseolina* (Radwan *et al.*, 2013; Mayek-Pérez *et al.*, 2002; Wortmann, 1998), así como también por la facilidad de manipulación *in vitro* de este organismo.

La identificación *in silico* de los genes que codifican para todas las enzimas reguladoras del metabolismo de las poliaminas, descritas en otros organismos, en el genoma de *M. phaseolina* (Roa-Cordero y Rosas-Quijano, 2013), constituye una evidencia del papel esencial de estos metabolitos y sugiere una posible relación con el proceso patogénico y la virulencia de este necrótrofo, teniendo en cuenta que la habilidad de los hongos patógenos para modular el ciclo celular y la morfogénesis es un factor determinante para el éxito de la infección (Martín y Di Pietro, 2012).

El aislamiento y caracterización molecular del gen ODC de *M. phaseolina* permitió demostrar experimentalmente que el marco de lectura abierto de esta proteína predice una enzima de mayor tamaño a la anotada en el banco de datos del NCBI para este organismo. La clonación y secuenciación de esta región permitió la predicción de una proteína de 325aa, homóloga con ODCs pertenecientes a otros patógenos fúngicos.

Aunque el tamaño de la proteína es considerablemente menor al de otras ODCs, se identificaron los dominios característicos de las proteínas pertenecientes a la subfamilia de enzimas ornitina decarboxilasas dependientes de piridoxal fosfato tipo III (PLPDE III), que está compuesta principalmente por proteínas ODCs de eucariotas, proteínas tipo ODC de procariontes y proteínas homólogas de ODC sin actividad catalítica, tales como el inhibidor de la antienzima (AZI) y el parálogo de la ODC (ODC-p), presente en tejido testicular y cerebral de mamíferos exclusivamente. Los miembros de esta familia se caracterizan por exhibir un dominio N-terminal tipo barril TIM y un dominio C-terminal tipo beta-sandwich, indispensables para la formación del sitio activo de los homodímeros. Así mismo, se identificó la región de unión al cofactor y el motivo canónico reconocido como la secuencia típica 2 de la familia 2 de las descarboxilasas, que se caracteriza por presentar tres residuos de glicina seguidos, y que ha sido postulada como parte de la región de unión al sustrato (Moore y Boyle, 1996).

Aunque se identificaron posibles secuencias PEST, los índices de predicción fueron muy bajos. Estas regiones ricas en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) son características de proteínas de alto recambio y típicamente se ubican en el extremo C-terminal, aunque pueden estar distribuidas en cualquier lugar de la cadena polipeptídica. Se ha postulado que algunas de éstas pueden ser señales proteolíticas constitutivas, sin embargo, otras son señales condicionales que pueden ser activadas por diferentes vías (Rechsteiner y Rogers, 1996).

En mamíferos, el proteasoma 26S debe reconocer una región PEST ubicada en la porción C-terminal del cada uno de los monómeros de la ODC para proceder con su degradación (Olmo *et al.*, 1999). Se trata de una región de 37 aminoácidos identificada originalmente en la ODC del ratón, que es altamente conservada entre vertebrados y que se comporta como una señal de degradación transplantable y funcional en especies de invertebrados, incluidos los hongos (Takeuchi *et al.*, 2008; Hoyt *et al.*, 2003 Ghoda *et al.*, 1989).

La presencia de dominios PEST ha sido reportada para varias proteínas ODC fúngicas: se identificaron en *Yarrowia lypolipitica* (Jiménez-Bremont *et al.*, 2001) y *Ustilago maydis* (Guevara-Olvera *et al.* 1997), aunque con bajos índices de predicción, como en este caso. Se identificó una única secuencia PEST en *S. cerevisiae* (Fonzi y Sypherd, 1987); y dos en *Neurospora crassa* (Williams *et al.* 1992); la ODC de *Metarizhium anisopliae* también exhibió estos dominios característicos (Madrigal-Pulido *et al.* 2011); No obstante, no todas las ODC de hongos reportadas contienen motivos PEST, otros hongos como *Paracoccidioides brasiliensis* (Niño-Vega *et al.* 2004), *Stagonospora nodorum* (Bailey *et al.*, 2000) y *Coccidioides immitis* (Guevara-Olvera *et al.* 2000), adolescen de estas regiones.

Si los probables dominios PEST identificados en la ODC de *M. phaseolina* son o no funcionales, es materia de debate, dado que se desconoce a ciencia cierta, si el papel de las regiones PEST en la regulación de la ODC de los hongos es similar al descrito para mamíferos previamente (Hayashi y Murakami, 1995).

No debe perderse de vista sin embargo, que desde que el mecanismo de regulación postraduccional de la antienzima se describió en *Schizosaccharomyces pombe* (Ivanov *et al.*, 2000), se han identificado ortólogos de la AZ en otros hongos tales como *S. cerevisiae*, *Pneumocystis carinii*, *Botryotinia fuckeliana*, *Emericella nidulans*, *Schizosaccharomyces japonicum* y *Schizosaccharomyces octosporus* (Ivanov *et al.*, 2000a), lo que hace factible la posibilidad de que este mecanismo opere de manera similar en *M. phaseolina*, maxime si se tiene en cuenta que esta proteína ya ha sido predicha en el genoma de la cepa MS6.

No obstante, la identificación *per se* de la AZ no constituye evidencia suficiente para demostrar la funcionalidad de las regiones PEST en la proteólisis de la ODC. El estudio de la señal de degradación (degron) de la ODC en *S. cerevisiae* por ejemplo, demostró que ésta reside en una extensión de la región N-terminal, ausente en la ODC de mamíferos, y que es esencial para su degradación proteolítica independiente de ubiquitinación, mediada por la Oaz1 (Gödderz *et al.*, 2011). En este caso, logró

demostrarse por medio de mutagénesis sistemática de dominios ricos en serina, treonina y ácido aspártico (identificados como característicos de la extensión N-terminal de la ODC de *S. cerevisiae*), que la función del degron no es dependiente de la secuencia, sino que obedece a la naturaleza desestructurada de este dominio y al contexto estructural adyacente.

Estos hallazgos sugieren una hipótesis alternativa respecto al probable mecanismo de degradación de la ODC en *M. phaseolina*, en cuyo caso, la funcionalidad como señal proteolítica de los dominios PEST identificados, sería debatible.

El análisis comparativo de la estructura primaria de la ODC de *M. phaseolina* con aquéllas de otros hongos deja en evidencia que ésta carece de una región N-terminal homóloga con la de sus contrapartes. Se ha descrito que las extensiones N-terminal de ortólogos de la ODC de levaduras son regiones menos conservadas que el resto de la proteína (Gödderz *et al.*, 2011), lo que resulta consistente con los resultados obtenidos en el presente estudio al comparar entre sí, homólogos de la ODC de *M. phaseolina*. No obstante, debe investigarse si la región N-terminal de esta proteína tiene una función en la proteólisis de la ODC como sucede en *S. cerevisiae* o si por el contrario, el motivo PEST identificado en la región C-terminal corresponde al degron, tal como sucede en el caso de los mamíferos.

La estructura tridimensional de la ODC ha sido previamente caracterizada en ratón (Kern *et al.*, 1999), humano (Almud *et al.*, 2000) y *Trypanosoma brucei* (Grishin *et al.*, 1999). En todos los casos, la estructura está compuesta de dos dominios bien definidos, a saber: un dominio α/β -barril tipo TIM, formado por 8 hélices α y ocho hebras β , y un dominio tipo lámina β (Ramos-Molina *et al.*, 2014). El modelaje molecular de la ODC de *M. phaseolina* basado en proteínas homólogas se hizo tomando como templatado la estructura cristalográfica del ratón, truncada en los 37 residuos aminoacídicos del extremo C-terminal, que como ya se mencionó, están involucrados en la degradación por el proteasoma 26S. Esta particularidad no afecta el modelamiento ya que la ODC de *M. phaseolina*, por ser de un tamaño considerablemente menor, adolece de regiones

homólogas en ambos extremos y porque el templado, pese a su estabilidad, retiene su actividad catalítica (Ghoda *et al.*, 1989).

La estructura de la ornitina descarboxilasa es similar entre los eucariotas, su forma catalíticamente activa es la de un homodímero ya que el sitio activo está compuesto por residuos de ambos monómeros (Kern *et al.*, 1999). Como era de esperarse, el modelo construido fue muy similar al de la ODC del ratón, principalmente en la configuración del dominio tipo lámina β . Se pueden apreciar hélices α alternando con hebras β , que se corresponden con aquéllas presentes en la ODC del ratón a partir del residuo aminoacídico Lys101, donde comienza la homología. Debido a que la ODC de *M. phaseolina* carece de una extensión N-terminal que se corresponda con su contraparte en la ODC del ratón, no se puede apreciar la configuración característica del barril tipo TIM, aspecto que constituye la diferencia más considerable entre ambas estructuras.

La comparación por superimposición de los monómeros modelados por el servidor I Tasser y el programa Modeller dejaron en evidencia la similitud de los modelos, pese a que se emplearon templados distintos en cada caso, lo que hace más robusto el modelo propuesto.

Actualmente, no existen estructuras cristalográficas descritas para la ODC de hongos filamentosos, razón por la cual el modelaje por homología constituye una alternativa clave para el desarrollo de estudios de acomplamiento (*docking*) y dinámica molecular, perfilados al diseño y evaluación de inhibidores de la ODC, lo que puede ser una aproximación promisoría para el control de la pudrición carbonosa en distintos hospedantes.

Las características asociadas a la proteína predicha, la homología con otras ODCs, así como la similitud estructural que se predice a partir del modelamiento tridimensional ejecutado, apoyan la hipótesis de que la secuencia analizada corresponde a la ODC de *M. phaseolina*, sin embargo es imperativo determinar la función de la secuencia aislada por medio de otros análisis.

Teniendo en cuenta que en la actualidad no existe un sistema de transformación genética para este organismo, el cual permitiría generar mutantes por recombinación homóloga para corroborar la actividad enzimática del fragmento identificado, la complementación de mutantes nulas de la ODC resulta la alternativa más atractiva. Lo anterior, no pudo llevarse a cabo durante la ejecución del presente estudio debido a la dificultad para aislar el ORF del gen a partir de ADNc.

Existen varias hipótesis al respecto que se fueron descartando en el transcurso de la investigación. En primera instancia, se consideraron problemas asociados a la optimización de la reacción de amplificación (McPherson, 2006), razón por la cual se modificaron las condiciones de la reacción, usando diferentes enzimas, concentraciones de magnesio y aditivos para potenciar la reacción; se probó un gradiente de temperatura y diferentes concentraciones del templado; se utilizaron distintos métodos de extracción de RNA, síntesis de ADNc y tratamientos con DNAsa, sin embargo, en ningún caso fue posible amplificar el fragmento de interés. La idoneidad del ADNc sintetizado se corroboró con la amplificación del gen constitutivo GAPDH.

Otro aspecto considerado fue la presencia de un codón de stop alternativo o de una región intrónica adicional, que pudiera ubicarse en la misma posición que los oligonucleótidos utilizados. Esta hipótesis se descartó por medio de un análisis bioinformático que permitió identificar un único codón de parada alternativo, ubicado sobre la región intrónica de 57pb, que fue confirmada por PCR sobre el ADNc sintetizado para el análisis 3'RACE.

La presencia de regiones intrónicas adicionales se descartó, teniendo en cuenta el tamaño de la proteína predicha y que se diseñaron múltiples juegos de cebadores para amplificar fragmentos de la región N y C terminal, probados de manera exitosa durante el análisis RACE.

Aunque la mayoría de hongos exhiben un solo gen homólogo de la ODC, algunos de ellos poseen más de uno. Existen reportes de genes parálogos en el subphylum

Pezizomycotina de los hongos Ascomycetos, en donde se ubica taxonómicamente *M. phaseolina*. Se ha descrito que los niveles de expresión de estos genes son divergentes, encontrándose en general, que uno de los parálogos se expresa muchas veces más que los otros, lo que a grandes rasgos se ve representado en el número de etiquetas de expresión génica (EST) identificadas en la secuencia (Ivanov *et al.*, 2010).

Es importante considerar, en el marco de esta hipótesis, la probabilidad de que la secuencia homóloga aislada sea inactiva catalíticamente. Aunque no existen reportes experimentales que demuestren la presencia del inhibidor de la antienzima (AZI) en hongos, es bien conocido el papel de esta proteína en la regulación de la proliferación celular y de la ruta biosintética de poliaminas en otros eucariotas. El AZI ha sido descrito como un homólogo de la ODC que ha perdido su capacidad de descarboxilar la ornitina, pese a que conserva todos los residuos necesarios para la actividad ODC, exhibiendo con ésta última, homología del 65% (Kim *et al.*, 2006). Para dilucidar este aspecto, se calculó una matriz de distancias a partir de las secuencias aminoacídicas de 10 vertebrados en los que se ha caracterizado el AZI y se encontró que la secuencia más relacionada, correspondiente a *Gallus gallus*, solo comparte un porcentaje de homología del 38%, razón por la cual se considera poco probable que esta sea la explicación a los hallazgos de la presente investigación. No obstante, resulta conveniente analizar filogenéticamente la secuencia aislada, tomando como referentes proteínas homólogas de la ODC de organismos eucariotas en los que se haya descrito la presencia de la AZ, para evaluar la presencia de los residuos aminoacídicos claves para la reacción de descarboxilación de la ornitina. Esta aproximación, podría resultar de utilidad para dilucidar si la secuencia identificada en la cepa HMP05 tiene características propias de un homólogo de la ODC inactivo catalíticamente, tal como lo hicieron Ivanov y colaboradores en el 2010.

El análisis de la región promotora de *M. phaseolina* por su parte, permitió la identificación de dominios de unión a factores de transcripción que dan luces a cerca de las funciones de las poliaminas en este organismo. Debe dejarse en claro sin embargo, que la presencia en sí misma de estas regiones, no implica que sean funcionales, pero

posibilitan la disertación a cerca de las implicaciones de la ODC en la biología del microorganismo y su probable injerencia en el patosistema.

Interesantemente, se predijeron dominios de unión a factores de transcripción, que median la regulación de los genes por pH, uno de los factores fisicoquímicos más importantes del ambiente, que afecta el crecimiento celular y el desarrollo (Cervantes-Chávez *et al.*, 2010). Para sobrevivir y proliferar, los microorganismos deben adaptarse al pH de su entorno, lo que demanda no solo la existencia de un sistema de homeóstasis interno que les permita tolerar el amplio rango de pH ambiental, sino también un medio para garantizar que aquellas moléculas directamente expuestas al ambiente, tales como permeasas, enzimas secretadas y metabolitos exportados, sean sintetizadas a los valores de pH que les permiten ser funcionales (Peñalva *et al.*, 2008).

Los patógenos fúngicos han desarrollado diversas estrategias para reconocer, penetrar e invadir a sus hospederos. El éxito de la infección depende en gran medida de la capacidad de respuesta del patógeno a señales físico-químicas provenientes del hospedante, a través de la regulación de la expresión de sus genes (Caracuel *et al.*, 2003). La capacidad de respuesta al pH, es solo uno de los componentes de un complejo set de características que debe enfrentar el microorganismo para colonizar e invadir su blanco hospedador, con ayuda de factores de patogenicidad secretados (Prusky y Yakoby, 2003). El mecanismo más importante de control de esta función en hongos es la conocida vía de transducción de señales Pal/Rim, que conduce a la activación proteolítica de un factor de transcripción tipo dedos de zinc conocido en las levaduras como Rim101 y PacC, en hongos filamentosos (Orejas *et al.*, 1995; Su y Mitchell, 1993).

PacC es un regulador de genes expresados en condiciones alcalinas y un represor de aquéllos que se expresan en condiciones ácidas; para su activación es sometido a dos procesamientos proteolíticos, uno de los cuales es dependiente de la señal de pH y el otro, proteasomal. A diferencia del PacC, su homólogo en levaduras, Rim101 actúa como un represor que es sometido a una única ronda proteolítica. Además del *PacC*, la

regulación del pH es mediada por 6 genes adicionales, a saber: *pala*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* y *palI*. La generación de mutantes de estos genes conduce a la obtención de fenotipos que mimetizan condiciones de alcalinidad, acidez o incluso, neutralidad y que permiten determinar el papel de los miembros de la familia Pal/Rim y las particularidades de su mecanismo de acción.

Se han identificado múltiples funciones y genes regulados por PacC en diferentes hongos, muchos de los cuales son indispensables para la patogenicidad o virulencia. En *Colletotrichum gloeosporioides* por ejemplo, se demostró que la expresión del gen *PelB*, el cual codifica para una pectato liasa, es controlada por el factor de transcripción PacC, en condiciones alcalinas. El producto del gen *pelB* es una enzima degradadora de la pared celular (CWDE) considerada esencial para la virulencia (Miyara *et al.*, 2008).

Cepas mutantes de *Fusarium oxysporum*, con pérdida parcial de la función PacC (*PacC^{+/-}*), exhiben ligeros incrementos en su virulencia en comparación con el fenotipo salvaje y con mutantes merodiploides de expresión constitutiva (*PacC^c*), las cuales generan retraso en la progresión de la enfermedad en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Estos hallazgos son atribuibles a la probable represión transcripcional de genes expresados bajo condiciones de acidez, importantes para el desarrollo de la infección, tales como *pg1* y *pg5*, productores de endopoligalacturonasas. Lo anterior, ha permitido describir a PacC como un regulador negativo de la virulencia en este fitopatógeno. (Caracuel *et al.*, 2003).

Así mismo, se han identificado genes regulados por PacC en *Aspergillus nidulans*, los cuales codifican enzimas de secreción; permeasas y enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos exportados (Peñalva y Arst, 2002).

La vía Rim101 también regula la expresión de genes importantes para la virulencia de *C. albicans*, un hongo dimórfico oportunista cuya transición al estado micelial se ve estimulado por cambios de pH. Se ha descrito la inducción de genes relacionados con el crecimiento de la hifa; codificadores de adhesinas como Als3 o mediadoras de la

invasión, tales como Sap5p, que codifica una proteasa degradadora de E-cadherina. Rim101 también regula la expresión de genes que determinan la composición de la pared celular (Nobile *et al.*, 2008) y genes como PH1 y PH2, que siendo funcionalmente homólogos, son regulados diferencialmente a través de esta ruta, en una respuesta adaptativa al pH del nicho hospedador, que gobierna la virulencia (De Bernardis *et al.*, 1998).

Pal/Rim es una vía altamente conservada en Ascomicetos pero identificada también en algunos fitopatógenos Basidiomicetos como *U. maydis*, en donde por contraste, Rim101 no tiene un papel detectable durante la infección de la planta (Cervantes-Chávez *et al.*, 2010). De acuerdo a lo anterior, se puede precisar que pese a que el pH es un reconocido modulador de la virulencia, las funciones particulares de Rim101/PacC en la patogénesis, varían significativamente (Nobile *et al.*, 2008).

La identificación de un TFBS para PacC en la región promotora de la ODC de *M. phaseolina* tiene interesantes implicaciones si se considera que el pH actúa como una señal clave para el crecimiento, diferenciación y virulencia de los patógenos fúngicos de humanos, insectos y plantas, (Alkan *et al.*, 2013; Caracuel *et al.*, 2003; Eshel *et al.*, 2002; De Bernardis *et al.*, 1998), eventos en los que las poliaminas tienen diversas funciones (Jiménez-Bremont *et al.*, 2001; Bailey *et al.*, 2000; Guevara-Olvera *et al.*, 1997; Ruiz-Herrera, 1994.).

Derivado de su variabilidad genética (Su *et al.*, 2001), morfológica (Mayek-Perez *et al.*, 1997) y patogénica (Mihail y Taylor, 1995), *M. phaseolina* exhibe una habilidad adaptativa que le permite colonizar un amplio espectro de hospederos y sobrevivir a distintos estreses abióticos, que en general, operan como factores que conducen a la patogénesis. Los rangos de pH óptimos para el crecimiento de este fitopatógeno han sido descritos por múltiples investigadores. Kaur y colaboradores reportaron en 2013, variaciones en la acumulación de biomasa de aislamientos de la India, provenientes de cultivos de frijol de palo (*Cajanus cajan* L.), a diferentes pH evaluados. El rango de pH al cual se observó una acumulación de biomasa máxima varió entre 6.0 y 7.0, similar a

lo reportado previamente en oca (*Abelmoschus esculentus*) (Jha y Dubey, 2000). No obstante, aislamientos de girasol provenientes de Hungría crecieron adecuadamente en un rango de pH más amplio, que osciló entre 4.0 y 6.0 (Csöndes *et al.*, 2012).

Sobre esta base es posible afirmar que *M. phaseolina* se adapta a un amplio rango de pH y sugerir la probable existencia de un mecanismo de regulación genética diferencial, mediado por PacC, que debe ser estudiado en sus hospederos. Debe tenerse en cuenta además, que *M. phaseolina* es un polífago y que su genoma contiene un elevado porcentaje de proteínas secretadas, si se le compara con otros patógenos de plantas (Islam *et al.*, 2012), evidencia que soporta la hipótesis de que este organismo puede ejercer un mecanismo de activación selectiva de genes, mediado por el pH ambiental, que le permite colonizar diversos hospederos, lo que equivale a decir que puede activar una batería enzimática particular así como genes de virulencia, de acuerdo a las características de sus hospedantes, tal como ha sido propuesto para explicar las interacciones planta-microorganismo, en otros patógenos fúngicos (Prusky y Yakoby, 2003).

Otro aspecto interesante a este respecto está relacionado con dilucidar si *M. phaseolina* tiene la capacidad para modificar el nicho hospedador de modo que se favorezca la expresión diferencial de los genes de patogenicidad o de aquéllos requeridos para la supervivencia, de acuerdo a las condiciones ambientales circundantes. Un ejemplo característico de este mecanismo es ilustrado por *C. gloeosporioides*, el cual secreta amonio en orden de alcalinizar el medio circundante, para garantizar la expresión de genes como *pelB*, mediada por PacC (Alkan *et al.*, 2013). En otros hongos como *C. higginsianum*, *C. graminicola*, *Alternaria alternata*, *Neurospora crassa*, *A. fumigatus*, *Candida albicans* y *Metarhizium anisopliae* también ha sido descrito este mecanismo (O'Connell *et al.*, 2012; Eshel *et al.*, 2002; De Bernardis *et al.*, 1998; St Leger *et al.*, 1999; Sikora y Marzluf., 1982).

Botrytis cinerea, *S. sclerotiorum* y algunas especies del género *Penicillium* por el contrario, producen acidificación de los tejidos durante su ataque, el cual es potenciado

por la acumulación de ácidos orgánicos y/o excreción de hidrogeniones (H⁺) (Prusky y Yakobi, 2003). Brandao y colaboradores demostraron en 1992 la habilidad de *F. Oxysporum* para acidificar el pH extracelular por activación de la enzima de membrana plasmática H⁺-ATPasa. Este hongo también secreta ácido fusarico, el cual se encuentra directamente relacionado con la patogénesis (Davis, 1969). Debe recordarse que de los 14.249 genes de *M. phaseolina*, el 54.1% es compartido con *F. oxysporum*, lo que puede reflejar la existencia de estrategias comunes para infectar un considerable número de hospederos (Islam *et al.*, 2012).

Consistentemente, se encontraron también TFBSs para HAL9 y MOT3, relacionados con tolerancia al estrés salino y al estrés hiperosmótico, respectivamente. Hal9 es un factor transcripcional originalmente identificado en *S. cerevisiae* que está relacionado particularmente con la tolerancia a concentraciones tóxicas de iones litio (Li⁺) y que actúa como un factor transcripcional positivo para el gen *ENAI/PMR2A*, el cual codifica para una ATPasa putativa necesaria para el eflujo de iones sodio (Na⁺) y Li⁺, bajo condiciones fisiológicas principalmente (Mendizabal *et al.*, 1998).

Se ha documentado que otro activador (no relacionado con HAL9) de *ENAI/PMR2A* es la bien tipificada ruta de transducción de señales HOG-MAPK, un elemento clave en la adaptación al estrés osmótico cuyos componentes también tienen una participación importante en la morfogénesis y virulencia de algunos patógenos fúngicos (Ma y Li, 2013). Se trata de un sistema de señalización que termina en la activación de Hog1 MAPK, conduciendo a la inducción de genes requeridos para responder al osmoestrés, a través de la coordinación de un complejo transcripcional en el núcleo (De Nadal y Posas, 2010).

MOT3 por su parte, es un represor transcripcional de genes hipóxicos, que junto a Hog1 MAPK, son esenciales para regular negativamente la función de genes *ERG*, involucrados en la biosíntesis de ergosterol (Hongay *et al.*, 2002), generando como consecuencia, una depleción de los niveles totales de esteroides al interior celular, lo que es necesario para la osmoadaptación. La inhibición del ergosterol en *S. cerevisiae* le

confiere una ventaja para crecer a altas concentraciones salinas. La generación de dobles mutantes de MOT3 Y ROX1, un factor transcripcional sinérgico al primero, genera acumulación de Na⁺ bajo estrés salino (Montañés *et al.*, 2011).

La función principal de las poliaminas es la de reestablecer la homeóstasis celular que permita la supervivencia bajo condiciones estresantes (Valdés-Santiago y Ruiz-Herrera, 2013), razón por la cual no resulta sorprendente el hallazgo de TFBSs en la región promotora de la ODC relacionados con respuestas a diferentes tipos de estrés; sin embargo, la función particular de cada una de las poliaminas no ha sido estudiada a profundidad y pese a que los hongos ofrecen un excelente modelo de estudio para tal propósito, la información disponible al respecto no es suficiente para comprender particularmente, el mecanismo por medio del cual estas poliaminas modulan la expresión de los genes bajo condiciones estresantes.

Existen sin embargo, algunos estudios que demuestran de manera fehaciente la relación directa de estos metabolitos con respuestas adaptativas a diferentes tipos de estrés. Es así como la generación de cepas mutantes por disrupción de los genes *odc* y *pao*, que codifican para las enzimas ornitina descarboxilasa y poliamina oxidasa, respectivamente, en *U. maydis*, permitió la generación de cepas mutantes Δpao y mutantes dobles $\Delta odc/pao$ que pusieron en evidencia el papel de la putrescina en la tolerancia al estrés iónico y osmótico. Valdés-Santiago y colaboradores observaron en 2010, que únicamente las mutantes $\Delta odc/pao$ exhiben fenotipos sensibles a las condiciones estresantes evaluadas (1M NaCl, 10mM LiCl, o 1M sorbitol).

Así mismo se han analizado las respuestas a concentraciones osmóticas elevadas (1M KCl y 0.3mM SDS) con mutantes del gen que codifica para la espermidina sintasa (*spd*) y dobles mutantes $\Delta odc/spd$, en *U. maydis*. En ambos casos se observó inhibición de la tasa de crecimiento. Estos resultados ponen de manifiesto el papel de la espermidina en la protección de las membranas celulares durante el estrés osmótico (Valdés-Santiago *et al.*, 2009).

La literatura es mucho más vasta en la documentación de la función de las poliaminas en respuesta al estrés abiótico en otros sistemas, particularmente en plantas (Gupta y Gupta, 2013). Se ha propuesto además, que las poliaminas pueden estar relacionadas con resistencia a patógenos, dados los cambios observados en las poliaminas libres y su catabolismo durante el establecimiento de las interacciones (Walters, 2003), lo que resulta interesante desde la perspectiva de la relación *planta-M.phaseolina*.

Debe recordarse que el establecimiento del patosistema consiste en la generación de una asociación finamente regulada, que se caracteriza por la dependencia metabólica del patógeno hacia su hospedero y cuyo éxito depende en gran parte, de la aptitud metabólica del patógeno para explotar y modificar la fisiología del hospedador, en aras de la obtención de nutrientes, así como también de su habilidad para adaptar su propia maquinaria metabólica para el aprovechamiento de los nutrimentos que se hagan disponibles durante la interacción (Divon y Fluhr, 2007).

En este contexto, se puede citar otro ejemplo relacionado con los perfiles de expresión observados en *Fusarium graminearum* durante la infección en plantas de cebada (Guldener *et al.*, 2006). El análisis del transcriptoma de este fitopatógeno reveló una coordinada expresión de genes relacionados con la adquisición de nutrientes durante el proceso infectivo, tales como transportadores de azúcares y compuestos nitrogenados, dentro de los que se incluye un transportador de ornitina que se expresó 2 días después de la infección. La captura de ornitina fue seguida por la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de prolina, arginina y putrescina, dentro de los cuales se encontró el gen ODC. Lo anterior es consistente con las observaciones de Bailey y colaboradores en 2000, quienes reportaron la pérdida de la virulencia en una cepa auxotrofa de putrescina de *S. nodorum*, como se mencionó al comienzo de este apartado.

El estrés hiperosmótico tiene otros efectos sobre el desarrollo y la diferenciación. Se ha documentado que éste es uno de los estímulos ambientales que frecuentemente disparan la conidiación (Duran *et al.*, 2010). El análisis de la región promotora de la ODC de *M. phaseolina*, permitió predecir además, un dominio de unión al factor de transcripción

IME1, que tiene un papel decisivo para el inicio de la meiosis y la esporulación en *S. cerevisiae*. La expresión de IME1 y la esporulación responden en paralelo a las señales nutricionales, que son bloqueadas en presencia de glucosa y nitrógeno (Mandel *et al.*, 1994; Su y Mitchell, 1993).

La conidiogénesis y la germinación de esporas son otros de los procesos regulados por las poliaminas (Ruiz-Herrera, 1994). Mutantes del gen *spe* del hongo dimórfico oportunista *Penicillium marneffe* mostraron defectos en la patogénesis, conidiogénesis, germinación de esporas y crecimiento (Aksarakorn *et al.*, 2013).

Otras evidencias han sido recabadas mediante el análisis de los niveles de poliaminas en conidias frescas de *M. oryzae*, los cuales indicaron la existencia de títulos elevados de poliaminas que decrecieron durante el proceso de germinación. Se determinó que las poliaminas más abundantes en estas estructuras fueron la espermidina y la espermina (Choi *et al.*, 1997). Los resultados de este estudio, fueron contrastantes con los reportados para el hongo *Mucor racemosus*, en cuyas esporas fueron detectados bajos niveles de poliaminas y una elevada actividad ODC durante la germinación (Inderlied *et al.*, 1980).

El proceso de conidiación y su relación con las poliaminas también ha sido estudiado en *Aspergillus flavus*, modelo en el que se determinó la importancia de la espermidina para el proceso de diferenciación celular y el desarrollo de las conidias bajo el ciclo de microconidiación, tal como fue detallado en otro apartado (Khurana *et al.*, 1996).

Una particularidad de *M. phaseolina* es la formación de picnidios y conidias sobre ciertos hospederos, que constituye en sí mismo un mecanismo de potencial transmisión aérea o por semillas (Pratt *et al.*, 1998). El hallazgo de un factor transcripcional modulador de este proceso sobre la ODC, constituye una evidencia adicional de que el estrés osmótico puede disparar rutas metabólicas reguladoras de los eventos morfogénicos, en los que las poliaminas tienen amplias implicaciones y que en el caso particular de *M. phaseolina*, podrían significar un mecanismo alternativo de

supervivencia que le permite diseminarse por vía aérea hacia ambientes más favorables que garanticen su persistencia, tal como ha sido sugerido para otros hongos filamentosos (Duran *et al.*, 2010).

Lo anterior, pone en evidencia, la presencia de algunos de los elementos reguladores de la ODC de *M. phaseolina*, que median la expresión de genes en respuesta a diferentes estímulos ambientales y que adquieren relevancia para el proceso patogénico de este necrótrofo en sus múltiples hospedantes, así como también de la estrecha relación que existe entre el metabolismo de las poliaminas y otras rutas de señalización ampliamente descritas.

El estudio del metabolismo de las poliaminas desde una perspectiva global de la fisiología celular permitirá avanzar en el completo entendimiento de los mecanismos de acción de estas moléculas, comprendidos parcialmente en la actualidad. Debe resaltarse que pese al carácter predictivo de estos análisis, el estudio de la región promotora de los genes basado en los sitios de unión a factores de transcripción permite recopilar información que resulta valiosa para determinar las condiciones experimentales de evaluación que serán determinantes para estudios futuros.

Otra de las estrategias abordadas a lo largo de la presente investigación, fue el de la evaluación del impacto de la inhibición química de la ODC sobre el crecimiento vegetativo de *M. phaseolina*, por medio del uso del inhibidor competitivo DAB, que ha sido ampliamente utilizado para evidenciar principalmente la participación de las poliaminas en la transición dimórfica de algunos hongos (Guevara-Olvera *et al.*, 1993; Martínez-Pacheco *et al.*, 1989)

La inhibición de la biosíntesis de la putrescina en *M. phaseolina* con DAB generó una disminución global de la tasa de crecimiento del hongo superior al 50%, efecto que fue dosis dependiente; la exposición del hongo a una concentración 1mM de DAB no alteró significativamente el desarrollo vegetativo de la cepa, contrario a lo observado cuando se utilizaron concentraciones mayores (5mM y 10mM). Pese a que los efectos generados

sobre la tasa de crecimiento por estas dosis fueron estadísticamente diferentes, los efectos inhibitorios observados no distan mucho entre sí, fenotípicamente hablando (inibición del crecimiento de 56 y 57%, respectivamente).

Los resultados obtenidos en este estudio se corresponden con los porcentajes de inhibición del crecimiento vegetativo descritos en *Aspergillus parasiticus*, en donde se evidenció un arresto total del proceso de esporulación y producción de aflatoxinas, que se acompañó de una reducción del crecimiento del 50% (Guzman-de Peña y Ruíz-Herrera, 1997). No obstante, la concentración de DAB necesaria para la obtención de estos efectos fue 100 veces superior a la utilizada en *M. phaseolina* (concentración de DAB empleada en ensayos con *A. parasiticus*: 50mM), lo que revela una evidente sensibilidad de la cepa HMP05 a este compuesto, que podría sugerir la necesidad de grandes cantidades de poliaminas para soportar el crecimiento invasivo en sus hospedantes.

Otros reportes apoyan esta hipótesis. Los estudios en *Y. lipolytica*, por ejemplo, señalan que el uso de concentraciones de DAB en un rango que oscila entre 10 y 20mM o superiores, no genera una inhibición considerable del crecimiento levaduriforme, pese a que estas dosis, e incluso concentraciones mucho menores (<1mM), sí tienen efectos significativos sobre la transición dimórfica del microorganismo, si se adicionan a tiempos adecuados del desarrollo (Guevara-Olvera *et al.*, 1993).

Así mismo, la adición DAB (50mM) fue efectiva para inhibir la transición del estado levaduriforme al micelial en *Mucor rouxii*. No obstante, pese a la alta dosis empleada, el crecimiento (evaluado como peso seco y proteínas totales) no fue alterado (Martinez-Pacheco *et al.*, 1989). En este mismo estudio se evaluó además el efecto del DAB sobre la forogénesis en *Phycomyces blakesleanus* y *M. rouxii*, encontrándose que la adición de la droga (2,5mM), a intervalos específicos de tiempo para cada organismo, inhibe la formación del esporangióforo pero no el crecimiento micelial.

Las observaciones a este respecto en *U. maydis* también difieren de los hallazgos en *M. phaseolina*. Guevara-Olvera y colaboradores reportaron, en 1997, la inhibición de la germinación de teliosporas provenientes de tumoraciones de plantas de maíz en un 97%, por adición de DAB 20mM. Un grado de inhibición similar (88%) fue observado durante la transición al estado micelial, con un impacto mucho menor sobre el crecimiento, que fue reducido solo en un 30%.

Los datos discutidos aquí sugieren que el efecto del inhibidor DAB sobre el crecimiento micelial de *M. phaseolina* es ligado a la interferencia con la síntesis de las poliaminas, sin embargo, se considera conveniente evaluar la actividad enzimática, con la finalidad de excluir la posibilidad de que el DAB pueda tener algún mecanismo de reducción del crecimiento independiente de la ornitina descarboxilasa (que no ha sido documentado), pese a que se juzga poco probable. De no ser así, es posible afirmar que este es el primer reporte en el que la inhibición de la biosíntesis de las putrescina, a concentraciones relativamente bajas (5 y 10mM), reduce el crecimiento micelial, por encima del 50%.

Teniendo en cuenta que las poliaminas son factores de crecimiento, los resultados obtenidos en los estudios del dimorfismo con inhibidores de la ODC han puesto de manifiesto una paradoja, en tanto que es apreciable un efecto diferencial del DAB obtenido sobre los fenómenos de dimorfismo y morfogénesis, que son claramente distinguibles de aquéllos generados sobre el crecimiento y que en algunos organismos, difieren de los obtenidos con otros inhibidores químicos como el DMFO (Guevara-Olvera *et al.*, 1993).

La inhibición química de la ODC en células permeabilizadas permitió demostrar que la acción distintiva de estos compuestos sobre el crecimiento y la diferenciación, está ligada a la distribución de la ODC en al menos dos compartimentos celulares distintos, uno de los cuales puede resultar inaccesible al fármaco. Es importante destacar que el comportamiento de la ODC presente en los diferentes compartimentos, puede variar en algunos organismos (Martínez-Pacheco y Ruíz-Herrera, 1993).

Asumiendo que los efectos observados con DAB en *M. phaseolina* obedecen a la inhibición del metabolismo de las poliaminas exclusivamente y teniendo en cuenta que la predicción de la localización celular de la ODC caracterizada indicó una probable localización citoplasmática del 26%, se puede hipotetizar que en este organismo la poza celular que es más accesible a la droga, puede ser aquélla relacionada con soportar los procesos de crecimiento, indispensables para el colapso del tejido vascular y la necrosis característica de la pudrición carbonosa (Dhingra y Sinclair, 1987).

Para determinar el perfil de expresión de la ODC de *M. phaseolina* durante su interacción con *P vulgaris*, se diseñó un ensayo de patogenicidad que permitió a su vez la valoración microscópica del curso de la infección y su correlación con los síntomas visibles en las plantas. Pocas descripciones morfológicas existen al respecto. Los primeros reportes datan de 1974, cuando Ammon y colaboradores investigaron el proceso de infección en soya, por medio de microscopía electrónica, e identificaron por primera vez, la existencia de una estructura similar al apresorio; Ilyas y Sinclair, en el mismo año, hicieron una valoración similar para evaluar el impacto del envejecimiento de plantas de soya sobre el desarrollo de las lesiones y describieron las características de éstas, identificando la presencia de microesclerocios al interior del xilema, sin abordar el proceso de penetración sobre el cual aun se desconocen detalles. La información obtenida de estos estudios constituye, a la fecha, la única aproximación histológica para describir las características ontogénicas asociadas al proceso infectivo de *M. phaseolina* en algún hospedante; no obstante, estos análisis se basan en una interacción artificial, en la que los investigadores inocularon el hongo directamente sobre los tejidos vegetales, provocando incluso, heridas para favorecer la penetración, en algunos casos.

Teniendo en cuenta las condiciones bajo las cuales se promovió la interacción *M. phaseolina*- *P. vulgaris*, se puede afirmar que el seguimiento microscópico que se hizo en el marco del presente trabajo, constituye un esfuerzo por dilucidar algunas de las características morfológicas de este patosistema, sin embargo, siendo conscientes de las limitaciones de la técnica de visualización empleada (Bressano *et al.*, 2010), se preservaron unidades experimentales correspondientes a cada tratamiento en cada uno

de los puntos de la cinética considerados, así como plantas control sometidas a las mismas condiciones experimentales, con el propósito de fijar las estructuras para un futuro análisis por microscopía electrónica, estrategia que sin duda alguna resultará más informativa.

Existen por su puesto, otras estrategias moleculares como el uso de la proteína verde fluorescente que resultan aún más atractivas para este propósito y que permitirán adquirir información relevante a cerca de los mecanismos de penetración en el hospedero, con la posibilidad de correlacionarlos con algunas cascadas de señalización que pueden interactuar con el metabolismo de las poliaminas, tales como las MAPK, que han sido descritas en otros fitopatógenos y sobre las cuales existe evidencia en el genoma de *M. phaseolina* (Di Pietro *et al.*, 2001).

Los resultados del análisis de expresión en tiempo real no son concluyentes, dadas las dificultades operativas e inherentes al organismo en estudio, que impidieron validar la cuantificación de los genes ODC y GAPDH en el mismo rango dinámico de detección.

Existen varias consideraciones que se hicieron a este respecto. En primera instancia se evaluó la especificidad del ensayo TaqMan® ODC, verificando la existencia de un producto específico de PCR en el gel de agarosa; la formación de dímeros o artefactos no fue considerada, teniendo en cuenta los resultados obtenidos al procesar controles negativos y verificar su patrón de corrimiento electroforético. Así mismo, se corroboró la idoneidad del ADNc sintetizado por medio de la amplificación específica del gen constitutivo.

Aunque la validación de las mediciones en tiempo real no pudieron ejecutarse, los resultados observados durante el procesamiento de muestras al azar provenientes de diferentes tiempos de la interacción, así como de algunos controles, sugieren que no existen fluctuaciones transcripcionales significativas durante el periodo de tiempo evaluado, que coinciden con lo reportado por otros autores durante la transición dimórfica de *Ustilago maydis* (Guevara-Olvera *et al.*, 1997); *Candida albicans* (López *et al.*, 1997) y *P. brasiliensis* (Niño-Vega *et al.* 2004). La característica común de estos reportes es el hallazgo de incrementos transitorios de la actividad ODC con niveles

constantes de RNAm, que ponen en claro la operación de un mecanismo de regulación post-traducciona l durante la diferenciación celular de estos microorganismos. Este fenómeno ha sido interpretado por Niño-Vega y colaboradores en el año 2004, como un efecto epigenético que podría tener diferentes inductores en cada caso (cambios de temperatura, pH, etc) y que de acuerdo a nuestros hallazgos, se encuentran en directa correspondencia con los resultados del análisis de la región promotora de la ODC en la cepa HMP05.

Este comportamiento sin embargo, no es universal. En *N. crassa* por ejemplo, la fluctuación de la actividad enzimática de la ODC se corresponde con la abundancia del RNAm del gen SPE1 (Williams *et al.*, 1992).

El estudio de la ODC en *M. anisopliae* (*MaODC1*) durante la interacción con *Plutella xylostella* permitió identificar fluctuaciones del gen a lo largo del proceso de infección por medio de RT-PCR, que se expresa predominantemente durante el crecimiento invasivo, cuando el hongo se mueve al interior del insecto (Madrigal-Pulido *et al.*, 2011).

Lo anterior, refleja las particularidades de los mecanismos de regulación del metabolismo de las poliaminas, así como también de los requerimientos de estos metabolitos para el desarrollo de los procesos morfogenéticos que en hongos patógenos, generalmente, están relacionados con la virulencia.

Una alternativa útil para dilucidar cuál es el mecanismo de regulación predominante que opera para la ODC de *M. phaseolina* y si ésta tiene relación con la patogenicidad o virulencia en *P. vulgaris*, es verificar la expresión del gen durante las etapas infectivas, mediante un análisis tipo Northern blot, que combinado con una técnica de medición de la actividad enzimática, permitirá definir claramente este aspecto.

La ejecución del ensayo Northern blot en el caso particular que nos atañe, resulta ideal porque además de la identificación del gen en las muestras recolectadas, permitirá

confirmar el tamaño del transcrito y el número de transcritos asociados a la secuencia de la sonda que se diseñe, lo que resulta de utilidad para valorar la probable existencia de un mecanismo de *splicing* alternativo, que pueda explicar las dificultades sorteadas durante la caracterización de la región UTR 5 y los ensayos de expresión por qRT-PCR. No obstante, debe tenerse en cuenta que la ejecución del Northern blot demanda la utilización de grandes cantidades de RNA (Freeman *et al.*, 2000), razón por la cual la cuantificación en tiempo real, bajo los esquemas de validación adecuados, resulta una técnica más sensible para la valoración de genes de bajo número de copias (Huggett *et al.*, 2005).

De acuerdo a lo anterior se considera necesario ejecutar el análisis de hibridación como una estrategia de confirmación de los resultados de la qRT-PCR, previa normalización de la técnica, para lo cual pueden considerarse varias estrategias, una de las cuales podría consistir en incrementar la cantidad de ADNc de la ODC en las muestras recolectadas, por medio de un protocolo de preamplificación específica (TaqMan® PreAmp Master Mix Kit), lo cual exige rediseñar los oligonucleótidos y sondas, en aras de eliminar la interferencia de cantidades traza de ADNg que puedan estar presentes en algunas de las muestras.

Resulta interesante también, considerar la posibilidad de implementar técnicas de extracción de RNA mensajero (Sambrook, 2001) que puedan mejorar el rendimiento de los ensayos para determinar si existen o no, fluctuaciones en la expresión del transcrito de la ODC, a lo largo del ciclo infectivo de *M. phaseolina* en *P. vulgaris*.

Finalmente debe mencionarse que pese a la dificultad para analizar el perfil de expresión del gen ODC, los resultados consignados en el presente documento constituyen un aporte significativo al conocimiento de las bases moleculares del metabolismo de las poliaminas en *M. phaseolina*, que si bien no permiten aseverar de manera contundente que la ODC sea un factor de patogenicidad en este organismo, si permiten demostrar de manera general las múltiples implicaciones de la ODC en los procesos celulares y en la

respuesta adaptativa al ambiente, tan característica de este fitopatógeno, y que sin duda alguna, potencian su virulencia.

9. CONCLUSIONES

Se identificó y caracterizó molecularmente el gen de la ODC de *M. phaseolina* en la cepa HMP05, el cual predice una proteína de 325 aminoácidos, homóloga con ODCs pertenecientes a otros patógenos fúngicos, que exhibe los motivos canónicos característicos de la familia de ornitinas descarboxilasas, permitiendo demostrar el mecanismo de biosíntesis de putrescina utilizado por este fitopatógeno.

El análisis de la región promotora de la ODC de *M. phaseolina* basado en TFBSs permitió predecir un pequeño número de dominios de unión a factores de transcripción que sugieren la existencia de un mecanismo de inducción de la ODC mediado por diversos estímulos ambientales, el cual se juzga fundamental para la supervivencia celular, la capacidad adaptativa del microorganismo y su virulencia.

El uso de bajas concentraciones del inhibidor competitivo de la ODC 1,4-diamino-2-butanona (DAB), en *M. phaseolina*, genera una reducción significativa de la tasa de crecimiento vegetativo, permitiendo sugerir que, a diferencia de lo que se ha observado en otros hongos, la poza celular de poliaminas que es más accesible a la droga, puede ser aquella relacionada con soportar los procesos de crecimiento. Lo anterior, pone en evidencia la implicación de la ODC en el desarrollo micelial, indispensable para la invasión del hospedero y la generación de la necrosis vascular, característica de la pudrición carbonosa producida por este microorganismo.

El perfil de expresión del gen ODC de *M. phaseolina* no pudo determinarse debido a dificultades operativas e inherentes al organismo en estudio, que impidieron validar el rango dinámico de detección, indispensable para la adecuada cuantificación de la expresión del gen.

10. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Es necesario demostrar la funcionalidad del gen ODC identificado por medio de un experimento de complementación en cepas mutantes, que permita evidenciar la capacidad de la secuencia aislada para revertir el fenotipo auxotrofo de poliaminas, característico de los modelos a los que se les genera disrupción del gen ODC.

Debe considerarse prioritario el desarrollo de un sistema de transformación genética para *M. phaseolina*, que permita la generación de mutantes y facilite el estudio de las bases moleculares de este microorganismo. La generación de este sistema hará posible la construcción de mutantes dobles por recombinación homóloga de la ODC, ideales para demostrar la actividad ornitina descarboxilasa de la secuencia identificada y estudiar su papel en la patogénesis.

Para determinar fehacientemente si la ODC de *M. phaseolina* es un factor de patogenicidad en *P. vulgaris* es necesario diseñar estudios de interacción que incluyan evaluaciones del patosistema con el fenotipo salvaje, cepas mutantes de la ODC y cepas complementadas, que permitan probar definitivamente si el producto de este gen tiene o no, implicaciones en la patogenicidad y/o virulencia.

Teniendo en cuenta los hallazgos de este estudio se considera interesante investigar la señal de degradación de la ODC de *M. phaseolina* para avanzar en la comprensión del mecanismo proteolítico de esta enzima en hongos filamentosos, que en la actualidad no ha sido descrito.

Se sugiere la evaluación del efecto de la inhibición química de la ODC de *M. phaseolina* sobre los procesos de diferenciación celular tales como esclerogénesis y conidiación, con diferentes inhibidores de la ODC, acoplados a evaluaciones de la actividad enzimática y medición de los niveles de poliaminas, con el fin de caracterizar el comportamiento de estos metabolitos en la morfogénesis del organismo.

La predicción de la estructura tridimensional de la ODC de *M. phaseolina* constituye una pieza clave para el desarrollo de estudios de acoplamiento y dinámica molecular que permitirán la selección y posterior evaluación experimental de alternativas farmacológicas de inhibición de la biosíntesis de putrescina, con el objetivo de generar estrategias efectivas de control de la pudrición carbonosa y otras enfermedades causadas por este fitopatógeno, en sus distintos hospedantes.

Para determinar el perfil de expresión del gen ODC de *M. phaseolina* durante la interacción con *P. vulgaris*, se considera necesario optimizar la técnica de cuantificación en tiempo real, mediante la ejecución de un protocolo de preamplificación específico del gen, que exige rediseñar los ensayos TaqMan® en aras de eliminar la interferencia potencial de remanentes de ADNg en algunas de las muestras.

La ejecución de un análisis de hibridación tipo Northern blot se juzga ideal como estrategia de identificación y confirmación del tamaño y número de transcritos del gen ODC de *M. phaseolina*, lo cual permitirá además, dilucidar la existencia de un posible mecanismo de *splicing* alternativo.

Otra consideración interesante, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio, es la de la evaluación del perfil transcripcional ODC bajo condiciones ambientales estresantes, que podrían ejercer un efecto inductor del gen, durante la patogénesis de *M. phaseolina* en *P. vulgaris*.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abawi, G.S. and Pastor-Corrales, M.A. 1990. Root Rots of Beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research Methodologies, and Management Strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 114p.
- Ahn, I.P., Kim, S., Choi, W.B., and Lee, Y.H. 2003. Calcium restores prepenetration morphogenesis abolished by polyamines in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting red pepper. *FEMS Microbiology Letters* 227: 237-241.
- Alkan, N., Meng, X., Friedlander, G., Reuveni, E., Sukno, S., Sherman, A., and Prusky, D. 2013. Global aspects of *pacC* regulation of pathogenicity genes in *Colletotrichum gloeosporioides* as revealed by transcriptome analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(11): 1345-1358.
- Almud, J. J., Oliveira, M. A., Kern, A. D., Grishin, N. V., Phillips, M. A., and Hackert, M. L. 2000. Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding. *Journal of molecular biology*, 295(1):7-16.
- Ammon, V., Wyllie, T. D., and Brown Jr, M. F. 1974. An ultrastructural investigation of pathological alterations induced by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in seedlings of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Physiological plant pathology*, 4(1): 1-4.
- Ammon, V., Wyllie, T.D., and Brown, M.F.Jr. 1975. Investigation of the infection process of *Macrophomina phaseolina* on the surface of soybean roots using scanning electron microscopy. *Mycopathologia* 55: 77-8
- Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson, L.C., and Hölttä, E. 1992. Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 360: 355-358.
- Bagni, N., and Tassoni, A. 2001. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20: 301-317.
- Bailey, A., Mueller, E., and Bowyer, P. 2000. Ornithine decarboxylase of *Stagonospora* (*Septoria*) *nodorum* is required for virulence toward wheat. *Journal of Biological Chemistry* 275(19): 14242-14247.

- Baird, R.E., Watson, C.E., and Scruggs, M. 2003. Relative longevity of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil. *Plant Disease*. 87:563-566.
- Baird, R.E., Wadl, P.A., Allen, T., McNeill, D., Wang, X., Moulton, J.K. *et al.* 2010. Variability of United States isolates of *Macrophomina phaseolina* based on simple sequence repeats and cross genus transferability to related genera within botryosphaeriaceae. *Mycopathologia* 170: 169-80.
- Beebe, S.E., Rao, I.M., Blair, M. W., and Acosta-Gallegos, J.A. 2013. Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frontiers in physiology* 4: 1-20.
- Brandao, R.L., Castro, I.M., Passos, J.B., Nicoli, J.R. and Thevelein, J.M. 1992. Glucose-induced activation of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Fusarium oxysporum*. *J. Gen. Microbiol.* 138:1579 -1586.
- Bressano, M., Lorena Giachero, M., Luna, C. M., and Ducasse, D. A. 2010. An *in vitro* method for examining infection of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(3): 201-204.
- Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Espeso, E. A., González-Verdejo, C. I., García-Maceira, F. I., and Di Pietro, A. 2003. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular microbiology*, 48(3): 765-779.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1983. Etapas de desarrollo de la planta de frijol común; Guía de estudio para ser usada como complemento de la Unidad Auditutorial sobre el tema. Contenido científico: Fernández, F., Gepts, P., López, M. Producción: Ospina, O. H. F. Colaboración: Hidalgo, R. Cali, Colombia 26 p.
- Cervantes-Chávez, J. A., Ortiz-Castellanos, L., Tejeda-Sartorius, M., Gold, S., and Ruiz-Herrera, J. 2010. Functional analysis of the pH responsive pathway Pal/Rim in the phytopathogenic basidiomycete *Ustilago maydis*. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 47(5): 446-457.

- Cervantes-García, D., Padilla-Ramírez, S., Simpson, J. and Mayek-Pérez, N. 2003. Osmotic potential effects on in vitro growth, morphology and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina*. *Journal Phytopathology* 151: 456-462.
- Chattopadhyay, M.K., Park, M.H. and Tabor, H. 2008. Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine. *PNAS* 105: 6554-6559.
- Chattopadhyay, M.K., Tabor, C. W., and Tabor, H. 2006. Polyamine deficiency leads to accumulation of reactive oxygen species in a *spe2* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 751-761.
- Chibucos, M.C. and Morris, P.F. 2006. Levels of polyamines and kinetic characterization of their uptake in the soybean pathogen *Phytophthora sojae*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3350-3356.
- Childs, A. C., Mehta, D. J., and Gerner, E. W. (2003). Polyamine-dependent gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*60(7): 1394-1406.
- Choi, W.B., Kang, S.H., Lee, Y.W., Lee, Y.H. 1998. Cyclic AMP restores appressorium formation inhibited by polyamines in *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* 88: 58-62.
- Coburn, R.F. 2009. Polyamine effects on cell function: possible central role of plasma membrane PI (4, 5) P2. *Journal of cell physiology* 221: 544-551.
- Coffino, P. 2001. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 188-194.
- Cokkizgin, A. 2012. Salinity Stress in Common Bean (*Phaseolus vulgaris L.*) Seed Germination *Not Bot Horti Agrobi* 40(1):177-182.
- Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., and Shinozaki, K. 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* 11:163-177.
- Csöndes, I., Cseh, A., Taller, J., and Poczai, P. 2012. Genetic diversity and effect of temperature and pH on the growth of *Macrophomina phaseolina* isolates from sunflower fields in Hungary. *Molecular biology reports*, 39(3): 3259-3269.

- Davis, D. 1969. Fusaric acid in selective pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 59, 1391–1395.
- Davis, R.H., Morris, D. R., and Coffino, P. 1992. Sequestered end products and enzyme regulation: The case of ornithine decarboxylase *Microbiological reviews* 56 (2): 280-290.
- De Bernardis, F., Mühlshlegel, F. A., Cassone, A., and Fonzi, W. A. 1998. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 66(7): 3317-3325.
- De Nadal, E., and Posas, F. 2010. Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *The EMBO journal*, 29(1): 4-13.
- Desforges, B., Curmi, P.A., Bounedjah, Q., Nakib, S., Hamon, L., De Bandt, J-P., and Pastré, D. 2013. An Intercellular polyamine transfer via gap junctions regulates proliferation and response to stress in epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*. D.O.I: 10.1091/mbc.E12-10-0729.
- Dhingra, O.D. and Sinclair J. B. 1987. *Biology and Pathology of Macrophomina phaseolina*. Vicoso, Brazil, Universidad Federal de Vicoso.
- Di Pietro, A., García-Maceira, F. I., Meglecz, E., and Roncero, M. I. G. 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular microbiology*, 39(5): 1140-1152.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T. M., Dveksier, G. S. 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Research* 3:S30-S37.
- Divon, H. H., and Fluhr, R. 2007. Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS microbiology letters*, 266(1): 65-74.
- Duran, R., Cary, J. W., and Calvo, A. M. 2010. Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. *Toxins*, 2(4): 367-381.
- El Ghachtouli, N., Paynot, M., Martin-Tanguy, J., Morandi, D. and Gianinazzi, S. 1996. Effect of polyamines in *Glomus mosseae*. *Mycological Research* 100: 597-600.

- Eshel, D., Miyara, I., Ailing, T., Dinooor, A., and Prusky, D. 2002. pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(8), 774-779.
- Freeman, W. M., Robertson, D. J., and Vrana, K. E. 2000. Fundamentals of ADN hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques*, 29(5), 1042-1055.
- Fujisawa, S. and Kadoma, Y. 2005. Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer research* 25:965-970.
- Gamarnik A., Frydman, F.R. and Barreto, D. 1994. Prevention of infection of soybean seeds by *Colletotrichum truncatum* by polyamine biosynthesis inhibitors. *Phytopathology* 84: 1445-1448.
- Georgiou, C. D., Patsoukis, N., Papapostolou, I., and Zervoudakis, G. 2006. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology* 46: 691-712.
- Ghoda, L., van Daalen Wetters, T., Macrae, M., Ascherman, D., and Coffino, P. 1989. Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. *Science*, 243(4897):1493-1495.
- Gödderz, D., Schäfer, E., Palanimurugan, R., and Dohmen, R. J. 2011. The N-terminal unstructured domain of yeast ODC functions as a transplantable and replaceable ubiquitin-independent degron. *Journal of molecular biology*, 407(3):354-367.
- Graham, P.H., and Ranalli, P. 1997. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research* 53: 131-146.
- Grishin, N. V., Osterman, A. L., Brooks, H. B., Phillips, M. A., and Goldsmith, E. J. 1999. X-ray structure of ornithine decarboxylase from *Trypanosoma brucei*: the native structure and the structure in complex with α -difluoromethylornithine. *Biochemistry*, 38(46):15174-15184.
- Groppa, M. D., and Benavides, M. P. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34: 35-45.
- Groppa, M., Tomaro, M., and Benavides, M. 2001. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science* 161: 481-488.

- Guevara-Olvera, L., Calvo-Mendez, C. and Ruiz-Herrera, J. 1993. The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of General Microbiology* 193: 485-493.
- Guevara-Olvera, L., Hung, C. Y., Yu, J. J., & Cole, G. T. 2000. Sequence, expression and functional analysis of the *Coccidioides immitis* ODC (ornithine decarboxylase) gene. *Gene* 242(1): 437-448.
- Guevara-Olvera, L., Xoconostle-Cázares, B., and Ruiz-Herrera, J. 1997. Cloning and disruption of the ornithine decarboxylase gene of *Ustilago maydis*: evidence for a role of polyamines in its dimorphic transition. *Microbiology* 143(7): 2237-2245.
- Gupta, K., Dey, A., and Gupta, B. 2013. Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(7): 2015-2036.
- Guzmán-de-Peña, D. and Ruiz-Herrera, J. 1997. Relationship between Aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology* 21:198-205.
- Hayashi, S. I., and Murakami, Y. 1995. Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase. *Biochemical Journal* 306: 1-10.
- Heby, O. 1981. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19: 1-20.
- Heller, J.S., Fong, W.F., and Canellakis, E.S. 1976. Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 1858-1862.
- Hongay, C., Jia, N., Bard, M., and Winston, F. 2002. Mot3 is a transcriptional repressor of ergosterol biosynthetic genes and is required for normal vacuolar function in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 21: 4114-4124.
- Hoyt, M. A., Broun, M., and Davis, R.H. 2000. Polyamine Regulation of Ornithine Decarboxylase Synthesis in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology* 20 (8): 2760-2773.
- Hoyt, M. A., Zhang, M., and Coffino, P. 2003. Ubiquitin-independent mechanisms of mouse ornithine decarboxylase degradation are conserved between mammalian and fungal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14): 12135-12143.

- Iacomino, G., Picariello, G., and D'Agostino, L. 2012. ADN and nuclear aggregates of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823: 1745-1755.
- Igarashia, K., and Kashiwagic, K. 2010. Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42: 39-51
- Ilyas, M.B., and Sinclair, J. 1974. Effects of plant age upon development of necrosis and occurrence of intraxylem sclerotia in soybean infected with *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*; 64:156-157.
- Inderlied, C.B., Cihlar, R.L., and Sypherd, P.S. 1980. Regulation of Ornithine decarboxylase during morphogenesis of *Mucor racemosus*. *Journal of bacteriology* 141 (2):699-706.
- Islam, S., Haque, S., Islam, M.M., Emdad, E.M., Halim, A., Hossen, M., Hossain, Z., Ahmed, B., Rahim, S., Rahman, S., Alam, M., Hou, S., Wan, X., Saito, J.A., and Alam, M. 2012. Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. *BMC Genomics* 13:493.
- Ivanov, I. P., Firth, A. E., and Atkins, J. F. 2010. Recurrent emergence of catalytically inactive ornithine decarboxylase homologous forms that likely have regulatory function. *Journal of molecular evolution* 70(3): 289-302.
- Jaime Madrigal-Pulido, J., Padilla-Guerrero, I., Magaña-Martínez, I de J., Briseida Cacho-Valadeza, B., Torres-Guzman, J.C., Salazar-Solis, E., J. Felix Gutierrez-Corona, J.F., Schrankc, A., Jiménez-Bremont, F., and González-Hernandez, A. 2011. Isolation, characterization and expression analysis of the ornithine decarboxylase gene (*ODCI*) of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Microbiological Research* 166: 494-507.
- Jana, T., Sharma, T.R., Prasad, R. D. and Arora, D. K. 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. *Microbiological research* 158: 249-257.
- Jha, A. K., and Dubey, S. C. 2000. Occurrence of collar rot of okra (*Abelmoschus esculentus*) in the plateau region of Bihar. *Journal of Research, Birsa Agricultural University*, 12(1): 67-72.

- Jiménez - Bremont, J.F. and Ruiz - Herrera, J. 2008. Analysis of the transcriptional regulation of *YIODC* gene from the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *Microbiological Research* 163:717-723.
- Jiménez-Bremont, J.F., Ruiz-Herrera, J., and Domínguez, A. 2001. Disruption of gene *YIODC* reveals absolute requirement of polyamines for mycelial development in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 1:195-204.
- Jones, A.L. 1999. *Phaseolus* bean: Post-harvest Operations. Mejia, D. y Lewis, B. (eds.). Cali, Valle, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Kaur, S., Dhillon, G.S., Brar, S.K., Vallad, G.E., Chand, R., and Chauhan, V.B. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology* 2012: 1-16.
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A.F., and Galston, A.W. 1988. Spermidine and flower-bud differentiation in thin-layer explants of tobacco. *Plants* 173:282-284.
- Kern, A. D., Oliveira, M. A., Coffino, P., and Hackert, M. L. 1999. Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Structure*, 7(5): 567-581.
- Khan, A.J., and Minocha, S.C. 1989. Biosynthetic arginine decarboxylase in phytopathogenic fungi. *Life Sciences* 44: 1215-1222.
- Khurana, N., Saxena, R. K., Gupta, R., and Rajam, M. V. 1996. Polyamines as modulators of microcycle conidiation in *Aspergillus flavus*. *Microbiology* 142: 517-523.
- Kim, S. W., Mangold, U., Waghorne, C., Mobascher, A., Shantz, L., Banyard, J., and Zetter, B. R. 2006. Regulation of cell proliferation by the antizyme inhibitor: evidence for an antizyme-independent mechanism. *Journal of cell science*, 119(12): 2583-2591.
- Knogge, W. 1996. Fungal infection of plants. *The Plant Cell* 8(10):1711-1722.
- Lai, F. J., Chiu, C. C., Yang, T. H., Huang, Y. M., and Wu, W. S. 2013. Identifying Functional Transcription Factor Binding Sites in Yeast by Considering Their Positional Preference in the Promoters. *PloS one* 8 (12): e83791.

- Li, X. and Coffino, P. 1993. Degradation of ornithine decarboxylase: exposure of the C-terminal target by a polyamine-inducible inhibitory protein. *Molecular Cellular Biology* 13: 2377–2383.
- Liu, Y-C., Hsu, D-H, Huang C-L., Liu, Y-L., Liu G-Y., and Hung, H-C. 2011. Determinants of the differential Antizyme-binding affinity of Ornithine Decarboxylase. *PLoS ONE* 6(11): e26835. doi:10.1371.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, 25:402-408.
- López, M. C., García, S., Ruiz-Herrera, J., and Domínguez, A. (1997). The ornithine decarboxylase gene from *Candida albicans*. Sequence analysis and expression during dimorphism. *Current genetics*, 32(2): 108-114.
- Lovaas, E. 1991. Antioxidative effects of polyamines. *Journal of the American oil chemists society* 68: 353-358.
- Ma, D., and Li, R. 2013. Current understanding of HOG-MAPK pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia*, 175(1-2):13-23.
- Madrigal-Pulido, J., Padilla-Guerrero, I., Magaña-Martínez, I. D. J., Cacho-Valadez, B., Torres-Guzman, J. C., Salazar-Solis, E., and González Hernandez, A. 2011. Isolation, characterization and expression analysis of the ornithine decarboxylase gene (ODC1) of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiological research* 166(6):494-507.
- Mandel, S., Robzyk, K., and Kassir, Y. 1994. IME1 gene encodes a transcription factor which is required to induce meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Developmental genetics* 15(2): 139-147.
- Martín, J. P., and Di Pietro, A. (Eds.). 2012. Morphogenesis and pathogenicity in fungi (Vol. 22). Springer.
- Martinez-Pacheco M, Rodriguez G, Reyna G, Calvo-Mendez C, Ruiz-Herrera J. 1989. Inhibition of the yeast-mycelial transition and the phorogenesis of Mucorales by diamino butanone. *Arch Microbiol* 151(1):10-14.
- Martinez-Pacheco, M., and Ruiz-Herrera, J. 1993. Differential compartmentation of ornithine decarboxylase in cells of *Mucor rouxii*. *Journal of General Microbiology*, 139(6):1387-1394.

- Mayek-Pérez N., García-Espinosa R., López-Castañeda C., Acosta-Gallegos J. y Simpson J. 2002. Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 185-195.
- Mayek-Perez N., López-Castaneda C. y J.A. Acosta-Gallegos. 1997 Variacion en características culturales *in vitro* de aislamientos de *Macrophomina phaseolina* y su virulencia en frijol. *Agrociencia*, 31:187-195.
- Mayek-Perez, N., López-Castañeda, C., López-Salinas, E., Cumpián-Gutiérrez, J., and Acosta-Gallegos, J.A. 2001. Resistencia a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol común en condiciones de campo en México. *Agrociencia* 35 (6): 649-661.
- Mendizabal, I., Rios, G., Mulet, J. M., Serrano, R., & de Larrinoa, I. F. 1998. Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS letters*, 425(2): 323-328.
- Mihail, J. D., and Taylor, S. J. 1995. Interpreting variability among isolates of *Macrophomina phaseolina* in pathogenicity, pycnidium production, and chlorate utilization. *Canadian Journal of Botany*, 73(10): 1596-1603.
- Miyara, I., Shafran, H., Kramer Haimovich, H., Rollins, J., Sherman, A., and Prusky, D. 2008. Multi-factor regulation of pectate lyase secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on avocado fruits. *Molecular plant pathology*, 9(3): 281-291.
- Montañés, F. M., Pascual-Ahuir, A., and Proft, M. 2011. Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. *Molecular microbiology*, 79(4): 1008-1023.
- Moore, R. C., and Boyle, S. M. 1990. Nucleotide sequence and analysis of the speA gene encoding biosynthetic arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 172(8): 4631-4640.
- Morgan, D.L.M. Polyamines: an introduction. 1998. pp. 3-30. *In: Morgan DML* (ed.). *Polyamine protocols*. Vol.79. Human Press, Totowa, New Jersey, USA. 186p.

- Nahla Mustafa Abdelwhab, Abdel Azim A.M. Nour y Aisha Sheikh Mohamed Fageer, 2009. The Nutritive and Functional Properties of Dry Bean (*Phaseolus vulgaris*) as Affected by Gamma Irradiation. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8: 1739-1742
- National Research Council (U.S.). Committee on Genetic Vulnerability of Major Crops. 1972. Genetic Vulnerability of Major Crops: Committee on Genetic Vulnerability of Major Crops. National Academy of Sciences. Washington, D.C, USA.
- Nickerson, K.W., Dunkle, L.D., and Van Etten, J.L. 1977. Absence of spermine in filamentous fungi. *Journal of Bacteriology* 129: 173-176
- Niño-Vega, G. A., Sorais, F., Calcagno, A. M., Ruiz-Herrera, J., Martínez-Espinoza, A. D., and San-Blas, G. 2004. Cloning and expression analysis of the ornithine decarboxylase gene (PbrODC) of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*, 21(3): 211-218.
- Nobile, C. J., Solis, N., Myers, C. L., Fay, A. J., Deneault, J. S., Nantel, A., and Filler, S. G. 2008. *Candida albicans* transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall functions. *Cellular microbiology*, 10(11): 2180-2196.
- O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., and Stüber, K. 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature genetics*, 44(9):1060-1065.
- Olmo, M. T., Rodríguez-Agudo, D., Medina, M. Á., and Sánchez-Jiménez, F. 1999. The pest regions containing C-termini of mammalian ornithine decarboxylase and histidine decarboxylase play different roles in protein degradation. *Biochemical and biophysical research communications*, 257(2): 269-272.
- Orejas, M., Espeso, E. A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H. N., and Penalva, M. A. 1995. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes & Development*, 9(13):1622-1632.
- Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. Dirección de estadística. FAOSTAT 2014. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>.

- Packham, G., and Cleveland, J.L. 1994. Ornithine decarboxylase is a mediator of c-Myc-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 14 (9):5741-5747.
- Palanimurugan, R., Scheel, H., Hofmann, K., and Dohmen, R.J. 2004. Polyamines regulate their synthesis by inducing expression and blocking degradation of ODC antizyme. *EMBO Journal* 23: 4857-4867.
- Papapostolou, I., and Georgiou, C.D. 2010. Superoxide radical induces sclerotial differentiation in filamentous phytopathogenic fungi: a superoxide dismutase mimetics study. *Microbiology* 156: 960-96.
- Pegg, A. E. 2009. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 61: 880-894.
- Pegg, A. E., and Casero Jr, R. A. Current status of the polyamine research field. 2011. pp.3-35. *In Polyamines*. Humana Press.
- Pegg, A.E. 2006. Regulation of Ornithine Decarboxylase. *The Journal of biological chemistry* 281 (21): 14529-14532.
- Pendeville, H., Nick Carpino, N., Marine, J-C., Takahashi, Y., Muller, M., Martial, J.A., and Cleveland, J.L. 2001. The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Molecular Cellular Biology* 21(19): 6549-6558.
- Peñalva, M. A., and Arst, H. N. 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3): 426-446.
- Peñalva, M. A., Tilburn, J., Bignell, E., and Arst Jr, H. N. 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in microbiology*, 16(6): 291-300.
- Pereira, P. A. A. and Bliss, F. A. 1987. Nitrogen fixation and plant growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different levels of phosphorus availability. *Plant and Soil* 104: 79-84.
- Pieckenstain, F.L., Garriz, A., Chornomaz, E.M., Sanchez, D.H., and Ruiz, O.A. 2001. The effect of polyamine biosynthesis inhibition on growth and differentiation of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80: 245-253.

- Poulin, R., Coward, J.K., Lakanen, J.R., and Pegg, A.E. 1993. Enhancement of the spermidine uptake system and lethal effects of spermidine overaccumulation in ornithine decarboxylase-overproducing L1210 cells under hyposmotic stress. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 4690-4698.
- Pratt, R. G., McLaughlin, M. R., Pederson, G. A., and Rowe, D. E. 1998. Pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* to mature plant tissues of alfalfa and white clover. *Plant Disease*, 82(9), 1033-1038.
- Prusky, D., and Yakoby, N. 2003. Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH?. *Molecular Plant Pathology*, 4(6): 509-516.
- Radwan, O., Rouhana, L. V., Hartman, G. L., and Korban, S. S. 2014. Genetic Mechanisms of Host–Pathogen Interactions for Charcoal Rot in Soybean. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(3): 617-629.
- Raeder U. and Broda, P. 1985. Rapid preparation of ADN from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1:17-20.
- Rajam, M.V., Kumria, R., and Singh, S. 2004. Molecular biology and genetic engineering of Polyaminas in plants. pp. 60-77. In: Srivastava PS, Narula A and Srivastava S (eds.). *Plant Biotechnology and Molecular Markers*. Anamaya Publishers, New Delhi, India.420p.
- Rajam, M.V., Weinstein, L.H., Galston, A.W. 1986. Kinetic studies on the control of the bean rust fungus (*Uromyces phaseoli* L.) by an inhibitor of polyamine biosynthesis. *Plant Physiology* 82: 485-487.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S. W. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in biochemical sciences* 21(7): 267-271.
- Reitz, M., Waiters, D., and Moerschbacher, B. 1995. Germination and appressorial formation by uredospores of *Uromyces viciae-fabae* exposed to inhibitors of polyamine biosynthesis. *European Journal of Plant Pathology* 101: 573-578.
- Roa Cordero MV y Rosas Quijano R. 2013. La Biosíntesis de las poliaminas en el hongo fitopatógono *Macrophomina phaseolina*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31:45-59.

- Ruiz-Herrera, J. 1994. Polyamines, ADN methylation, and fungal differentiation. *Critical reviews in microbiology*, 20(2):143-150.
- Sambrook, J., Russell, D. X. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. USA.
- Sanchez, P.A. 2002. Soil fertility and hunger in Africa. *Science* 295: 2019-2020.
- Sannazzaro, A., Álvarez, C.L., Mendez, A. B., Pieckenstain, L., Albertó, E. O., and Ruíz, O. A. 2004. Ornithine and arginine decarboxylase activities and effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on *Gigaspora rosea* germinating spores. *FEMS Microbiology Letters* 230:115-121.
- Schafer, W. 1994. Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annual review of phytopathology* 32(1):461-477
- Schoonhoven, A. van and Voysest, O., 1991. *Common Beans: Research for Crop Improvement*. CIAT, Cali, Colombia.
- Schwartz, H.F. and Pastor-Corrales, M.A., 1989. *Bean Production Problems in the Tropics*, 2nd Ed. CIAT, Cali, Colombia.
- Secretaría de hacienda y crédito público. 2014. Panorama del frijol. Disponible en: <http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Frijol%20%28may%202014%29.pdf>.
- Shapira, R., Altam, A., Henis, Y., and Chet, L. 1989. Polyamines and ornithine decarboxylase activity during growth and differentiation in *Sclerotium rolfsii*. *Journal of General Microbiology* 135: 1361-1367
- Short, G.E., Wyllie, T.D., and Bristow, P.R. 1980. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and in residue of soybean. *Phytopathology* 70: 13-17.
- Sikora, L.A. and Marzluf, G.A. 1982. Regulation of 1-phenylalanine ammonia-lyase by 1-phenylalanine and nitrogen in *Neurospora crassa*. *J.Bacteriol.* 150:1287-1291.
- Singh, S. P. And Schwartz, H.F. 2011. Review: Breeding common bean for resistance to insect pests and nematodes. *Canadian Journal of Plant Science* 91: 239-250.

- St Leger, R.J., Nelson, J.O. and Screen, S.E. 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *J. Microbiol.* 145: 2691-2699.
- Su, G., Suh, S. O., Schneider, R. W., and Russin, J. S. 2001. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 91(2): 120-126.
- Su, S. S., and Mitchell, A. P. 1993. Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene RIM1. *Nucleic acids research*, 21(16): 3789-3797.
- Tabor, C.W., and Tabor, H. 1985. Polyamines in Microorganisms. *Microbiological reviews* 49: 81-99.
- Takeuchi, J., Chen, H., Hoyt, M., and Coffino, P. 2008. Structural elements of the ubiquitin-independent proteasome degron of ornithine decarboxylase. *Biochem. J.* 410: 401-407.
- Tisi, A., Federico, R., Moreno, S., Lucretti, S., Moschou, P.N., Roubelakis-Angelakis, K.A., Angelini, R., and Cona, A. 2011. Perturbation of polyamine catabolism can strongly affect root development and xylem differentiation. *Plant Physiology* 157:200-215.
- Urdiales, J. L., Medina, M.A., and Sanchez-Jimenez, F. 2001. Polyamine metabolism revisited. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 13: 1015-1019.
- Valdés-Santiago, L. and Ruiz-Herrera, J. 2013. Stress and polyamine metabolism in fungi. *Frontiers in chemistry*, 1.
- Valdes-Santiago, L., Cervantes-Chavez, J.A., and Ruiz-Herrera, J. 2009. *Ustilago maydis* spermidine synthase is encoded by a chimeric gene, required for morphogenesis, and indispensable for survival in the host. *FEMS Yeast Res.* 9: 923-935.
- Valdés-Santiago, L., Cervantes-Chávez, J.A., León-Ramírez, C.G., and Ruiz-Herrera, J. 2012. Polyamine metabolism in fungi with emphasis on phytopathogenic species. *Journal of Amino Acids* 2012: 1-13.
- Valdes-Santiago, L., Guzman-De-Pena, D., and Ruiz-Herrera, J. 2010. Life without putrescine: disruption of the gene-encoding polyamine oxidase in *Ustilago maydis* *odc* mutants. *FEMS YeastRes.* 10: 928-940.

- Van Velthuis, H., Huddleston, B., Fischer, G., Salvatore, M., Ataman, E., Nachtergaele, F.O., Zanetti, M., Bloise, M., Antonicelli, A., Bel, J., De Liddo, A., De Salvo, P., and Franceschini, G. 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Institute for Applied Systems Analysis
- Villota-Salazar, A. 2013. Análisis Epigenético de la patogenicidad del hongo *Macrophomina phaseolina* en *Phaseolus vulgaris*. Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. Reynosa, Tamaulipas, México. 134p.
- Voysest, O. 2000 Mejoramiento Genético del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Legado de Variedades de América Latina 1930-1999. Cali, Valle, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Williams, L. J., Barnett, G. R., Ristow, J. L., Pitkin, J. O. H. N., Perriere, M., and Davis, R. H. 1992. Ornithine decarboxylase gene of *Neurospora crassa*: isolation, sequence, and polyamine-mediated regulation of its mRNA. *Molecular and cellular biology* 12(1): 347-359.
- Wimalasekera, R., Tebartz, F., and Scherer, G.F.E. 2011. Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Science* 181:593-603.
- Wooley, J., Lepiz, R., Aquinas-Portes y Castro, T. and Voss, L. 1991. Bean cropping systems in the tropics and subtropics and their determinants. In: ed. A. van Schoonhoven and O. Voysest, *Common Beans: Research for Crop Improvement*. CIAT, Cali, Colombia, pp. 679-706.
- Wortmann, C.S., Kirkby, R.A., Eledu, C.A., and Allen, D.J. 1998. Atlas of common bean (*Phaseolus vulgaris*) production in Africa. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 133p.
- Yoder, O. C., and Turgeon, B. G. 2001. Fungal genomics and pathogenicity. *Current opinion in plant biology* 4(4): 315-321.

12. APÉNDICES

12.1 APÉNDICE A: REACTIVOS Y SOLUCIONES

Caldo Papa Dextrosa (PDB)

Componente	Cantidad/L
Medio PDB MCD-LAB	24 g
Agua desionizada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121oC, 15 min, 15 lb. Realizar prueba de esterilidad, incubando a 30°C por 24 horas

Agar Papa Dextrosa (PDA)

Componente	Cantidad/L
Medio PDA MCD-LAB	39 g
Agua desionizada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121oC, 15 min, 15 lb. Realizar prueba de esterilidad, incubando a 30oC por 24 horas.

Caldo Luria Bertani (LB)

Componente	Cantidad/L
LB Miller Broth IBI Scientific	25g
Agua desionizada	1000mL

pH: 7,0±2

Esterilizar en autoclave a 121oC, 15 min, 15 lb. Realizar prueba de esterilidad, incubando a 30oC por 24 horas.

Agar Luria Bertani (LB)

Componente	Cantidad/L
LB Miller Agar IBI Scientific	37g
Agua desionizada	1000mL
pH: 7,0 _± 2	

Esterilizar en autoclave a 121oC, 15 min, 15 lb. Realizar prueba de esterilidad, incubando a 30oC por 24 horas.

Buffer de extracción de ADN

Componente	Cantidad/L
Tris HCl [1M] pH 8.5	200 mL
EDTA [0.5 M] pH 8.0	50 mL
SDS 20 %	25 mL
Agua desionizada estéril	725 mL

Buffer TE 1X pH 8.0

Componente	Concentración final
Tris-HCl	10 mM
EDTA.Na ₂	1 mM

TAE 1X

Componente	Concentración final
Tris-acetato	40 mM
EDTA	1 mM

Agua DEPC

Componente	Cantidad
Dietil pirocarbonato [1 % v/v]	1 mL

Agua desionizada 999 mL

Incubar a 37 oC toda la noche y esterilizar en autoclave a 121oC, 15 min, 15 lb.

Solución de lisis (Lysis/Binding solution MagMAX™ de Life Technologies)

Componente	Cantidad por reacción
Lysis Binding Solution Concentrate	90uL
Plant RNA Isolation Aid	10uL

Mezclar y almacenar la solución a temperatura ambiente.

Solución de perlas magnéticas (Bead Mix MagMAX™ de Life Technologies)

Homogenizar la solución RNA Binding Beads por agitación en vórtex a velocidad moderada hasta obtener una suspensión uniforme. Dispensar los reactivos de acuerdo a las siguientes instrucciones:

Componente	Cantidad por reacción
RNA Binding Beads	10uL
Lysis/Binding Enhancer	10uL

Mezclar y mantener en hielo hasta que sea necesario.

TURBO DNAsa Diluída (Diluted TURBO™ ADNse de Life Technologies)

Componente	Cantidad por reacción
MagMAX™ TURBO™ ADNse Buffer	49µL
TURBO™ DNAsa	1µL

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente.

Medio Murashige y Skoog (MSO)

Componente	Cantidad/L
Solución A	
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	165 g

Nitrato de potasio (KNO_3)	190 g
Agua desionizada estéril	1000 mL

Solución B

Sulfato de magnesio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	37.0 g
Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.69 g
Sulfato de zinc hepta-hidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.86 g
Sulfato de cobre penta-hidratado (CuSO_4)	0.0025 g
Agua desionizada estéril	1000 mL

Solución C

Cloruro de calcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	44 g
Ioduro de potasio (KI)	0.083 g
Cloruro de cobalto hexa-hidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.0025g
Agua desionizada estéril	1000 mL

Solución D

Fosfato ácido de di-potasio (KH_2PO_4)	17 g
Ácido bórico (H_3BO_3)	0.62 g
Molibdato de sodio di-hidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.025 g
Agua desionizada estéril	1000 mL

Compuestos orgánicos

Mioinositol (100 mg/L), ácido indoloacético (0.1mg/L), benciladenina (1mg/L), ácido nicotínico (0.5 mg/L), piridoxina (0.5 mg/L) y tiamina (0.4 mg/L). Sacarosa (30 g/L).

En condiciones de esterilidad, mezclar las sales de cada solución en agua desionizada estéril y almacenar a 4°C, con excepción de la solución A, que puede ser conservada a temperatura ambiente. Para la preparación del medio MSO, adicionar 10 mL de cada una de las cinco soluciones, las vitaminas, las auxinas y la fuente de carbono. pH 5.7 +/- 0.1.

Si se desea preparar medio sólido, adicionar Agar High gel strenght (Sigma-Aldrich) en una concentración de 0,3% p/v Completar a un volumen final de 1000 mL con agua desionizada. Esterilizar en autoclave a 121oC, 15 min, 15 lb.

Caldo de Czapek Dox

Agar de Czapek Dox BD Bioxon	35 g
Agua desionizada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121oC, 15 min, 15 lb. Realizar prueba de esterilidad, incubando a 30°C por 24 horas

Agar de Czapek Dox **Cantidad/L**

Agar de Czapek Dox BD Bioxon	50 g
Agua desionizada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121oC, 15 min, 15 lb. Realizar prueba de esterilidad, incubando a 30°C por 24 horas

Buffer Fosfato Salino (PBS)

Componente **Cantidad**

Phosphate buffered saline (PBS) Sigma-Aldrich	1 tableta
Agua desionizada estéril	200mL

El PBS reconstituído equivale a una concentración 0.01 M de buffer fosfato, 0.0027 M de cloruro de potasio y 0.137 M cloruro de sodio. El pH de la solución es 7.4, a 25 °C.

Preparación de placas LB para escrutinio de clonas

Adicionar 50µL de X-Gal (20mg/mL) (3941, Promega) y 10µL de IPTG 1M (V3955, Promega) a cajas de agar LB con ampicilina (100µg/mL), previamente preparadas. Para la distribución homogénea del IPTG y el X-Gal sobre la superficie del detector microbiológico utilizar perlas de vidrio estériles.

12.2 APÉNDICE B: ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS SECUENCIAS PROMOTORAS DE LAS CEPAS HMP05 Y MS6

Seq_1	1	CAAGCTCGGCAAAGGCCAGTCAGAAAACGCAATACGGTTGCGGACTGGTGAGTTAGTGGC	60
Seq_2	1	CAAGCTCGGCAAAGGCCAGTCAGAAAACGCAATACGGTTGCGGACTGGTGAGTTAGTGGC	60
Seq_1	61	GTTCCAGCAAGAAATCAAACGAATGCGGACTCGACCGACACGGCATTGATGCTTCCCC	120
Seq_2	61	GTTCCAGCAAGAAATCAAACGAATGCGGACTCGACCGACACGGCATTGATGCTTCCCC	120
Seq_1	121	CTTGCTGGAATGTAGTGCGGCTGAAACCGCAAAGCTTGGCTCTGTGGCCCATCGGGGACG	180
Seq_2	121	CTTGCTGGAATGTAGTGCGGCTGAAACCGCAAAGCTTGGCTCTGTGGCCCATCGGGGACG	180
Seq_1	181	GCTCGACTTGCCATCCATCGCGCCATTCTTTGGTTCTATGGCGATCGAGGCTCACGATCT	240
Seq_2	181	GCTCGACTTGCCATCCATCGCGCCATTCTTTGGTTCTATGGCGATCGAGGCTCACGATCT	240
Seq_1	241	GCCTTTGCCAAGATCCGTCAAATCTGCTGGGTCCAACGCGCCGCAACTTCCACATTCCC	300
Seq_2	241	GCCTTTGCCAAGATCCGTCAAATCTGCTGGGTCCAACGCGCCGCAACTTCCACATTCCC	300
Seq_1	301	GGACTTGCCGACGTGCCAAGAGTCCCTGATCCTCCCATATTGTCCAGTCGTCCTCAAGTGA	360
Seq_2	301	GGACTTGCCGACGTGCCAAGAGTCCCTGATCCTCCCATATTGTCCAGTCGTCCTCAAGTGA	360
Seq_1	361	AGTGTGGCTGAGATCCAGGAAAGGACTACAGGATGTCTCTATAGATGTGTTCCCGTGCTA	420
Seq_2	361	AGTGTGGCTGAGATCCAGGAAAGGACTACAGGATGTCTCTATAGATGTGTTCCCGTGCTA	420
Seq_1	421	ATCTTGTTTTAGTATAAGACAAACATCTCTTCCAGTTTGGCCTTGGTCTCGATCTCCCC	480
Seq_2	421	ATCTTGTTTTAGTATAAGACAAACATCTCTTCCAGTTTGGCCTTGGTCTCGATCTCCCC	480
Seq_1	481	ACACGCGAACGCGACGTCCAGTGCAGAACTTAAACGCCCTACAGAAGAGCTAGCACCGG	540
Seq_2	481	ACACGCGAACGCGACGTCCAGTGCAGAACTTAAACGCCCTACAGAAGAGCTAGCACCGG	540
Seq_1	541	GACATACCACGCTAGAGGCAACGGTCGATGAATGCAGGGGTCCATCGCCGGCGTCTTCCT	600
Seq_2	541	GACATACCACGCTAGAGGCAACGGTCGATGAATGCAGGGGTCCATCGCCGGCGTCTTCCT	600
Seq_1	601	CACTTCCAGCTGAGGCGCAGTCCACCAGTGTTCAGGCTTTCAGCCACCCATGTGGAA	660
Seq_2	601	CACTTCCAGCTGAGGCGCAGTCCACCAGTGTTCAGGCTTTCAGCCACCCATGTGGAA	660
Seq_1	661	ATAATGATGGCGCTGGCCAAAGGATAATCTGGTCATGTAGAGTGAGGCGAGGCCGTC	720
Seq_2	661	ATAATGATGGCGCTGGCCAAAGGATAATCTGGTCATGTAGAGTGAGGCGAGGCCGTC	720
Seq_1	721	GAGAGGGTAGAAAAAGATGGGCTGCCATGAAGCTTCTCGATACCCATCTCCTTGGTCGAC	780
Seq_2	721	GAGAGGGTAGAAAAAGATGGGCTGCCATGAAGCTTCTCGATACCCATCTCCTTGGTCGAC	780
Seq_1	781	AAGCGATCTTCAAGCAGAGGTCAATTTGATAGGCAGAACATCCCCTTCACTCACCTTCCT	840
Seq_2	781	AAGCGATCTTCAAGCAGAGGTCAATTTGATAGGCAGAACATCCCCTTCACTCACCTTCCT	840
Seq_1	841	ATCTAATCTTCTGATCCGGGGATATGACACCAATTGCGCTCACACCGCCGAGGTCTCCCG	900

```

Seq_2 841 ATCTAATCTTCTGATCCGGGATATGACACCAATTGCGCTCACACCGCCGAGGTCTCCCG 900
Seq_1 901 ACCCCAACCTCCCGCTCGACGGCCAGGAGAAGACCGCCACAGACGGCAAAGGGACAGCGG 960
      |||
Seq_2 901 ACCCCAACCTCCCGCTCGACGGCCAGGAGAAGACAGCCACAGACGGCAAAGGGACAGCGG 960
Seq_1 961 AATATCTCGTCCAGAAAATCATGCACGAGCGCATCCAGAGCATCGACGTGCAACCTGCG 1020
      |||
Seq_2 961 AATATCTCGTCCAGAAAATCATGCACGAGCGCATCCAGAGCATCGACGTGCAACCTGCG 1020
Seq_1 1021 CACCAGGCGAAGACGACGCCTTCTTCGTGCGAGACCTGGGCGAGGTGTACCGGCTGCATG 1080
      |||
Seq_2 1021 CACCAGGCGAAGACGACGCCTTCTTCGTGCGAGACCTGGGCGAGGTGTACCGGCTGCATG 1080
Seq_1 1081 CCGAATGGCGCCAGCGCCTGAGCCGAGTAACACCCTTCTTCGGTCCGCGCCCGCCCGCCC 1140
      |||
Seq_2 1081 CCGAATGGCGCCAGCGCCTGAGCCGAGTAACACCCTTCTTCGGTCCGCGCCCGCCCGCCC 1140
Seq_1 1141 GCAGGAAACCCCGGACGCGAAAGGCTGACCAGATACTTCCTCGCAGCAATCAAAGCGAA 1200
      |||
Seq_2 1141 GCAGGAAACCCCGGACGCGAAAGGCTGACCAGATACTTCCTCGCAGCAATCAAAGCGAA 1200
Seq_1 1201 TCCAGACCAGCACGTGCTGCGGCTACTCGCCGCCCTGGGCACCGGCTTCGACTGCGCCTC 1260
      |||
Seq_2 1201 TCCAGACCAGCACGTGCTGCGGCTACTCGCCGCCCTGGGCACCGGCTTCGACTGCGCCTC 1260
Seq_1 1261 GATCGGCGAGATCCGGACCGTCTGGGAATGGGCATTGACCCAGCCGCGTCTTTCGC 1320
      |||
Seq_2 1261 GATCGGCGAGATCCGGACCGTCTGGGAATGGCATTGACCCAGCCGCGTCTTTCGC 1320
Seq_1 1321 GCACACCTGCAAAGTCATGTGCGCCATCGGCTTCGCGCGGGCCGTCGGCGTCCAGCAGAT 1380
      |||
Seq_2 1321 GCACACCTGCAAAGTCATGTGCGCCATCGGCTTCGCGCGGGCCGTCGGCGTCCAGCAGAT 1380
Seq_1 1381 GACGTTGACAAACGCGGACGAGCTGCGCAAGATCAAGCGCGTGTATCCCGGGGCGCAGCT 1440
      |||
Seq_2 1381 GACGTTGACAAACGCGGACGAGCTGCGCAAGATCAAGCGCGTGTATCCCGGGGCGCAGCT 1440
Seq_1 1441 CTTTCTGCGGGTGCCTCGGTCGATCCGTCGGCCGTGTCGCAGCTGAGCATCAAGTTCGG 1500
      |||
Seq_2 1441 CTTTCTGCGGGTGCCTCGGTCGATCCGTCGGCCGTGTCGCAGCTGAGCATCAAGTTCGG 1500
Seq_1 1501 CGCGCGCATGGAGGCGACGACGACGCTGCTCCGGCTGGCGAGAGACCTGGGCTCAACGT 1560
      |||
Seq_2 1501 CGCGCGCATGGAGGCGACGACGACGCTGCTCCGGCTGGCGAGAGACCTGGGCTCAACGT 1560
Seq_1 1561 CGTTGGCGTGTCTGTTCCACGTGGGC 1585
      |||
Seq_2 1561 CGTTGGCGTGTCTGTTCCACGTGGGC 1585

```

Se muestra el resultado del alineamiento de la región regulatoria obtenida para la cepa HMP05 (secuencia 1) y la secuencia correspondiente perteneciente a la cepa MS6 (secuencia 2) (similitud: 99,81%). En verde se muestran los oligonucleótidos empleados para la reacción en cadena de la polimerasa; el codón de iniciación es señalado en fucsia y el sitio de inicio de la transcripción (+1) se muestra en rojo.

12.3 APÉNDICE C: ALINEAMIENTO PARA CONFIRMAR POSICIÓN DEL INTRÓN EN EL GEN ODC DE LA CEPA HMP05

	10	20	30	40	50	
ORF_HMP05	: ATGGGCATTGACCCAGCCGCGTCTCTCGCGCACACCTGCAAAGTCAT	:				50
ORF_MS6	: ATGGGCATTGACCCAGCCGCGTCTCTCGCGCACACCTGCAAAGTCAT	:				50
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: GTCGGCCATCGGCTTCGCGCGGGCCGTCGGCGTCCAGCAGATGACGTTTCG	:				100
ORF_MS6	: GTCGGCCATCGGCTTCGCGCGGGCCGTCGGCGTCCAGCAGATGACGTTTCG	:				100
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: ACAACGCCGACGAGCTGCGCAAGATCAAGCGCGTGTATCCCGGGGCGCAG	:				150
ORF_MS6	: ACAACGCCGACGAGCTGCGCAAGATCAAGCGCGTGTATCCCGGGGCGCAG	:				150
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: CTCTTCTGCGGGTTCGCCGCGTGCATCCGTCGGCCGTGTCGCAGCTGAG	:				200
ORF_MS6	: CTCTTCTGCGGGTTCGCCGCGTGCATCCGTCGGCCGTGTCGCAGCTGAG	:				200
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: CATCAAGTTCGGCGCGCGCATGGAGGCGACGACGCTGCTCCGGCTGG	:				250
ORF_MS6	: CATCAAGTTCGGCGCGCGCATGGAGGCGACGACGCTGCTCCGGCTGG	:				250
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: CGAGAGACCTGGGCCTCAACGTCGTTGGCGTGTCTCCACGTGGGCAGC	:				300
ORF_MS6	: CGAGAGACCTGGGCCTCAACGTCGTTGGCGTGTCTCCACGTGGGCAGC	:				300
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: GGCGGGAAAGACCCGAGCGCGTTCAAAAGGGCGATTTCGTGACGCGAGGGC	:				350
ORF_MS6	: GGCGGGAAAGACCCGAGCGCGTTCAAAAGGGCGATTTCGTGACGCGAGGGC	:				350
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: CGCGTTCGACCAGGCCACCGGCTTGGGATTCGGATGCACACCTTGGATA	:				400
ORF_MS6	: CGCGTTCGACCAGGCCACCGGCTTGGGATTCGGATGCACACCTTGGATA	:				400
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: TCGGCGGCGGGTTAGCGCAGGTCGCTCTTCGCGCAGACGGCAGCCAG	:				450
ORF_MS6	: TCGGCGGCGGGTTAGCGCAGGTCGCTCTTCGCGCAGACGGCAGCCAG	:				450
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: GTAAATCAGCGGTTGGACGTATACTTCCCCTCGACTCCGGCGTCCGGGT	:				500
ORF_MS6	: GTAAATCAGCGGTTGGACGTATACTTCCCCTCGACTCCGGCGTCCGGGT	:				500
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: GATTGCAGAACCAGGCGGCTTCATGGTCAACAGCGCCTTCACGGCGGCGG	:				550
ORF_MS6	: GATTGCAGAACCAGGCGGCTTCATGGTCAACAGCGCCTTCACGGCGGCGG	:				550
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: CGGCCGTACGTCGCGGAGATGCTCGGAGCCACTGGCTCAGGACTCGAAC	:				600
ORF_MS6	: CGGCCGTACGTCGCGGAGATGCTCGGAGCCACTGGCTCAGGACTCGAAC	:				600
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: AACTTGAAGCCGACAATGCTATACATCAACGACGGCGTGTACGGCAACTA	:				650
ORF_MS6	: AACTTGAAGCCGACAATGCTATACATCAACGACGGCGTGTACGGCAACTA	:				650
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: CTTCACTTCCATCTGCGAAGTTCGCCAGAGCCGCGGGTGTTCAGGCGTG	:				700
ORF_MS6	: CTTCACTTCCATCTGCGAAGTTCGCCAGAGCCGCGGGTGTTCAGGCGTG	:				700
Sec_RT248F	: -----	:				-
ORF_HMP05	: CCGGGCGCACCGTCATTGAGGATCCGGACCTTATCCAGTCGGCTGAAAGG	:				750
ORF_MS6	: CCGGGCGCACCGTCATTGAGGATCCGGACCTTATCCAGTCGGCTGAAAGG	:				750
Sec_RT248F	: -----TTATCCAGTCGGCTGAAAGG	:				20
ORF_HMP05	: CGTGAATATAGCATCTGGGGGAACACTTGTGACAGCTTCGATTGCGTCAA	:				800
ORF_MS6	: CGTGAATATAGCATCTGGGGGAACACTTGTGACAGCTTCGATTGCGTCAA	:				800
Sec_RT248F	: -----	:				70
ORF_HMP05	: CCCTTCGTGTAGTTTGCCGGGCGTGTGGAGATTGGTGACTGGCTATACT	:				850
ORF_MS6	: CCCTTCGTGTAGTTTGCCGGGCGTGTGGAGATTGGTGACTGGCTATACT	:				850
Sec_RT248F	: -----	:				120
ORF_HMP05	: ACCGGGACATGGGAGGTAAGTCACACGCGTCTCAGAGTGGAAAATAAGAG	:				900
ORF_MS6	: ACCGGGACATGGGAGGTAAGTCACACGCGTCTCAGAGTGGAAAATAAGAG	:				900
Sec_RT248F	: -----	:				133
ORF_HMP05	: CAGCTGACTAACTGTGCCTTAGCATATACAAGATGTAGCACTACCACTTT	:				950
ORF_MS6	: CAGCTGACTAACTGTGCCTTAGCATATACAAGATGTAGCACTACCACTTT	:				950
Sec_RT248F	: -----AGCATATACAAGATGTAGCACTACCACTTT	:				163
ORF_HMP05	: CAATGGCTACACGGACTCTCACGACGTGATTTACATCTGCTCAGAGCCTG	:				1000
ORF_MS6	: CAATGGCTACACGGACTCTCACGACGTGATTTACATCTGCTCAGAGCCTG	:				1000
Sec_RT248F	: -----	:				213
ORF_HMP05	: AAGCTGCTACTCTGCTGGATGGAGATTGGAAGTGA : 1035	:				
ORF_MS6	: AAGCTGCTACTCTGCTGGATGGAGATTGGAAGTGA : 1035	:				
Sec_RT248F	: AAGCTGCTACTCTGCTGGATGGAGATTGGAAGTGA : 248	:				